Analyse der Hyperinflammation im Verlauf der murinen Pneumokokken-Pneumonie unter besonderer Berücksichtigung des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL5

vorgelegt von

M.Sc. SARAH BERGER geb. in Görlitz

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer.nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Jens Kurreck
Gutachter:	Prof. Dr. Roland Lauster
Gutachter:	Prof. Dr. Bastian Opitz
Gutachterin:	Dr. Ing. Geraldine Nouailles-Kursar

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 25. Juli 2018

Inhaltsverzeichnis

Ał	okür	rzungs	sverzeichnis	V
1	Z	Zusam	menfassung	VIII
2	S	Summ	ary	. IX
3	E	Einleitu	ung	1
	3.1	Die	e ambulant erworbene Pneumonie	1
	3.2	Sti	reptococcus pneumoniae	2
	3.3	Th	erapie einer Lungenentzündung	3
	3	3.3.1	Mechanische Beatmung und die beatmungsassoziierte Lungenschädigung	4
	3.4	Die	e alveolokapilläre Barriere	5
	З	3.4.1	Das Endothel	6
	З	3.4.2	Das alveoläre Epithel	7
	3.5	Die	e Zellen des angeborenen Immunsystems	8
	З	3.5.1	Alveoläre Makrophagen	9
	З	3.5.2	Monozyten	.10
	З	3.5.3	Dendritische Zellen	.11
	З	3.5.4	Neutrophile Granulozyten	.11
	3.6	Ch	emokine und ihre Rezeptoren	.14
	3	3.6.1	Chemokingruppen	.14
	3	3.6.2	Vom Stimulus zur Chemokinausschüttung	.15
	3	3.6.3	Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR2 und seiner Liganden	.17
4	Z	Zielset	zung	.19
5	Ν	Materia	al und Methoden	.21
	5.1	Ma	aterial	.21
	5	5.1.1	Geräte	.21
	5	5.1.2	Verbrauchsmaterialien	.22
	5	5.1.3	Reagenzien	.24
	5	5.1.4	Antikörper	.25
	5	5.1.5	Enzyme	.25

	5.1.6	Narkose und Heparin	26
	5.1.7	Medien und Puffer	26
	5.1.8	Bakterienstämme	29
	5.1.9	Zelllinien	29
	5.1.10	Kits	29
	5.1.11	Software	30
5	.2 Met	thoden	30
	5.2.1	Anzucht von Streptococcus pneumoniae	30
	5.2.2	Tierexperimentelle Untersuchungen	31
	5.2.3	Analyse der Tiere und Probenentnahme	34
	5.2.4	Mechanische Ventilationsversuche	36
	5.2.5	Färbung der BAL-Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen	37
	5.2.6	Histologische Untersuchungen	39
	5.2.7	Ermittlung der vaskulären Permeabilität	39
	5.2.8	Quantifizierung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren	40
	5.2.9	In vitro Versuche	40
	5.2.10	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	45
6	Ergebn	isse	47
6 S	.1 Der Streptokol	Einfluss früher und später antimikrobieller Therapie auf die Resolution ein kken-induzierten Pneumonie in der Maus	er 47
	6.1.1 Verlauf	Eine retardierte Antibiotika-Therapie schützt nicht vor einem fatalen Pneumoni	e- 47
	6.1.2 Wirkung	Der Zeitpunkt der Antibiotika-Gabe hat keinen Einfluss auf die antibakterie	lle 48
	6.1.3 Alveola	Die Ampicillin-Therapie hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Leukozyten i rraum	im 50
	6.1.4	Frühzeitige und späte Antibiotika-Therapie reduzieren lokale Zytokin-Level	52
	6.1.5 Konzen	Eine antibakterielle Therapie vermindert unabhängig vom Startzeitpunkt loka	ıle 54
	6.1.6 antibak	Zirkulierende Immunzell-Populationen werden weder von früher noch von spät terieller Therapie beeinflusst	er 56

6.1.8 Eine frühzeitige antibakterielle Therapie schützt vor Entwicklung von Pleuritis. Steatitis und Leberschädigung......60 Nur eine frühe Therapie zeigt einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines 6.1.9 6.1.10 Ein frühzeitiger Therapiebeginn verhindert die Schädigung der alveolokapillären 6.2 Chemokins CXCL5 auf Neutrophile-Rekrutierung Der Einfluss des und 6.2.1 6.2.2 Epithelzellen sind die Hauptquelle der CXCL5 Sekretion in der Mauslunge67 6.2.3 Die Sekretion der CXCR2 Liganden von Epithelzellen ist TLR2-abhängig......69 6.2.4 Die Abwesenheit von CXCL5 resultiert in einer stark verminderten Neutrophile-6.2.5 Trotz erhöhter bakterieller Last ist die Mortalität nicht beeinflusst......71 6.2.6 Die Abwesenheit von CXCL5 beeinflusst neben Neutrophilen auch alveoläre beeinflusst keine weiteren inflammatorischen Mediatoren 6.2.7 CXCL5 in 6.2.8 Im Zuge einer Serotyp 2-Infektion schützt die Abwesenheit von CXCL5 nicht vor Die Abwesenheit von CXCL5 vermindert die Schädigung der alveolokapillären 6.2.9 6.3 Einfluss des Chemokins CXCL5 auf Neutrophile-Rekrutierung und Der Lungenschädigung in einem Modell mechanischer Beatmung......76 Mechanische Beatmung induziert die Sekretion von CXC-Chemokinen und 6.3.1 Mechanische zyklische Dehnung induziert die Ausschüttung von CXC-6.3.2 In Abwesenheit von CXCL5 ist die Rekrutierung von Neutrophilen im Zuge der 6.3.3

Frühe, aber nicht späte antibakterielle Therapie verhindert den systemischen

6.1.7

		6.3 Alve	.4 eolai	CXCL5 beeinflusst keine weitere Rekrutierung vor rraum bei einer mechanischen Beatmung	on Immunzellen in den 80
		6.3 Bea	.5 atmu	Die Abwesenheit von CXCL5 ist die Lungenfunkt ng verbessert	ion unter mechanischer 81
		6.3 eine	.6 e erh	Histopathologische Untersuchungen der Lunge ventil nöhte Schädigung der Alveolarwand in Anwesenheit vor	ierter Mäuse weisen auf n CXCL5 hin83
		6.3 Bea	.7 atmu	In Abwesenheit von CXCL5 ist die alveolokapilläre Bai ng geschützt	riere unter mechanischer 85
7		Dis	kuss	ion	
	7. Pi	1 neur	Etal noko	blierung eines Modells der frühzeitigen und später okken-induzierter Pneumonie	n Antibiotikatherapie bei 86
	7. Be	2 ehar	Mög ndlur	gliche Mechanismen hinter dem Therapieversagen eine	er späten antibakteriellen
	7.	3	Die	Rolle von VEGF bei der der Erhöhung der alveolokapill	ären Permeabilität94
	7.	4	Die	alveolokapilläre Barriere in Abhängigkeit von CXCL5	
		7.4	.1	Alveoläre Epithelzellen sind die Hauptquelle von CXCL	5 in der Lunge96
		7.4	.2	CXCL5 ist notwendig für eine vollständige Rekrutierun	g der Neutrophilen98
		7.4	.3	CXCL5-unabhängige Wege der Neutrophilen-Rekrutie	rung99
		7.4	.4	Folgen einer reduzierten Neutrophile-Rekrutierung	100
		7.4 inhi	.5 biert	Möglicher therapeutischer Effekt von CXCL5 und en Neutrophile-Rekrutierung	einer verminderten oder 104
		7.4 von	.6 CX	Mechanismen hinter dem Schutz der alveolokapillärer CL5	Barriere in Abwesenheit 105
8		Lite	ratu	rverzeichnis	
9		Anł	nang		
	9.	1	Tab	ellenverzeichnis	
	9.	2	Abb	oildungsverzeichnis	
	9.	3	Pub	likationen	
	9.	4	Dar	nksagung	

Abkürzungsverzeichnis

а	anti			
alvMs	alveoläre Makrophagen			
AST	Aspartat-Aminotransferase			
BAL	Bronchoalveoläre Lavage			
BALC	BAL Cells, Zellen der bronchoalveolären Lavage			
BALF	BAL Fluid, Nicht-zellulärer Anteil der bronchoalveolären Lavage			
BSA	Bovines Serumalbumin			
CAP	community-acquired pneumonia, ambulant erworbene Pneumonie			
CCL	Ligand mit C-C Motiv			
CCR	Rezeptor eines Liganden mit C-C Motiv			
CD	Cluster of Differentiation, System zur Bezeichnung von			
	Differenzierungsantigenen			
CFU	colony forming units, Kolonie-bildende Einheiten			
Cre	Cre-Rekombinase			
CXCL	Ligand mit C-X-C Motiv			
CXCR	Rezeptor eines Liganden mit C-X-C Motiv			
DCs	Dendritische Zellen			
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure			
E. coli	Escherichia coli			
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay, enzymgekoppelter			
	Immunadsorptionstest			
Eos	Eosinophile			
EpiCs	Epithelzellen			
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie			
FCS	fetal calf serum, Fetales Kälberserum			
G	Gauge			
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor, Granulozyten-Kolonie-			
	stimulierender Faktor			
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-			
	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor			
H & E	Hematoxylin & Eosin			
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution			
HMGB1	high mobility group box 1			
HSA	Humanes Serumalbumin			
HVT	high tidal volume ventilation, Beatmung mit hohem Tidalvolumen			

i.p.	intraperitoneal			
i.v.	intravenös			
IFN	Interferon			
IL	Interleukin			
iMs	inflammatorische Monozyten / Makrophagen			
LPS	Lipopolysaccharide			
LVT	high tidal volume ventilation, Beatmung mit niedrigem Tidalvolumen			
M. tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis			
MACS	Magnetic cell separation, Magnetische Zellseparation			
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor, Monozyten-Kolonien-			
	stimulierender Faktor			
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex			
MOI	multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion			
MSA	Murines Serumalbumin			
MyD88	myeloid differentiation factor 88			
n.n.	nicht nachweisbar			
NETs	neutrophil extracellular traps, neutrophile extrazelluläre Fallen			
NF-κB	nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells			
NO	reaktive Stickstoffspezies			
NV	Nicht ventiliert			
OD	optische Dichte			
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa			
p.i.	post infectionem, nach der Infektion			
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns, Pathogen-assoziierte			
	molekulare Muster			
PAS	periodic acid-Schiff, Perjodsäure-Schiff Reaktion			
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung			
PIP	peak inspiratory pressure, inspiratorischer Spitzendruck			
PLY	Pneumolysin			
PMNs	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten			
PRRs	Pattern recognition receptors, Mustererkennungs-Rezeptoren			
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure			
ROS	reaktive Sauerstoffspezies			
RT	Raumtemperatur			
S. pn.	Streptococcus pneumoniae			
siRNA	Small interfering RNA, kleine eingreifende RNA			
ssRNA	single-stranded ribonucleic acid, Einzelsträngige RNA			

ST	Serotyp					
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3					
tACE	Angiotensi	n-konvertierei	ndes Enzy	m		
TIR	Toll/Interle	ukin-1 Rezept	tor			
TIRAP	IRAP TIR domain-containing adapter protein, Adapterprotein, welche					welches eine
	TIR Domär	ne aufweist				
TLR	Toll-like Re	eceptor, toll-äl	nnlicher R	ezeptor		
TNF	Tumornekr	osefaktor				
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-β,</i> TIRAP, welches IFN-β induzieren kann				RAP, welches	
ü.N.	über Nacht					
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin, vaskuläres endotheliales Cadherin					
VEGF	Vascular	Endothelial	Growth	Factor,	vaskulärer	endothelialer
	Wachstumsfaktor					
VE-PTP	vascular	endothelial	protein	tyrosine	phosphatase	, vaskuläre
	endotheliale Protein Tyrosin Phosphatase					
VILI ventilator-induced lung injury, Vent			Ventilation	ns-assoziierte		
	Lungensch	iädigung				
WT	Wildtyp					

1 Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie ist mit ihrer hohen Inzidenz und Mortalität eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*) ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Eine wichtige Ursache für die hohe Sterblichkeit trotz wirksamer antibiotischer Therapie stellt die umgreifende Schädigung eines inadäquat aktivierten Immunsystems während der Infektion dar. Vor allem neutrophile Granulozyten (PMNs) können im Zuge der Pathogen-Eliminierung das Lungengewebe und die alveolokapilläre Barriere schädigen, weshalb es zur Entstehung von Lungenödemen kommen kann. Ferner kann sich die Inflammation in die Peripherie ausbreiten, wodurch sich eine lokale Infektion der unteren Atemwege oftmals zu einer lebensbedrohlichen Sepsis entwickelt. Die detaillierten Mechanismen hinter dem Therapieversagen trotz antibakterieller Behandlung sind bisher unbekannt, könnten aber wertvolle Ansatzpunkte für neue adjuvante Therapien darstellen. In dieser Doktorarbeit wurde deshalb der Fokus auf die Hyperinflammation gelegt, welche trotz Eliminierung der Erreger unter antibiotischer Therapie auftritt.

Dazu wurden *S. pn.*-infizierte Mäuse, die eine Pneumonie ausgebildet hatten, beginnend früh (24 h p.i.) oder spät (48 h p.i.) nach der Infektion in 12 h-Intervallen mit Ampicillin therapiert. *S. pn*-infizierte Kontrollgruppen wurden analog mit Lösungsmittel behandelt. Detaillierte Analysen von Immunantwort und klinischen Parametern zu mehreren Zeitpunkten ermöglichten die Verfolgung des Infektionsverlaufs während der gesamten Therapie. Nach beiden Behandlungsstarts verliefen Pathogen-Eliminierung und Reduktion der lokalen inflammatorischen Mediatoren zeitlich analog ab. Dennoch konnte nur eine frühe Therapie infizierte Tiere retten. Faktoren, die mit dem Therapieversagen assoziiert werden konnten, waren eine erhöhte vaskuläre Permeabilität sowie das Auftreten einer systemischen Inflammation. Diese Prozesse konnten durch eine frühe Therapie verhindert werden, während eine späte Behandlung bereits etablierte Schädigungen weder verringern, noch eine systemische Inflammation eindämmen konnte.

Weiterhin wurde der Einfluss des PMN-rekrutierenden Chemokins CXCL5 untersucht. *In vivo* und *in vitro* zeigte sich eine vermehrte CXCL5-Sekretion sowohl nach *S. pn.*-Infektion als auch im Anschluss an invasive Beatmung bzw. zyklischer Dehnung von Epithelzellen. Alveoläre Epithelzellen konnten als Hauptquelle des Chemokins identifiziert werden. *In vivo* führte eine Deletion von *Cxcl5* zu einer reduzierten PMN-Migration in den Alveolarraum, was im Infektionsmodell mit einer Erhöhung der bakteriellen Last einherging. In beiden Modellen schützte die Abwesenheit von CXCL5 vor einer Schädigung der alveolokapilläre Barriere.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion von PMNs, die Stärkung der alveolokapillären Barriere oder eine Verminderung der systemischen Inflammation Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer adjuvanter Therapien sein könnten. In Verbindung mit einer adäquaten antibiotischen Therapie könnte so zukünftig eine Herabsetzung der Mortalität erreicht werden.

2 Summary

Community-acquired pneumonia, due to its high incidence and morbidity rates, is one of the most clinically relevant infectious diseases worldwide. While the reasoning behind poor survival rates are complex, one major driving factor seems to be the overwhelming activation of the host immune system during infection with *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*), the main pathogen of pneumonia. Especially polymorphonuclear neutrophils (PMNs) may cause damage to the lung and alveolar-capillary barrier during tissue infiltration and exertion of effector functions. Thus, common consequences are alveolar flooding. Further, the inflammation can spread into the circulation, whereby a local infection of the lower respiratory tract can develop into life-threatening sepsis. The underlying mechanisms behind therapeutic failure despite appropriate antibiotic treatment are still unknown, albeit important for the development of new adjunctive therapies. Therefore, the focus of this doctoral thesis was to examine host-specific hyperinflammation, which occurs despite pathogen-elimination.

S. pn.-infected mice were treated every 12 h with Ampicillin, starting early (24 h p.i.) and late (48 h p.i.) following infection. Respective *S. pn.*-infected control groups were treated with solvent. At both starting points, infected animals showed characteristics of pneumonia together with bacteremia. Detailed analysis of local and systemic inflammatory processes and pneumonia symptoms at multiple experimental time points allowed for comprehensive monitoring of the course of infection during therapy. Following both therapeutic starting points, the degree of bacterial elimination accompanied by reduction of local inflammatory mediators were comparatively effective. However, only early antibiotic therapy commencement rescued *S. pn.*-infected mice. The main events causative for therapy failure are believed to be the breakdown of the alveolar-capillary barrier and development of a systemic inflammation. These processes were prevented by early therapy only while late therapy neither reversed established barrier damage nor reduced inflammatory mediators in the blood.

Furthermore, the impact of the PMN-attracting chemokine CXCL5 was examined in models of murine pneumonia and mechanical ventilation. *S. pn.*-infection and mechanical ventilation evoked increased CXCL5 secretion *in vivo*, while *in vitro* experiments helped confirm epithelial cells as main source of CXCL5 in both models. *Cxcl5*-deficiency caused a strong decrease in PMN-migration into the alveolar space, accompanied by elevated bacterial burden in the *S. pn.*-infection model. However, in mice lacking CXCL5, the alveolar-capillary barrier was shown to be protected compared to the respective wild-type mice.

A reduction of PMN infiltration, intactness of the alveolar-capillary barrier and diminishing of systemic inflammation were hereby indicated to be crucial for the development of new adjunctive therapies. With the aid of ongoing research accompanied by appropriate antibiotic regimen, these strategies may help to decrease the mortality of community-acquired pneumonia.

3 Einleitung

3.1 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia* (CAP)) gehört aufgrund ihrer hohen Morbidität und Mortalität zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Nach Informationen der Weltgesundheitsorganisation war im Jahr 2015 eine Infektion der unteren Atemwege weltweit die dritthäufigste Todesursache [1]. Dabei war allein die Pneumonie für 16 % aller Todesfälle von Kindern unter fünf Jahren verantwortlich [2].

In Deutschland sind laut Angaben des statistischen Bundesamtes im Jahr 2015 19.368 Personen an einer Pneumonie verstorben, womit die Pneumonie an achter Stelle der häufigsten Todesursachen rangierte [3]. Die Inzidenz der Pneumonie lag hier in den Jahren 2010 / 2011 bei 9,7 von 1.000 Einwohnern pro Jahr, wovon 46,3 % hospitalisiert werden mussten [4]. Die Sterblichkeitsrate unterscheidet sich abhängig von der nach Art der Lungenentzündung: Nicht-invasive Formen, bei denen es zu keiner Ausbreitung der Infektionserreger ins Blut des Patienten kam, verlaufen nachweislich milder und werden mit einer hohen Überlebenschance assoziiert [5]. Allerdings kann sich aus einer nicht-invasiven Form eine invasive Pneumonie entwickeln, wenn die Erreger aus dem Respirationstrakt in das Blutsystem übertreten. Dies erfordert oft eine Hospitalisierung des Patienten und steht mit einem erhöhten Risiko für Atemversagen oder einem Sepsis-assoziierten Organversagen in Verbindung [6]. Im Jahre 1937, bevor die flächendeckende Behandlung mit Antibiotika eingeführt wurde, lag die Sterblichkeit der Pneumonie zwischen 8 und 100 %, wobei vor allem eine invasive Form und zunehmendes Alter des Patienten mit einer ansteigenden Mortalität in Verbindung gebracht werden konnten (siehe Abbildung 1) [7].

Auch heute müssen noch 21 % der hospitalisierten CAP-Patienten in den USA auf der Intensivstation behandelt werden, von denen 26 % eine mechanische Beatmung benötigen ([8], siehe 3.3.1). Daten des AQUA-Instituts bestätigen, dass zunehmendes Alter der Patienten mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergeht: Während die Mortalität hospitalisierter Patienten zwischen 20 und 29 Jahren bei lediglich 1,2 % liegt, steigt sie auf 12,3 % in der Gruppe der 70 bis 79-Jährigen. Patienten, die älter als 90 Jahre sind, haben die höchste Sterblichkeitsrate mit 22,5 % [9]. Obwohl es mit der Einführung der Antibiotikatherapie zu einem starken Rückgang der Mortalität gekommen ist, liegt diese in Deutschland immer noch bei 12 - 13 % [5, 6].



3.2 Streptococcus pneumoniae

Obwohl die ambulant erworbene Pneumonie von einer Vielzahl von Infektionserregern ausgelöst werden kann, sind meist bakterielle Pathogene für eine Erkrankung verantwortlich. Am häufigsten wird dabei das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pn.*) als kausales Pathogen identifiziert [10]. *S. pn.* wurde 1881 parallel von Louis Pasteur und Georg Miller Sternberg isoliert, kultiviert und beschrieben. Albert Fränkel arbeitete von 1884 bis 1886 an dem Nachweis, dass dieses Bakterium der Erreger der humanen Pneumonie ist, was 1886 von Anton Weichselbaum in Wien bestätigt werden konnte. Auch in Deutschland findet sich bei über 40 % der Patienten, die an einer bakteriellen Pneumonie erkrankt sind, *S. pn.* als nachweisbarer Erreger [11]. *S. pn.*, auch als "Pneumokokkus" bezeichnet, kolonialisiert den Nasopharynx von Kindern (53 %) und Erwachsenen (4 %), von wo sich das Bakterium in die unteren Atemwege oder ins Blutsystem ausbreiten kann [12]. Es konnte gezeigt werden, dass eine vorherige Kolonialisierung des Nasopharynx mit diesen Bakterien die Voraussetzung für eine spätere Erkrankung ist [13].

Anhand des Aufbaus der Polysaccharidhülle (Kapsel) lassen sich innerhalb der Art der Pneumokokken über 90 verschiedene Serotypen unterscheiden. Diese Kapsel-Saccharide zählen zu den potentesten Virulenzfaktoren, da sie das Bakterium umhüllen und vor einer Phagozytose schützen können [14]. Aufgrund der unterschiedlichen Strukturen der Hülle unterscheidet sich je nach Serotyp die Immunantwort des Wirtes auf die Infektion [15]. Auch die Mortalität variiert zwischen den verschiedenen Serotypen. Während beispielsweise eine nicht antibiotisch behandelte invasive Infektion mit Serotyp 2-Pneumokokken altersabhängig zu einer Sterblichkeit zwischen 50 % und 89 % führt (Abbildung 2 A), haben Patienten aller Altersgruppen bei einer unbehandelten Serotyp 3-Bakteriämie eine Mortalität von 96 bis 100 %

(Abbildung 2 B). Basierend auf den Polysacchariden der verschiedenen Kapsel-Typen wurden Impfungen gegen die 23 bzw. 13 am häufigsten nachgewiesenen Serotypen entwickelt [16]. Eine Immunisierung schützt vor einer pulmonalen und systemischen Infektion und beugt der Besiedlung des Nasopharynx und der damit verbundenen Verbreitung in der Gesellschaft vor.



3.3 Therapie einer Lungenentzündung

In den letzten Jahren wurden diverse Studien und Übersichtsarbeiten veröffentlicht, die die Lungenentzündung als Notfall beschreiben und die Bedeutung einer umgehenden Therapie unterstreichen [5, 17, 18]. Daniel et al. konnten zeigen, dass hospitalisierte Patienten, die innerhalb von vier Stunden eine antibiotische Behandlung erfahren hatten, eine signifikant niedrigere Mortalität zeigten als diejenigen, die später therapiert worden waren [19]. Auch Phua et al. beschrieben einen Zusammenhang zwischen einer frühen und aggressiven medikamentösen Betreuung der Patienten und einer verminderten Sterblichkeitsrate [20]. Bei bakteriellen Pneumonien wird in erster Linie mit antibiotischen Substanzen therapiert, um eine schnelle Eliminierung der Pathogene zu ermöglichen. Die Wahl und Konzentration des Antibiotikums richtet sich dabei nach der Schwere der Infektion, möglichen Nebenerkrankungen und dem Alter des Patienten. Des Weiteren werden unkomplizierte Lungenentzündungen, die keiner Hospitalisierung bedürfen, meist oral therapiert, während bei schweren Verläufen intravenös behandelt wird. Das Mittel der Wahl sind dabei Aminopenicillinpräparate, auch als β-Laktame bekannt [21]. Dabei handelt es sich um Antibiotika, bei denen eine Aminogruppe an den Benzylrest des Penicillins angefügt wurde, wodurch das Wirkspektrum dieser Therapeutika erweitert wird. Zur Gruppe der Aminopenicilline gehören beispielsweise Ampicillin und Amoxicillin. Diese Antibiotika sind bakteriolytisch und greifen bei der Teilung der Bakterien ein, indem sie die Ausbildung einer

neuen Mureinschicht durch die Blockierung des Enzyms D-Alanin-Transpeptidase inhibieren [22]. Bei mittelgradigen bis schweren Verläufen oder Penicillin-Resistenzen werden häufig zusätzlich Beta-Laktamase-Inhibitoren eingesetzt. Diese Präparate verhindern, dass das bakterieneigene Enzym Beta-Laktamase das molekulare Grundgerüst des Penicillins auflöst und somit die Wirkung des Antibiotikums hemmt. Bei schweren Verläufen wird empfohlen, zusätzlich zum β-Laktam mit einem Makrolid zu behandeln [21]. Diese Antibiotikagruppe hat neben ihrer bakteriostatischen Wirkung auch einen immunsupprimierenden Effekt [23, 24], der bei Patienten mit einer inadäguat aktivierten Immunreaktion (Hyperinflammation) oftmals hilfreich ist. Um eine zu unkontrollierte und damit schädigende Immunantwort einzudämmen, wurde in den letzten Jahren an weiteren adjuvanten Therapiemöglichkeiten geforscht. So wurde in einigen klinischen Studien an Patienten mit schwerer Pneumonie die Behandlung mit Kortikosteroiden, in der Nebenniere gebildeten Steroidhormonen, untersucht und mit einer niedrigeren Mortalität, einem geringeren Risiko für mechanische Beatmung (siehe 3.3.1) und einem verkürzten Krankenhausaufenthalt in Verbindung gebracht [25, 26]. Bei Patienten mit leichten bis mittelgradigen Pneumonien konnte dieser Effekt allerdings nicht beobachtet werden, weshalb die Verwendung von Kortikosteroiden sich nicht als adjuvante Therapie, die bei allen Patienten eingesetzt wird, durchsetzen konnte. Auch auf dem Schutz der alveolokapillären Barriere (siehe 3.4) liegt ein Fokus der aktuellen Forschung. Beispielsweise wird dem körpereigenen Peptid Adrenomedullin eine protektive Funktion zugeschrieben, indem es die zellulären Verbindungen stärkt und somit der Bildung inter-endothelialer Spalten entgegenwirkt [27-29]. In einigen Studien wurde auch eine immunmodulatorische Wirkung von Adrenomedullin beschrieben [29, 30]. Andere Studien konnten diesen Effekt jedoch nicht reproduzieren [31, 32]. Bisher wurden mit Adrenomedullin noch keine klinischen Studien an Pneumonie-Patienten durchgeführt, weshalb eine Aussage über die Wirksamkeit im humanen System zu diesem Zeitpunkt noch nicht getroffen werden kann.

3.3.1 Mechanische Beatmung und die beatmungsassoziierte Lungenschädigung

Eine weitere Behandlung, die bei vielen Patienten mit schwerer CAP und damit einhergehender respiratorischer Insuffizienz eingesetzt wird, ist die invasive mechanische Beatmung [33, 34]. Allerdings lässt sich beobachten, dass mit Einsatz einer mechanischen Beatmung auch die Sterblichkeitsrate der Patienten ansteigt [35, 36]. Diese gesteigerte Mortalität kann mit einer Schädigung des Lungengewebes in Verbindung gebracht werden, die als *ventilator-induced lung injury* (VILI) bezeichnet wird. Aus diesem Grund wird heutzutage nur mit einem Tidalvolumen von 6 mg/kg statt 10 – 15 mg/kg, einem Plateaudruck von unter 30 cmH₂O und mit einem positiven endexspiratorischen Druck beatmet, um eine mechanische Schädigung des Lungengewebes zu vermeiden. Allein durch diese Maßnahmen konnte die Mortalität von Patienten mit einer akuten Lungenschädigung um 22 % gesenkt werden [37]. Die Grundlage dieser Untersuchung war, dass der starke mechanische Stimulus im Zuge der Beatmung beim umliegenden Gewebe eine Umwandlung des Signals, verbunden mit einer Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren bewirkt – ein Vorgang, der Mechanotransduktion genannt wird [38-40]. Obwohl durch die Vermeidung hoher Tidalvolumina VILI reduziert wird, kann es doch nicht komplett vermieden werden. So sorgt auch eine protektive Ventilationsstrategie für einen Anstieg inflammatorischer Mediatoren und einen Einstrom von Neutrophilen (siehe 3.5.4). Auch ein systemischer Anstieg der Zytokinlevel, eine Schädigung der alveolokapillären Barriere (siehe 3.4) und die Entwicklung von Lungenödemen kann im Zusammenhang mit VILI beobachtet werden [41-43]. Häufig tritt bei Patienten, die eine mechanische Beatmung erfahren, eine Schädigung sekundärer Organe, verbunden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer Sepsis auf [32, 44, 45]. Vor allem bereits geschädigtes Lungengewebe im Zusammenhang mit einer Sepsis oder Pneumonie ist besonders gefährdet, VILI zu entwickeln [46, 47].

3.4 Die alveolokapilläre Barriere

Im Zuge einer Pneumonie kann sich auch unabhängig von einer mechanischen Beatmung eine lokale Infektion zu einer systemischen Inflammation entwickeln. Grundlage dafür ist einerseits der aktive Übertritt der Bakterien in das Blutsystem des Wirts, andererseits eine Schädigung der Barriere, die die Alveolen von den Kapillaren der Lunge trennt. Physiologisch ermöglicht diese mechanische Barriere einen effizienten Gasaustausch und trennt das Lungen- und Luftkompartiment vom Blut- bzw. Flüssigkeitskompartiment. Zellulär setzt sich die alveolokapilläre Barriere aus Epithelzellen der Lungen und Endothelzellen der Kapillare zusammen. Zwischen diesen Zellschichten befindet sich eine Basalmembran und interstitielles Gewebe, das von einer alveolären Basalmembran flankiert wird (Abbildung 3). Dieses Interstitium hat die Aufgabe, bei der Bildung eines pulmonalen Ödems die entstehende Flüssigkeit zu sammeln. Dadurch bleibt die freiliegende Seite der Barriere trocken und es kann weiterhin ein ungehinderter Gasaustausch erfolgen [48]. Die Endothelzellen auf der vaskulären Seite der Barriere kontrollieren die Passage von zirkulierenden Zellen und Proteinen in das angrenzende Gewebe.

Diese semipermeable Barriere sorgt dadurch für den Aufbau von osmotisch wirksamen Protein-Gradienten, die für die Regulierung der Gewebsflüssigkeit essentiell ist.

Die alveolokapilläre Barriere ist auch von immunologischer Bedeutung, da durch sie das unkontrollierte Übertreten von Pathogenen oder Immunzellen ins Blutsystem verhindert wird. [49, 50]. Des Weiteren wird die Exsudation von Wasser oder wasserlöslichen Bestandteilen von den Kapillaren in die Alveolen verhindert und der Abtransport von Flüssigkeiten aus dem Alveolarraum von den Zellen der Barriere gefördert.



3.4.1 Das Endothel

Die endotheliale Permeabilität wird durch zwei Transport-Mechanismen ermöglicht: Gelöste Stoffe oder Zellen können einerseits auf direktem Weg durch die Zelle hindurch (transzellulär), andererseits zwischen den Zellen entlang (parazellulär) befördert werden. Die transzelluläre Route erfordert entweder Poren oder ein komplexes System aus Vesikeln, die zu Kanälen fusionieren können und so den Transport von Zellen oder Molekülen ermöglichen [51, 52]. Im Gegensatz dazu wird der parazelluläre Weg durch koordiniertes Öffnen und Schließen der Zell-Zell-Verbindungen zwischen den einzelnen Endothelzellen ermöglicht. Diese Funktion verläuft streng reguliert, um die endotheliale Integrität zu bewahren [53, 54]. Biophysikalische Prozesse (wie eine Dehnung des Gewebes) aber auch diverse Moleküle, zum Beispiel Histamin, Thrombin oder vascular endothelial growth factor (VEGF) können zu einer reversiblen Bildung parazellulärer Spalten führen [55, 56], die durch kontraktile Mechanismen des Actin-Myosin-Komplexes entstehen [57]. Diese zeitweilige Permeabilität ermöglicht einen schnellen Übertritt von Nährstoffen, verhilft Leukozyten zum Ort der Entzündung zu migrieren und führt zur Akkumulierung von Fibrinogen an den Blutgefäßen für eine verbesserte Gewebe-Reparatur. Histamin, VEGF und Thrombin haben einen unmittelbaren Effekt auf die Permeabilität [55, 58], wohingegen inflammatorische Zytokine längere Zeit benötigen, um eine Erhöhung der Permeabilität herbei zu führen. Dieser Effekt ist aber langlebiger und dauert bis zu 48 h an [59].

3.4.2 Das alveoläre Epithel

Das alveoläre Epithel dient als erste mechanische Barriere der unteren Atemwege gegen Pathogene und kleidet alle der bis zu 400 Millionen Alveolen der Lunge aus, was einer Fläche von 220.000 µm² entspricht [60]. Man kann zwei alveoläre Epithelzellen-Arten unterscheiden: Jede Alveole ist durchschnittlich von 40 Typ I Epithelzellen und 77 Typ II Epithelzellen ausgekleidet, allerdings machen Typ I Zellen bis zu 95 % der zellulären Oberfläche aus [60]. Über ihre großflächige Struktur sorgen sie für den Gasaustausch zwischen Epithel und Kapillaren. In Abbildung 4 ist die humane alveoläre Oberfläche dargestellt. In Gelb koloriert ist in der Abbildung eine Typ I Epithelzelle zu erkennen, die über einem Netz von Kapillaren liegt und deutlich großflächiger ist als die daneben liegenden Typ II Epithelzellen. Letztere sind durch einen Ring an Mikrovilli gekennzeichnet, Strukturen, die der Oberflächenvergrößerung der Zelle dienen. Die kubisch geformten Typ II Epithelzellen sind für die Sekretion von Surfactant zuständig [61], einer oberflächenaktiven Substanz, die für eine Herabsetzung der Oberflächenspannung zwischen Luft und Alveole sorgt und so das Zusammenfallen der Lungen verhindert [62]. Typ II Epithelzellen spielen auch eine große Rolle bei Reparaturprozessen in der Lunge, da sich aus ihnen neue Typ I Epithelzellen differenzieren können [63, 64].

Neben ihrer Funktion als mechanische Barriere bei Infektionen haben Epithelzellen auch eine tragende Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, indem sie Zytokine und Chemokine (siehe 3.6) sekretieren [65-67]. Der Verbund der Epithelzellen wird, wie auch bei Endothelzellen, durch tight- und adherens junctions vernetzt [68-71]. Durch diese engen Verbindungen wird verhindert, dass Substanzen oder Zellen unkontrolliert die alveolokapilläre Barriere übertreten [72]. Diese inter-endothelialen und -epithelialen Verbindungen öffnen sich durch die Remodellierung von Molekülen wie VE-Cadherin (vascular endothelial cadherin) [73]. Für eine optimale VE-Cadherin Funktion muss das Cadherin mit VE-PTP (vascular endothelial protein tyrosine phosphatase) assoziiert sein, einem Protein der Endothel-Membran. Die Separation von VE-PTP und VE-Cadherin kann beispielsweise durch die Bindung von Leukozyten oder durch eine Stimulation mit VEGF initiiert werden [74]. Auch während einer Infektion mit S. pn kommt es aufgrund von Dissoziationen der tight- und adherens-junctions zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität. Die erste Phase, die vor allem der Rekrutierung von Leukozyten dient, ist reversibel. Allerdings folgen auf diese initiale Phase oft irreversible Schädigungsprozesse am Epithel, die eine folgenschwere Beeinträchtigung der alveolokapillären Barriere mit sich bringen [75]. Diese Prozesse sind einerseits auf Pathogen-assoziierte Faktoren zurück zu führen, können aber auch durch eine unkontrollierte Immunantwort des Wirts herbeigeführt werden. Diese Schädigung der Barriere ist vor allem durch die Flutung der Alveolen mit proteinreicher Ödem-Flüssigkeit charakterisiert [76]. Trotz effektiver antibiotischer Therapie (siehe 3.3) kommt es bei CAP-Patienten häufig zu

einer akuten Schädigung der alveolokapillären Barriere, dem Übertritt proteinreicher Flüssigkeit in den Alveolarbereich, Ödembildung und schlussendlich zu einer mitunter lebensbedrohlichen Lungenschädigung [77].



Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der alveolären Oberfläche einer humanen Lunge.

Zu sehen sind Kapillaren unter Typ I und Typ II Epithelzellen (Ep1 bzw. Ep2). Die Pfeile markieren die gelb gefärbte Typ I Epithelzelle. Zwei Typ II Epithelzellen befinden sich in den Nischen der Kapillaren und sind gekennzeichnet durch Mikrovilli. Entlang der Zellen sind interzelluläre Zell-Zell-Verbindungen zu sehen. Reprinted with permission of the American Thoracic Society. Copyright

©2018 American Thoracic Society. Weibel, 2015: On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. Am J Respir Crit Care Med 2015, 191(5):504-513. [78]

3.5 Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Wie gravierend sich eine Pneumonie nach einer Infektion mit *S. pn.* entwickelt, ist von zwei Prozessen abhängig: der Resistenz des Immunsystems gegen den Erreger und der Widerstandsfähigkeit der Gewebe des Wirts gegenüber Pathogen und wirtseigenen Faktoren [79]. Eine Resistenz wird über die Reduktion der Pathogene bewirkt, bei Patienten in ärztlicher Betreuung kann dies beispielsweise durch eine Antibiotika-Therapie geschehen. Diese Aufgabe können auch die weißen Blutkörperchen (Leukozyten) erfüllen, Zellen des Immunsystems, die im Zuge der Blutbildung (Hämatopoese) im Knochenmark gebildet werden (siehe Abbildung 5). Dort bilden sich aus einer pluripotenten Vorläuferzelle zwei Stammzellpopulationen: die myeloischen Vorläuferzellen, aus denen sich im Zuge der Hämatopoese die roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten,

siehe 3.5.4.3), aber auch Leukozyten entwickeln. B- und T-Lymphozyten entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen. In welche Richtung sich die entsprechenden Vorläuferzellen entwickeln, wird von den umgebenden Zytokinen bestimmt, die beispielsweise von Endothelzellen und Makrophagen sekretiert werden. So bewirkt die Anwesenheit des *Granulocyte-Colony Stimulating Factors*, (G-CSF) die Entwicklung von Neutrophilen (siehe 3.5.4), während der *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) eine Differenzierung zu Monozyten (siehe 3.5.2) begünstigt.



Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Entwicklung von Blutzellen aus Stammzellen im Knochenmark.

Aus einer pluripotenten Stammzelle entwickeln sich zwei Stammzelllinien (lymphatische und myeloische Vorläuferzellen). Durch eine Vielzahl an Zytokinen werden die weiteren Entwicklungsschritte bestimmt. Modifiziert nach [80]. Abkürzungen: IL= Interleukin, G-CSF= *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, M-CSF= *Macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF= *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

3.5.1 <u>Alveoläre Makrophagen</u>

Die ersten Zellen, auf die eindringende Pathogene in der Lunge treffen, sind Epithelzellen und alveoläre Makrophagen (alvMs). Obwohl sie unter basalen Bedingungen etwa 90-95 % der zellulären Bestandteile des Alveolarraums ausmachen, befindet sich nur in jeder dritten Alveole ein alveolärer Makrophage [81].

Durch ihre phagozytotischen Eigenschaften können Makrophagen für die Abtötung erster eindringender Pneumokokken sorgen [82]. Bei einer Pneumonie scheint aber die wichtigere Aufgabe der alvMs in der Beseitigung zellulärer Überreste körpereigener Zellen, wie apoptotischer Neutrophiler (siehe 3.5.4) zu liegen [83, 84]. Durch diese Phagozytose, dem Umfließen und Verdauen von Partikeln oder Zellen, kann eine Schädigung des umliegenden Gewebes durch teilweise toxische Zellbestandteile vermindert werden.

Alveoläre Makrophagen entstehen während der Embryogenese aus fetalen Monozyten [85]. Die Entwicklung von alvMs bei Erwachsenen wird seit Jahrzehnten in der Wissenschaft diskutiert. Während einige Ergebnisse auf zirkulierende Monozyten aus dem Knochenmark als Vorläufer für die residenten Makrophagen schließen lassen [86, 87], legen weitere Studien nahe, dass sich alvMs selbst erneuern und Knochenmark-Zellen keinen Einfluss auf die Entwicklung neuer AlvMs haben [85, 88-90].

Alveoläre Makrophagen, genauso wie die die Alveole auskleidenden Epithelzellen, werden durch *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) aktiviert, was zu einer Stimulation des Immunsystems über die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 und IL-6 und anderen inflammatorischen Mediatoren führt [91-93].

Alveoläre Makrophagen befinden sich über *gap junctions* in engem Kontakt mit den sie umgebenden Epithelzellen. Eine Stimulation der Makrophagen über *toll-like* Rezeptoren (TLRs) führt zu zyklischen und synchronisierten Ausschüttungen von in Makrophagen und Epithelzellen gespeicherten Calcium-Ionen. Dadurch wird eine schnelle und weitreichende Weiterleitung des Signals über viele Alveolen hinweg zu anderen alvMs ermöglicht [81].

3.5.2 Monozyten

Monozyten sind mononukleare myeloide Zellen, entwickeln sich also aus myeloischen Stammzellen im Knochenmark. Sie zirkulieren in Blut und Knochenmark sowie in der Milz. Monozyten können anhand der Expression des C-C-Chemokin Rezeptors Typ 2 (CCR2) und des Oberflächenmarkers Ly6C unterschieden werden [94]. Die CCR2^{low} und Ly6C^{low} Monozyten werden in nicht-infizierte Gewebe rekrutiert, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren können. CCR2⁺ und Ly6C^{high} Monozyten werden auch als inflammatorische Monozyten oder inflammatorische Makrophagen (iMs) bezeichnet, da sie infolge einer Infektion zum Ort der Entzündung migrieren.

Die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten / Makrophagen bezeichnet wird durch CCR2 und seinen Liganden CCL2 koordiniert [95, 96]. IMs werden im Zuge einer Inflammation mit Hilfe eines Chemokin-Gradienten aus dem Blut zum Entzündungsort rekrutiert, wo sie eine wichtige Rolle in der Bekämpfung eingedrungener Pathogene spielen. Experimentell konnte gezeigt werden, dass vermehrte Rekrutierung von Monozyten nach einer *S. pn.* Infektion durch eine CCL2 Überexpression in alveolären Epithelzellen zu einer Verringerung der bakteriellen Last und einer niedrigeren Mortalität führt. Allerdings entwickelten diese Versuchstiere eine Entzündung der Bronchiolen, was auch auf eine starke gewebeschädigende Wirkung der damit im Zusammenhang stehenden inflammatorischen Prozesse schließen lässt [96]. Rekrutierte Monozyten produzieren inflammatorische Mediatoren wir VEGF, Tumornekrosefaktor (TNF) und reaktive Stickstoffspezies (NO) [97-99], phagozytieren aber auch apoptotische Zellen oder toxische Moleküle [100]. Des Weiteren können sie zu Subtypen von Dendritischen Zellen differenzieren [101].

3.5.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind eine heterogene Zellpopulation, entwickeln sich teilweise aus Monozyten und haben als phagozytierende Zellen ebenfalls die Aufgabe der Beseitigung von körperfremden Materialien, abgestorbenen Zellen und Pathogenen. Anschließend werden, z. B. bei bakteriellen Infektionen, Moleküle der phagozytierten Bakterien zu Peptiden prozessiert, auf den Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex*, MHCII) geladen und anschließend auf der Oberfläche der DCs präsentiert [102]. Nachdem die aktivierten DCs in die drainierenden Lymphknoten gewandert sind, präsentieren sie dort spezifischen T Zellen ihr Antigen und initiieren somit die adaptive Immunantwort [103]. DCs fungieren somit als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität.

3.5.4 <u>Neutrophile Granulozyten</u>

Polymorphkernige neutrophile Leukozyten (PMNs) sind die häufigsten Vertreter der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) in Säugetieren. Sie entwickeln sich aus Stammzellen im Knochenmark, aus dem sie ins Blutsystem gelangen und dort zirkulieren, um schnell zum Ort einer Infektion migrieren zu können.

3.5.4.1 Die Migration von Neutrophilen zur Entzündungsstelle

PMNs werden, wie alle Leukozyten mittels ihrer Oberflächenrezeptoren zur Entzündung gelockt, indem sie auf Stimuli wie Chemokine und Komplement-Komponenten reagieren und einem chemotaktischen Gradienten folgen. In der Maus dient vor allem der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2, siehe 3.6.3) der Erkennung von rekrutierenden Chemokinen. Nach der Bindung eines Liganden werden Integrine des Neutrophilen aktiviert, wodurch sich das Zytoskelett verändert. Beim Übertritt der Neutrophilen vom Blutsystem in die Alveole müssen sie Endothel und Epithel durchqueren. Dafür erfolgt zunächst über die Interaktion von Selektinen und Integrinen die Adhäsion der Neutrophilen an das vaskuläre Endothel [104] und anschließend eine trans- oder parazelluläre Migration der PMNs durch das Endothel (siehe Abbildung 6).

Nach der darauffolgenden Wanderung durch das interstitielle Gewebe müssen die Neutrophilen das Epithel überqueren. Dies erfolgt in den meisten Schritten analog zu der Migration durch das Endothel, allerdings haben die Neutrophilen durch diese vorherigen Aktionen und den Kontakt zu den Chemokinen bereits eine erste Aktivierung (*Priming*) erfahren [105, 106]. Für die Migration adhärieren die PMNs an der basolateralen Oberfläche der Epithelzellen, wobei hier im Gegensatz zur transendothelialen Überquerung keine Selektine am Adhäsionsprozess beteiligt sind. Es wurde lange davon ausgegangen, dass die Überquerung des Epithels nur über die parazelluläre Route erfolgt. Allerdings konnten neuere Studien auch die transzelluläre Migration zeigen [107]. Nach der Migration adhärieren Neutrophile auf der apikalen Seite der Epithelzellen [108]. Dadurch vermeiden sie, weggespült zu werden und können mit der Phagozytose eingedrungener Pathogene beginnen.

Dieser Ablauf der einzelnen Migrationsschritte kann ohne eine Beeinträchtigung der alveolokapillären Barriere erfolgen [109], allerdings scheinen stark aktivierte Neutrophile über die Sekretion zytotoxischer Moleküle das Epithel bei der Durchquerung zu schädigen, indem sie zur Beeinträchtigung der *junction* Proteine sowie zur Induktion von epithelialer Apoptose führen [110-112]. PMNs scheinen mit der Entwicklung einer irreversiblen Barriere-Dysfunktion in Verbindung zu stehen, beispielsweise indem sie und ihre Produkte die parazelluläre Permeabilität erhöhen [113]. Da sie ebenfalls Chemokine und Zytokine sekretieren, sind sie aktiv an der Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen beteiligt (siehe Abbildung 6) [114, 115].

Eine andere Studie zeigte, dass PMNs von einem inflammatorischen Status in einen antiinflammatorischen Status wechseln können, indem sie beispielsweise Lipide sekretieren, die bei der Resolution der Inflammation helfen [116] (siehe Abbildung 6). Darüber hinaus ist über diesen anti-inflammatorischen Einfluss von Neutrophilen in Entzündungen jedoch wenig bekannt.

3.5.4.2 Phagozytose, Apoptose, NETose

Neutrophile beseitigen körpereigene apoptotische Zellen mittels Phagozytose (siehe 3.5.1, alvMs). Pathogene können zusätzlich mittels reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS; NO) oder über proteolytische Prozesse wie der Generation von *neutrophil extracellular traps* (NETs) bekämpft werden (siehe Abbildung 6). Diese netzartigen Strukturen bestehen aus adhäsiver Neutrophilen-DNA, Histonen und aktiven Proteasen, wodurch sie einen essentiellen Beitrag bei der Bekämpfung diverser Mikroben leisten [117]. Neutrophile haben eine kurze Lebensspanne, von meist nur wenigen Stunden [118], obwohl auch gezeigt werden konnte, dass sie bis zu fünf Tage lang zirkulieren können [119]. PMNs sterben entweder durch unkontrollierte Nekrose und Lyse oder durch programmierten Zelltod (Apoptose), der im Zuge der NETose (NETs Produktion) geschehen kann. Die Apoptose ist stark reguliert und kann

durch intrinsische (mitochondriale) und extrinsische (über Stimuli von außen) Signalwege oder aufgrund von vorheriger Pathogen-Phagozytose initiiert werden [120-122]. Während im Zuge der Nekrose unkontrolliert pro-inflammatorische Moleküle wie beispielsweise HMGB1 (*high mobility group box* 1) ausgeschüttet werden, wird dies im Zuge der Apoptose verhindert, da hierbei die Zellmembran intakt bleibt. Neutrophile verändern während des Sterbeprozesses ihre Oberflächenmarker, um von anderen Zellen (z. B. alvMs, siehe 3.5.1) effektiver gefunden und phagozytiert werden zu können [123]. Das Entfernen von abgestorbenen Zellen ist dabei essentiell für die Resolution einer Entzündung, da sterbende Neutrophile zu einer länger anhaltenden Inflammation und Schädigung des umliegenden Gewebes führen können [124].



3.5.4.3 Neutrophil-Thrombozyt Interaktion

Blutblättchen (Thrombozyten) scheinen eine tragende Rolle bei der durch Neutrophile verursachten Lungenschädigung zu spielen. PMNs und Thrombozyten interagieren im Blutsystem, aber auch am Inflammationsort. Neutrophile formen über das Thrombozyten-Oberflächenprotein P-Selektin Aggregate mit Blutblättchen [126], wodurch sich die Aktivierungsgrade von beiden Zelltypen erhöhen und die inflammatorischen und antibakteriellen Effekte verstärkt werden [127]. Diese Interaktion ist für das Immunsystem von großer Wichtigkeit, beispielsweise indem Thrombozyten die vaskuläre Oberfläche absuchen, Pathogene aufnehmen und darüber Neutrophile stimulieren. Dieser Prozess initiiert eine verstärkte inflammatorische Reaktion der PMNs, was allerdings eine Gewebeschädigung begünstigen kann [128].]. Der Prozess der NETose scheint durch die PMN-Thrombozyten Interaktion verstärkt zu werden, wodurch die Ausbreitung bakterieller Infektionen verringert

werden kann [129]. Es konnte aber ebenfalls gezeigt werden, dass eine Thrombozyten-Depletion eine Säure- oder Transfusions-induzierte Lungenschädigung vermindert [130].

3.6 Chemokine und ihre Rezeptoren

Auf der Oberfläche von Neutrophilen und anderen Immunzellen befinden sich eine Vielzahl von Rezeptoren, die der Wahrnehmung der direkten Umgebung dienen. Damit Zellen des Immunsystems zum Ort der Inflammation rekrutiert werden können, müssen Chemokine erkannt werden. Dies geschieht über spezielle Chemokinrezeptoren. Bei Chemokinen handelt es sich um chemotaktisch wirksame Zytokine, die Zielzellen zu einer gerichteten Bewegung aus dem Blut zum Ort der Inflammation führen (Chemotaxis). Dabei orientieren sich die rekrutierten Zellen entlang eines chemischen Chemokingradienten. Chemokinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die nach Bindung eines Liganden phosphoryliert werden [131]. Dadurch wird ein Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle angeregt, wodurch intrazellulare Signalwege bis zur Aktivierung von Integrinen und einer Veränderung des Zytoskeletts initiiert werden, die notwendig sind für die Chemotaxis [132]. Chemokinrezeptoren werden je nach Art der Liganden in unterschiedliche Subgruppen eingeteilt.

3.6.1 Chemokingruppen

Es sind etwa 50 unterschiedliche Chemokine bekannt, die in vier Chemokingruppen unterteilt werden können. Die Gruppen haben eine stark konservierte Faltung (Tertiärstruktur), unterscheiden sich aber am Amino-Terminus, wo Cysteinreste in verschiedenen Mengen und Positionen vorkommen und ein oder zwei Disulfidbrücken ausbilden können (siehe Abbildung 7). Anhand dieser Cysteine lässt sich zwischen den vier Gruppen unterscheiden. Die Gruppe der C-Chemokine (Abbildung 7 A) trägt nur ein Cystein am Amino-Terminus, welches nur eine Disulfidbrücke ausbildet. Kommen zwei Cysteine direkt hintereinander vor, gehört das Chemokin zu den CC-Chemokinen (Abbildung 7 B). Wenn sich zwischen den beiden Cysteinen eine Aminosäure befindet, wird das Chemokin zur Gruppe der CXC-Chemokine zugeordnet (Abbildung 7 C), bei drei Aminosäuren gehört es den CX₃C-Chemokinen (Abbildung 7 D). Diese letzten drei Gruppen zeichnen sich durch zwei Disulfidbrücken an den Cysteinen aus [133]. Zur Nomenklatur der Chemokine dient die Zugehörigkeit zur Chemokingruppe, verbunden mit einem L (Ligand) und einer fortlaufenden Nummerierung. Im Zuge dieser Arbeit wird ein spezieller Fokus auf Chemokine der CXC-Chemokingruppe gelegt, weshalb auf diese Familie und einen ihrer Rezeptoren in Kapitel 3.6.3 spezieller eingegangen wird.



CC-Chemokine haben zwei aufeinanderfolgende Cysteine. **C**. CXC-Chemokine weisen zwischen den Cysteinen eine Aminosäure (X) auf. **D**. CX₃C-Chemokine weisen drei Aminosäuren zwischen den Cysteinen auf. Die Gruppen der CC-, CXC- sowie CX₃C-Chemokine (**B**-**D**) bilden zwei Disulfidbrücken aus. Modifiziert nach L. Kohidai, 2008.

3.6.2 Vom Stimulus zur Chemokinausschüttung

Damit das Immunsystem auf körperfremde Stoffe reagieren kann, müssen die Immunzellen mittels Oberflächenrezeptoren durch externe Stimuli wie z. B. PAMPs aktiviert werden. PAMPs sind Moleküle, die von Pathogenen exprimiert oder sekretiert werden und vom Immunsystem des Wirts über Mustererkennungs-Rezeptoren (*Pattern recognition receptors* (PRRs)), wie z. B. TLRs spezifisch erkannt werden können. Klassische PAMPs sind beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine, die auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien vorkommen. Bei grampositiven Bakterien, wie *S. pn.* können Lipoproteine der Zellwand als PAMPs wirken, indem sie an TLR-2 binden [134]. Auch das intrazellulare Toxin Pneumolysin (PLY) ist ein potenter Immunstimulus, der von Pneumokokken produziert wird. PLY scheint einerseits aktiv von *S. pn.* sekretiert zu werden, andererseits auch durch lytische Prozesse (z. B. bei Therapie mit einem lytischen Antibiotikum) aus den Zellen zu gelangen [135, 136]. Hoch konzentriertes PLY lysiert Wirtszellen, während es niedriger dosiert die Expression vieler immunmodulatorischer Gene initiiert [136-139]. PLY scheint von den Rezeptoren TLR-2 und - 4 erkannt zu werden [140], die unter anderem auf Makrophagen und Epithelzellen (siehe 3.4.2)

zu finden sind. Die Aktivierung dieser Rezeptoren sorgt für eine Weiterleitung des Signals über eine Signalkaskade ins Zellinnere (siehe Abbildung 8), wodurch schließlich eine Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren initiiert wird [141, 142]. In Abb. Abbildung 8 ist der Signalweg nach TLR-Liganden-Bindung dargestellt: Bestandteile extrazellulärer Bakterien (z. B. Lipoproteine) binden an den TLRs auf der Zelloberfläche von Immunzellen, wohingegen einzelsträngige RNA / DNA oder doppelsträngige RNA intrazellulär von den TLRs 3, 7 / 8 oder 9 detektiert wird. Die zytosolischen Domänen der Rezeptoren rekrutieren im Anschluss an die Liganden-Bindung Adapterproteine, beispielsweise den myeloid differentiation factor 88 (MyD88). Nur TLR3 scheint unabhängig von MyD88 zu agieren. Der MyD88-assoziierte Signalweg führt zu einer Aktivierung von nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells (NF-kB), einem Transkriptionsfaktor, dessen Proteine p65 (RelA) und p50 in Folge einer Phosphorylierungsreaktion in den Zellkern wandern, um die Transkription und Translation inflammatorischer Zytokine und Chemokine anzuregen [143]. Es konnte gezeigt werden, dass NF-kB bzw. RelA in Epithelzellen essentiell ist für eine wirkungsvolle Immunantwort nach Pneumokokken-Infektion [65, 144]. Dahingegen scheint in Makrophagen vor allem die direkte und frühzeitige Immunreaktion RelA-abhängig zu sein, da in einzelnen Infektionsexperimenten ein konditioneller RelA-Knockout in Makrophagen zu frühen Zeitpunkten eine retardierte Rekrutierung der Neutrophilen und verminderte Zytokinlevel mit sich brachte, zu späteren Zeitpunkten aber keine Unterschiede mehr zu sehen waren [145]. In einem geringeren Maße scheinen auch TLR- und MyD88-unabhängige Prozesse zu einer Sekretion von Zytokinen oder Chemokinen wie CXCL5 zu führen. So konnte beispielsweise eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) an der IL-6 induzierten Sekretion von CXCL5 gezeigt werden [146]. Die tragende Rolle von TLRs in Infektionen zeigt sich bei Patienten mit genetischer Defizienz von MyD88. Diese Patienten zeigen eine abgeschwächte Immunreaktion mit geringeren Zytokin-Konzentrationen und einer erhöhten Rate invasiver Pneumonien [147, 148].



3.6.3 Die Rolle des Chemokinrezeptors CXCR2 und seiner Liganden

Auf der Oberfläche von Neutrophilen werden verschiedene Chemokinrezeptoren exprimiert, unter anderem die CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren 2 (CXCR2, auch als IL-8 Rezeptor bekannt) und -4 (CXCR4) [150, 151]. Das Zusammenspiel dieser Rezeptoren reguliert die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark. Während CXCR4 und sein Ligand CXCL12 für einen Rückhalt der PMNs im Knochenmark sorgen, fungiert eine CXCR2-Aktivierung durch die im Knochenmark produzierten Chemokine CXCL1 und CXCL2 für die Freisetzung der Zellen ins Blut [151]. Diese Liganden, wie auch CXCL5, sind gekennzeichnet durch die Anwesenheit des aus den Aminosäuren Glutamyl, Leucyl, Arginin bestehenden ELR-Motivs (ELR+ Chemokine) und werden in der Maus nur von CXCR2 detektiert. Auf humanen Neutrophilen wird zusätzlich CXCR1 exprimiert, an den ebenfalls ERL+ Chemokine binden können. Dieser Rezeptor ist strukturell sehr ähnlich zu CXCR2 und scheint ebenfalls der Neutrophile-Rekrutierung und -Aktivierung zu dienen [152].

Funktionell konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass CXCR2 und seine Liganden, z. B. CXCL1, CXCL2 und CXCL5, eine tragende Rolle bei der Rekrutierung von Neutrophilen

und mesenchymalen Stammzellen in Tumorgewebe haben [153-155], wobei eine starke Expression von CXCR2 oder CXCL5 in tumorösen Bereichen mit verringerten Überlebenschancen assoziiert werden kann [156, 157].

Zu der Rolle von CXCR2 und seinen Liganden in Infektionen ist beispielsweise bekannt, dass CXCL5 aufgrund vermehrter Infiltration von Neutrophilen zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke nach einer LPS Stimulation im Gehirn beiträgt [158]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von CXCR2 oder CXCL5 in einem Tuberkulose-Model vor einem schadhaften Neutrophile-Influx und einer hohen Letalität schützt [67]. Allerdings wurde auch vermehrt von einem protektiven Einfluss der ELR+ Chemokine berichtet: Bei einer Bakterieninduzierten Darminfektion schützt der mittels CXCR2 eingeleitete Einstrom von Neutrophilen vor der Ausbreitung der Bakterien und Diarrhö [159]. In einer murinen virusinduzierten Enzephalomyelitis, einer entzündlichen Erkrankung des Zentralnervensystems, sorgt die Infiltration von PMNs zwar für eine Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, ermöglicht so aber auch die Rekrutierung von virusspezifischen T-Zellen zum Ort der Infektion, sodass eine Inhibition von CXCR2 in einer unkontrollierten Virusvermehrung und einer 100 %-igen Mortalität resultiert [160]. Auch in einer Pseudomonas aeruginosa Pneumonie tragen CXCR2 und seine Liganden essentiell zur Rekrutierung von PMNs und Bakterienbekämpfung bei, weshalb eine Neutralisierung von CXCR2 dazu führt, dass die Überlebenssrate der infizierten Tiere stark sinkt [161].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Neutrophile-rekrutierende Wirkung von CXCR2 und ELR+ Chemokinen entweder positiv oder negativ für die Bekämpfung und Resolution der Erkrankung ist, was abhängig vom Pathogen zu sein scheint. Vor allem bei Infektionen, die eine starke Reaktion des Immunsystems mit irreversibler Gewebeschädigung verursachen, scheint eine Verminderung der Neutrophilenzahl durch Neutralisierung von Rezeptor oder Liganden tendenziell eine verminderte Mortalität mit sich zu bringen [67].

4 Zielsetzung

Die Pneumonie ist mit ihrer unverändert hohen Morbidität und Mortalität immer noch eine der der wichtigsten Infektionskrankheiten. Obwohl die vielen Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte zu einer Anpassung der Therapie geführt haben, sterben trotz adäquater antimikrobieller Betreuung und Behandlung von Ko-Morbiditäten immer noch zu viele Patienten.

Bei einer Pneumonie scheint oftmals eine lokale Hyperinflammation mit der Entwicklung einer schädlichen systemischen Entzündung und Organschädigung assoziiert werden zu können. Aus diesem Grund wird empfohlen, innerhalb von höchstens vier Stunden nach Einweisung mit einer antibakteriellen Therapie zu beginnen. Die Bedeutung und die Auswirkungen der frühen Intervention sollen im Zuge dieser Dissertation detailliert untersucht werden. Dazu sollen S. pn.-infizierte Mäuse frühzeitig oder erst zu einem späten Zeitpunkt der Infektion mit Ampicillin therapiert werden. Eine umfangreiche Analyse klinischer Parameter, der lokalen und systemischen Immunantwort, der Integrität der alveolokapillären Barriere sowie histopathologische Untersuchungen sollen vor Therapiebeginn und zu ausgewählten Zeitpunkten während der Therapie durchgeführt werden. Dies ermöglicht die Untersuchung des Verlaufs der Pneumonie in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Therapiebeginns. Durch diesen Ansatz kann des Weiteren analysiert werden, welche Prozesse der Pneumokokkeninduzierten Inflammation durch eine antibiotische Therapie reversibel sind. Ebenso könnten Hinweise darauf gefunden werden, welche irreversiblen Schädigungen vor Einsatz einer antibakteriellen Therapie entstehen, die durch die Eliminierung des Pathogens nicht verringert werden können.

Ferner soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL5 auf die Schädigung der Lunge untersucht werden, und zwar sowohl bei einer infektiösen Inflammation der Lunge nach S. pn. Infektion, als auch nach steriler Inflammation im Zuge einer invasiven Beatmung mit hohem Tidalvolumen. Eine Reduktion der neutrophilen Granulozyten, die bei diesen Modellen früh und in hoher Zahl in den Alveolarraum migrieren, einer Verminderung der Neutrophilen-assoziierten Schädigung könnte zu des Lungengewebes führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollen Cxcl5-defiziente Mäuse mit Pneumokokken infiziert oder mechanisch ventiliert werden. Da Neutrophile essentiell sind für die Eliminierung von Pneumokokken, könnten verringerte PMN-Zahlen in der Lunge infizierter Tiere zu einer erhöhten bakteriellen Last führen. Ob dies die Mortalität erhöht oder die verminderte Gewebs- und Barriereschädigung zu einer Verbesserung des klinischen Zustandes der infizierten Tiere führt, ist bisher noch unklar. Die Analyse klinischer Parameter, der Immunantwort, der vaskulären Permeabilität sowie histopathologischer Merkmale einer Lungenschädigung sollen bei beiden Formen der pulmonalen Inflammation Aufschluss darüber geben, inwieweit die Abwesenheit von CXCL5 vorteilhaft oder von Nachteil ist.

Basierend auf den Ergebnissen, die im Zuge dieser Arbeit generiert werden, könnten Ansätze für adjuvante Therapien gefunden werden. Diese könnten aufbauend auf einer antibakteriellen Behandlung langfristig eine Verbesserung der Überlebensrate von Pneumonie-Patienten herbeiführen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 <u>Geräte</u>

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, MC 5(-OCE)	Sartorius AG (Göttingen)
Autoklav	Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Beatmungspumpe Maus	flexiVent™	SCIREQ Scientific Respiratory Equipment Inc. (Kanada)
Brutschrank	Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Durchflusszytometer	BD FACSCanto™	BD (Heidelberg)
Hämatologiegerät	scil Vet abc	scil animal care company GmbH (Viernheim)
Homogenisierer	gentleMACS™ Dissociator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Kaltlichtquelle	Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Magnet für magnetische Säulen	MidiMACS Separator	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnet für Zellisolation	DynaMag - Spin magnet	Thermo Fisher Scientific (USA)
Magnethalter	MACS MultiStand	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Magnetrührer	Thermo Scientific™ Variomag Mono Direkt	Thermo Fisher Scientific (USA)
Oximeter	MouseOX Plus	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
pH-Meter	FiveEasy™ pH/mV- Messgerät	Mettler-Toledo
Photometer	Multiskan™ Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Fisher Scientific (USA)
Photometer	Scanning Spectrophotometer, Uvikon XL	BioTek Instruments (USA)
Präparationsbesteck		Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Pumpe für gleichmäßige Entleerung von Spritzen	Pump 11 Elite Infusion	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

Säulen für magnetische Zellisolierung	LS Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Tension System	Flexcell® FX-5000 [™] Tension Systems	Flexcell [®] International Corporation (USA)
Thermometer	BAT-12 Microprobe Thermometer	Physitemp Instruments, Inc. (USA)
Trachealkanüle für Mäuse		Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Vakuumpumpe	Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Schweiz)
Vortexer	Vortex-Genie 2® Model G- 560E	Scientific Industries, Inc. (USA)
Wärmematten System	Homeothermic Blanket Systems	Harvard Apparatus (USA)
Wärmematten System	Homeothermic Blanket Systems	Harvard Apparatus (USA)
Wasserbad	SW23 Schüttelwasserbad	Julabo GmbH (Seelbach)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer bright-line	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Zellfilter für magnetische Zellisolierung	Pre-Separation Filters (30 μm)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Spezifikation	Hersteller
Dispenser-Spitzen (5/10 ml)	Combitips advanced®	Eppendorf AG (Hamburg)
Dynabeads für Endothelzell- Isolation	Dynabeads Sheep anti-Rat IgG	Thermo Fisher Scientific (USA)
Dynabeads für Epithelzell- Isolation	MagniSort™ Streptavidin Negative Selection Beads	Thermo Fisher Scientific (USA)
Einbettkassetten		Rotilabo, Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Handschuhe		B. Braun (Melsungen)
Homogenisier Gefäße	gentleMACS™ M Tubes	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Impfschlingen (1/10 µl)	Einmal-Impfschlingen	Sarstedt (Nümbrecht)
Kanüle 18 G	Sterican® G 18 × 1/2"	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 20 G	Sterican® G 20 × 1/2"	B. Braun (Melsungen)
Kanüle 26 G	Sterican® G 26 × 1/2"	B. Braun (Melsungen)

Kanüle 27 G	BD Microlance™ 3	BD (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (für Serum)	BD Microtainer® SST™ Tubes	BD (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Microvette® 500 µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Kryo-Röhrchen (1 ml)		Thermo Fisher Scientific (USA)
Küvetten	Halb-Mikro-Küvette, PS	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikrotestplatte (96 Well)	Mikrotestplatte 96 Well, F	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagenzgefäß (0,5/1,5/2,0 ml)	Reagiergefäß SafeSeal	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagenzgefäß (15/50 ml)	Falcon® konische Zentrifugenröhrchen	Corning (USA)
Reagenzgefäß für FACS	Falcon® 5mL Round Bottom High Clarity PP Test Tube	Corning (USA)
Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Falcon® serologische Einwegpipetten aus Polystyrol	Corning (USA)
Spritzen (1 ml)	Omnifix® F Solo, 1 ml	B. Braun (Melsungen)
Spritzen (2/5/10 ml)	BD Discardit™ II	BD (Heidelberg)
Vakuum Filter System	Filtropur V50 500ml 0.22µm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflasche, 75 cm ²	TC-Flasche T75,Standard	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturplatte (6/12/24/48/96 Well)	Falcon® Multiwell- Zellkulturplatten	Corning (USA)
Zellkulturschale, 8 cm ²	TC-Schale 35, Standard	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsiebe (40/70/100 µm)	EASYstrainer™ Zellsiebe	Greiner Bio-One (Österreich)

5.1.3 <u>Reagenzien</u>

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
CountBright [™] Absolute Counting Beads	Thermo Fisher Scientific (USA)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (1 × PBS)	Thermo Fisher Scientific (USA)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
FACSFlow™	BD (Heidelberg)
FACS [™] Shutdown Solution	BD (Heidelberg)
Formaldehyd-Lösung, gepuffert (4 %)	AppliChem (Darmstadt)
Hämalaunlösung, sauer nach Mayer	Carl Roth (Karlsruhe)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), ohne CaCl ₂ und MgCl ₂ (HBSS ^{-/-})	Thermo Fisher Scientific (USA)
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), versetzt mit CaCl ₂ und MgCl ₂ (HBSS ^{+/+})	Thermo Fisher Scientific (USA)
Heparin 25000 I.E., 5 ml	Ratiopharm (Ulm)
Humanes Serumalbumin (20 %), HSA	CSL Behring (USA)
Isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Fresenius Kabi (Langenhagen)
Kanadabalsam	Carl Roth (Karlsruhe)
Opti-MEM®	Thermo Fisher Scientific (USA)
Perjodsäure, ≥ 99 %	Carl Roth (Karlsruhe)
Prostaglandin I ₂ Natriumsalz (PGI ₂)	Merck (Darmstadt)
Schiffs Reagenz	Carl Roth (Karlsruhe)
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH(Freiburg im Breisgau)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe)
5.1.4 Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Konzentration	Hersteller
CD11b	M1/70	PE-Cy7	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD11c	N418	Cy5	1 mg/ml	ATCC (USA)
CD11c	HL3	APC	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD144	11D4.1	unkonjugiert	125 µg/ml	BD (Heidelberg)
CD16/32	2.4G2	biotinyliert	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD31	MEC13.3	biotinyliert	15,6 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD45	30-F11	FITC	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
CD45	30-F11	biotinyliert	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
F4/80	BM8	PE	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (USA)
Ly6C	AL-21	V450	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
Ly6C	HK1.4	BV510	0,1 mg/ml	BioLegend (USA)
Ly6G	1A8	PerCP-Cy5.5	0,2 mg/ml	BD (Heidelberg)
MHCII	M5/114.15.2	AF700	0,2 mg/ml	Thermo Fisher Scientific (USA)
Siglec F	E50-2440	BV421	0,5 mg/ml	BD (Heidelberg)
TLR2	T2.5	unkonjugiert	0,2 μg/ml	Thermo Fisher Scientific (USA)

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper

5.1.5 Enzyme

|--|

Enzym	Hersteller
Apyrase	Merck (Darmstadt)
Dispase	Corning (USA)
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
Kollagenase II	Biochrom (Berlin)

5.1.6 Narkose und Heparin

9 ml	NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
2 ml	Ketamin (100 mg/ml)	Bela-pharm (Vechta)
1 ml	Xylazin 2 %	CP-Pharma (Burgdorf)
Ulmer-Mix für Infektion	Ulmer-Mix für Infektion	Ulmer-Mix für Infektion
3 ml	NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
3 ml	Ketamin (100 mg/ml)	Bela-pharm (Vechta)
2,4 ml	Xylyzin 2 %	CP-Pharma (Burgdorf)
Narkose-Mix für Ventilierun	g	
1 ml	NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
2 ml	Fentanyl (0,5 g/ml)	Ratiopharm (Ulm)
1 ml	Medetomidin (1 mg/ml)	CP-Pharma (Burgdorf)
2 ml	Midazolam (5 mg/ml)	Ratiopharm (Ulm)
Heparin-Gemisch	Heparin-Gemisch	Heparin-Gemisch
2 ml	NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen)
2 ml	Heparin (5.000 U/ml)	Ratiopharm (Ulm)

5.1.7 Medien und Puffer

 Tabelle 7: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer

 RPMI-10 Complete Medium (cRPMI)

	RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
10 %	FCS, Hitzeinaktiviert	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
1 %	HEPES Puffer (1 M)	Life Technology (USA)
1 %	L-Glutamin (200 mM, 100 ×)	Life Technology (USA)
1 %	Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Life Technology (USA)
FACS Puffer		
FACS Puffer	1 × PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
FACS Puffer 0,2 %	1 × PBS BSA	Thermo Fisher Scientific (USA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
FACS Puffer 0,2 % Wachstumsmedium für	1 × PBS BSA Bakterien (THY+Yeast)	Thermo Fisher Scientific (USA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
FACS Puffer 0,2 % Wachstumsmedium für 0,5 %	1 × PBS BSA Bakterien (THY+Yeast) Bacto™ Technischer Hefeextrakt	Thermo Fisher Scientific (USA) Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) BD (Heidelberg)

	H ₂ O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
Einfriermedium für Bak	terien	
20 %	Glycerin	Merck (Darmstadt
80 %	THY+Yeast	Eigene Herstellung
Red Blood Cell Lysis b	uffer	
1000 ml	H ₂ O (destilliert)	B. Braun (Melsungen)
1 g	KHCO ₃ (10 mM)	Merck (Darmstadt
8.29 g	NH₄CI (0.15 M)	Merck (Darmstadt
1%-ige Paraformaldehy	d (4% PFA) Lösung, methanolfrei	
36 ml	1 × PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
1 ml	Formaldehyd, methanolfrei, 37 %	Carl Roth (Karlsruhe)
T7 Wachstumsmedium		
	DMEM	Life Technology (USA)
10 %	FCS, Hitzeinaktiviert	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
1 %	HEPES, 1 M	Life Technology (USA)
1 %	Insulin-Transferrin-Selenium Supplements	Thermo Fisher Scientific (USA)
1 %	L-Glutamin, 209 mM	Life Technology (USA)
DMEM-10 Complete Me	dium (cDMEM)	
	DMEM	Life Technology (USA)
10 %	FCS, Hitzeinaktiviert	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
1 %	HEPES, 1 M	Life Technology (USA)
1 %	L-Glutamin, 209 mM	Life Technology (USA)
Endothelzell-Wachstum	nsmedium	
	Endothelial Cell Growth Medium MV2	PromoCell
10 %	FCS, Hitzeinaktiviert	CAPRICORN Scientific (Ebsdorfergrund)
1 %	Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Life Technology (USA)
MACS Puffer		
	1 × PBS	Thermo Fisher Scientific (USA)
0,5 %	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

2 mM	EDTA	Thermo Fisher Scientific (USA)
ACD Puffer		
111 mM	D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
85 mM	tri-Natriumcitrat-Dihydrat, C₀H₅Na₃O⁊ × 2 H₂O	Merck (Darmstadt)
67 mM	Zitronensäuremonohydrat, HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂ × H ₂ O	Merck (Darmstadt)
CGS Puffer		
0,033 M	M-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
0,123 M	Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)
0,013 M	tri-Natriumcitrat-Dihydrat, C ₆ H₅Na ₃ O ₇ × 2 H ₂ O	Merck (Darmstadt)
	Auf einen pH von 6,5 einstellen	
Tyrodes Puffer		
0,35 %	BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
2 mM	Calciumchlorid Dihydrat, CaCl ₂ ×2H ₂ O	Merck (Darmstadt)
5,5 mM	D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
10 mM	HEPES	Life Technology (USA)
2,7 mM	Kaliumchlorid, KCl	Merck (Darmstadt)
1 mM	Magnesiumchlorid Hexahydrat; MgCl ₂ ×6 H ₂ O	AppliChem (Darmstadt)
137 mM	Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)
0,3 mM	Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat, NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	Merck (Darmstadt)
11,9 mM	Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	Merck (Darmstadt)
VILI Puffer		
487,5 ml	Jonosteril®	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe)
12,5 ml	Tham Köhler	Köhler Pharma (Alsbach- Hähnlein)

5.1.8 <u>Bakterienstämme</u>

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme				
Bezeichnung	Serotyp	NTCC		
D39	2	NCTC 7466		
PN36	3	NCTC 7978		

5.1.9 Zelllinien

Tabelle 9:	Übersicht	der	verwendete	en Zelllinien	
				,	_

Bezeichnung	Herkunft	Hersteller
T7 (ECACC 07021402)	Typ II alveoläre Epithelzellen aus H 2Kb-tsA58 Mäusen	ECACC (UK)

5.1.10 <u>Kits</u>

Tabelle 10:	Übersicht der	verwendeten	Kits
-------------	---------------	-------------	------

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Ly-6G MicroBead Kit, mouse	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific (USA)
Human Albumin ELISA Kit	Bethyl Laboratories (USA)
Mouse Albumin ELISA Kit	Bethyl Laboratories (USA)
Mouse CXCL1/KC DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
Mouse LIX DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
Mouse VEGF DuoSet ELISA	R&D Systems (USA)
ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay	Thermo Fisher Scientific (USA)

5.1.11 Software

Bezeichnung	Hersteller
GraphPad Prism, V7	Graphpad Software
FACS Diva	BD (Heidelberg)
FlowJo, V10	FlowJo, LLC
FX-5000 [™] software	Flexcell [®] International Corporation (USA)
scil vIP Manager, V2.0	scil animal care company GmbH (Viernheim)
Skanlt, 4.1	Thermo Fisher Scientific (USA)

Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Software

5.2 Methoden

5.2.1 Anzucht von Streptococcus pneumoniae

5.2.1.1 Kryokonservierung von Streptococcus pneumoniae

Es wurden Kryostocks der Stämme D39 und PN36 angelegt. Dafür wurden die Pneumokokken mit Hilfe einer 1 µl Impfschlinge auf Blutagarplatten aufgebracht und über Nacht (ü.N.) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Einzelne Kolonien wurden auf neue Blutagarplatten übertragen und für 8 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Alle Kolonien einer Platte wurden in ein 1 ml Kryoröhrchen mit 1 ml Gefriermedium überimpft und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert

5.2.1.2 Zucht von Streptococcus pneumoniae für Infektionsversuche

Mit einer 1 µl Impfschlinge wurde Bakterienmaterial aus dem gefrorenen Stock auf fünf Blutagarplatten ausgestrichen und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 8 h inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien in 18 ml THY + Yeast, versetzt mit 2 ml hitzeinaktiviertem FCS, übertragen, bis eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge (OD_{600nm}) von 0,03 - 0,04 erreicht wurde. Die anschließende Inkubation im Wasserbad erfolgte bei 37 °C, bis die Bakterien die exponentielle Wachstumsphase erreichten (OD_{600nm} = 0,3 - 0,4). Anschließend wurde die Flüssigkultur bei 2000 × g für 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 20 ml warmen 1 × PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 1 ml 1 × PBS resuspendiert und durch Bestimmung der OD die Anzahl Kolonie bildender Einheiten (*colony forming units*, CFUs) bestimmt, wobei eine OD_{600nm} von 0,1 einer Konzentration von 1 × 10⁸ CFU/ml entspricht. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 × PBS auf die für den jeweiligen Versuch gewünschte Konzentration verdünnt und zur Kontrolle in 1:10 Verdünnungsschritten auf Blutagarplatten aufgetragen. Die Auszählung der Kontrollplatten erfolgte am nächsten Tag.

5.2.2 <u>Tierexperimentelle Untersuchungen</u>

5.2.2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchung der Pneumokokken-Pneumonie in Abhängigkeit von unterschiedlichen Zeitpunkten der Antibiotikagabe wurden 8 Wochen alte weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6N von Charles River Laboratories (Sulzfeld) bezogen.

Zur Untersuchung der Entwicklung eines Lungenschadens in Abhängigkeit von CXCL5 in der Pneumokokken-Pneumonie und unter mechanischer Beatmung wurden neben Wildtyp (WT) Mäusen des Stammes C57BL/6J auch *Cxcl5* Knockout (*Cxcl5^{-/-}*) Tiere mit diesem Stamm als Hintergrund verwendet. Der *Cxcl5^{-/-}* Stamm wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan H.E. Kaufmann am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie (Berlin) generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt [67].

5.2.2.2 Tierhaltung

Für unsere tierexperimentellen Arbeiten wurde die Zucht der *Cxcl5* Wildtyp (WT) und *Cxcl5^{-/-}* Stämme in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin verlegt.

Der Transport der Mäuse erfolgte 5 – 7 Tage vor Versuchsstart, um den Tieren eine Adaption an den Tierstall im Labor zu ermöglichen. Bis zu fünf Mäuse wurden nach ihrer Ankunft gemeinsam in individuell ventilierte, mit Filterhauben ausgestattete Käfige gesetzt, wo ihnen Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung stand. Ein Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphasen erfolgte im 12-Stunden Rhythmus. Tiere unterschiedlicher experimenteller Gruppen wurden in getrennten Käfigen gehalten.

5.2.2.3 Versuchsgruppen

Für das Modell der retardierten Ampicillin-Therapie wurden die in Tabelle 12 dargestellten Versuchsgruppen zu den angegebenen Zeitpunkten untersucht. Ein Schema des Ablaufes von Infektion und antibakterieller Therapie ist in Abbildung 9 dargestellt.

Infektion	Behandlung	Behandlungsstart (h p.i.)	Analyse Zeitpunkt (h p.i.)
PBS	-	-	24, 48
5 × 10 ⁶ S. pn ST3	-	-	24, 48
5 × 10 ⁶ S. pn ST3	0,9 % NaCl	24	36, 48, 60, 72
5 × 10 ⁶ S. pn ST3	0,4 mg Ampicillin	24	36, 48, 60, 72, 96, 120
5 × 10 ⁶ S. pn ST3	0,9 % NaCl	48	60, 72
5 × 10 ⁶ S. pn ST3	0,4 mg Ampicillin	48	60, 72, 96, 120

Tabelle 12: Versuchsgruppen Pneumokokken-Pneumonie und Ampicillin-Therapie

Für das Modell der Pneumokokken-Pneumonie in Abhängigkeit von CXCL5 wurden die in Tabelle 13 dargestellten Gruppen untersucht.

Genotyp	Infektion	Analyse Zeitpunkt (h p.i.)
Cxcl5 WT	PBS	24
Cxcl5 WT	5 × 10 ⁶ S. pn ST2	24
Cxcl5 ^{-/-}	PBS	24
Cxcl5 ^{-/-}	5 × 10 ⁶ <i>S. pn</i> ST2	24

Tabelle 13: Versuchsgruppen Pneumokokken-Pneumonie in Abhändigkeit von CXCL5

Zur Untersuchung der akuten Lungenschädigung unter mechanischer Beatmung in Abhängigkeit von CXCL5 und Neutrophilen wurden die in Tabelle 14 gelisteten Versuchsgruppen analysiert.

_			
Lahelle 14. Versuchsarunnen	mechanische Reatmung in	n Abhängigkeit von	CXCL5 und Neutrophilen
rabelle 14. versuellagruppen	meenamoone beaunang in	Abhangigket von	

Genotyp	Behandlung	Beatmungsmodus
Cxcl5 WT	-	NV (10 min)
Cxcl5 WT	-	HVT (4 h)
Cxcl5 ^{-/-}	-	NV (10 min)
Cxcl5 ^{-/-}	-	HVT (4 h)

NV = nicht ventiliert, HVT = ventiliert mit hohem Tidalvolumen

5.2.2.4 Infektion der Tiere

Vor der Infektion wurden Körpertemperatur und Gewicht bestimmt. Anschließend erfolgte die Einleitung der Narkose entsprechend des Gewichtes durch Verabreichung des Ulmer-Mixes mit 80 mg/kg Ketamin und 25 mg/kg Xylazin, welcher intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde. Nach Feststellung der ausreichenden Narkose-Tiefe durch Überprüfung des Zwischenzeh-Reflexes wurde den Tieren zum Schutz der Kornea Augensalbe aufgetragen, bevor sie an den oberen Schneidezähnen hängend in einer Infektionsbox fixiert wurden. Es folgte eine tropfenweise Verabreichung von 10 μ l Bakteriensuspension (2,5 × 10⁸ CFU/ml) pro Nasenloch. Die Infektion der Kontrollgruppen verlief analog mit 10 μ l 1 × PBS pro Nasenloch. Anschließend wurden die Mäuse in den Käfigen bis zum Erwachen unter Rotlicht gestellt und regelmäßig überwacht.

5.2.2.5 Behandlung mit Ampicillin

Die Therapie der *S. pn.*-infizierten Tiere mit 0,4 mg Ampicillin in 150 µl 0,9 % NaCl startete 24 h bzw. 48 h nach der Infektion (*post infectionem*, p.i.). Sie erfolgte intraperitoneal (i.p.) und in 12 h-Intervallen. Kontrollgruppen wurden analog mit 0,9 % NaCl behandelt (Abbildung 9).



5.2.2.6 Überwachung des Infektionsverlaufs

Beginnend 24 h p.i. wurden alle Gruppen der Experimentreihe für frühzeitige und verspätete antibakterielle Therpie im 12 h Intervall über den gesamten Versuchszeitraum überwacht. Dafür wurde neben Gewichts- und Temperaturmessung das äußere Erscheinungsbild und das Verhalten der Mäuse beobachtet und die Atmung kontrolliert. Wenn dabei festgestellt wurde, dass die Krankheit bei einzelnen Tiere weit fortgeschritten und das Leiden nicht mehr ethisch vertretbar war, erfolgte umgehend eine Euthanasie mittels Narkotisierung und anschließender zervikalen Dislokation. Zur Beurteilung dieses Zeitpunktes wurde nach Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter ein Score Sheet erstellt, mit dessen Hilfe die Belastung dokumentiert und Abbruchkriterien festgelegt wurden. Eine Übersicht dieses Scoring Systems ist Tabelle 15 zu entnehmen. Folgende Handlungsanweisungen wurden beachtet: Erfüllt das Tier Symptome der Kategorie A oder B wird es weiter beobachtet. Sobald das Tier ein Symptom der Kategorie C aufweist, muss es unverzüglich schmerzlos euthanasiert werden.

Symptom	Kategorie
Tier isoliert sich	A
Struppiges / ungepflegtes Fell	A
Verhaltens-/ und Haltungsauffälligkeiten	A
Augen (krustige Belege, Augenausfluss)	В
Atmung n/t/s *	/ B/ C
Krämpfe, Torkeln, Apathie	С
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	С
Tier vermeidet Bewegung / Reaktionsminderung auf äußeren Reiz	A
Fehlstellung der Zähne	A
Äußere Veränderungen:	A/ B
Verletzungen Hautveränderungen (A)	
Abszesse, äußerlich sichtbare Infektionen, Ödeme, Automutilation (B)	
Hautfalten bleiben stehen	В
Leib hart und aufgetrieben	В
Körpertemperatur-Bestimmung [°C]	
Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35 °C)	В
Körpermasse-Bestimmung [g]	
Körpermasseabnahme ab 10 %	A
Körpermasseabnahme ab 20 %	В
Körpermasseabnahme ≥ 25 %	С

Legende: * Atmung: n = normal; t = beschleunigt oder flach (Kategorie B); s = schwerfällige oder stark pumpende Atmung (Kategorie C)

5.2.3 Analyse der Tiere und Probenentnahme

5.2.3.1 Vorbereitung der Tiere

Körpermasseabnahme \geq 25 %

Zum festgelegten Analyse Zeitpunkt wurden die Mäuse ein letztes Mal auf die in Tabelle 15 aufgelisteten Symptome untersucht und anschließend durch intraperitoneale Verabreichung des Narkose-Mixes (160 mg/kg Ketamin, 75 mg/kg Xylazin, verdünnt in 0,9 % NaCl) entsprechend ihres Körpergewichtes narkotisiert. Nach Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe durch Testung des Zwischenzeh-Reflexes wurden die Tiere auf einer Styroporunterlage fixiert und mit 70 %-igem EtOH benetzt. Die Bauchhöhle wurde vorsichtig geöffnet, wonach aus der Vena cava caudalis und mit Hilfe einer 27 G Kanüle Blut entnommen wurde. Durch diese finale Blutabnahme wurde ein sofortiger Herz- und Kreislaufstillstand gewährleistet.

5.2.3.2 Verarbeitung des Blutes

50 µl des entnommenen Blutes wurden in ein mit EDTA behandeltes Blutentnahmesystem gegeben, das restliche Volumen zur Gewinnung von Serum in ein *Serum separator tube* gefüllt. Dieses wurde für 30 min bei RT inkubiert und bei 13.000 × g für 2 min bei RT zentrifugiert, bevor das Serum in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert wurde. In dem mit EDTA versetzten Blut wurde mit Hilfe eines Hämatologiegerätes Leukozyten, Monozyten und Granulozyten im Blut gemessen und der Hämatokrit bestimmt. Des Weiteren wurde zur Bestimmung der bakteriellen Last das Blut pur und in 1:10 Verdünnungen auf Blutagarplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Für die Untersuchung des akuten Lungenschadens in Abhängigkeit von CXCL5 wurde kein Serum gewonnen, sondern das Plasma aus dem mit EDTA versetzten Blut untersucht. Dafür wurden die EDTA-Röhrchen bei 2.000 × g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und das Plasma bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

5.2.3.3 Durchführung der bronchoalveoären Lavage

Zur Freilegung der Trachea wurde ein medianer Hautschnitt bis zum Kopf der Maus durchgeführt und das Gewebe oberhalb der Trachea entfernt. Zwei 1 ml Spritzen wurden mit jeweils 800 µl 1 × PBS, versetzt mit Protease-Inhibitor, befüllt. Eine 18 G Kanüle wurde die Trachea eingeführt, eine Spritze aufgesetzt und die Lunge vorsichtig gespült. Nach dem Wechsel der Spritzen erfolgte eine erneute Spülung. Die Lavageflüssigkeit (BAL) wurde pur und in 1:10 Verdünnungen auf Blutagarplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die BAL wurde für 5 min bei 400 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (BAL *fluid*, BALF) wurde bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert, das Zellpellet (BAL *cells*, BALC) in 100 µl FACS Puffer resuspendiert und bis zur Antikörper-Färbung (siehe 5.2.5) in einem Reaktionsgefäß für FACS auf Eis gelagert.

5.2.3.4 Verarbeitung der Lunge

Die Lunge wurde mit Hilfe einer 10 ml Spritze und einer 27 G Kanüle über das Herz mit 5 ml 1 × PBS perfundiert, woraufhin alle Lungenlappen bis auf den linken Lungenlappen (Pulmo sinister) und den rechten mittleren Lappen (Lobus medius) in 1 ml 1 × PBS mit Hilfe des gentleMACS[™] Dissociators homogenisiert wurden. Die Suspension wurde pur und in 1:10 Verdünnungen auf Blutagarplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

5.2.3.5 Verarbeitung der Milz

Die Milz wurde in 1 ml 1 × PBS mit Hilfe des gentleMACS[™] Dissociators homogenisiert. Die Suspension wurde pur und in 1:10 Verdünnungen auf Blutagarplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

5.2.4 Mechanische Ventilationsversuche

5.2.4.1 Anfangs-Präparation

Nach einer Gewichtsbestimmung der Maus wurden entsprechend ihres Gewichtes das Narkosegemisch für die Ventilierung (siehe Tabelle 6) verabreicht (Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Medetomidin (0,5 mg/kg)). Nach Feststellung der ausreichenden Narkose-Tiefe durch Überprüfung des Zwischenzeh-Reflexes wurde die Maus unterhalb des Beatmungsgerätes fixiert. Zur durchgängigen Bestimmung der Körpertemperatur wurde rektal eine Temperatursonde eingeführt. Anschließende Schritte der Anfangs-Präparation wurden Dr. med. vet. Sandra-Maria Wienhold durchgeführt. von Um im Laufe des Ventilationsexperimentes weiterhin Narkose verabreichen zu können, wurde ein intraperitonealer Narkose-Katheter gelegt. Die Trachea wurde freigelegt und vorsichtig geöffnet. Anschließend wurde eine Trachealkanüle in die generierte Öffnung eingeführt und fixiert, woraufhin eine Beatmung mit einem niedrigen Tidalvolumen (LVT, 9 ml/kg) gestartet wurde. In die anschließend freigelegte Halsschlagader (Arteria carotis) wurde ein Katheter zur fortlaufenden Versorgung mit VILI-Puffer (siehe Tabelle 7) gelegt. Ein Blasenkatheter diente dem Auffangen von Urin.

5.2.4.2 Ventilation

Die Ventilation erfolgte unter gleichbleibenden Bedingungen für 10 min (Gruppe: NV) oder mit einem hohen Tidalvolumen (33 ml/kg) für 240 min (Gruppe: HVT). Der positive endexspiratorische Druck (PEEP) betrug 2 cm/H₂O, der Anteil am inspiratorischen Sauerstoff (*fraction of inspired oxygen (FiO*₂)) 0,5. VILI-Puffer wurde über einen Katheter zur Halsschlagader mittels einer elektrischen Pumpe mit einer Flussrate von 350 µl/h konstant zugeführt. Alle 10 min wurden Blutdruck (gemessen durch einen Druckaufnehmer über den Katheter in der Halsschlagader), Atem- und Herzfrequenz notiert. Über das FlexiVent® wurden der *peak inspiratory pressure* (PIP) und die Compliance im 10 min Intervall gemessen. Um eine ausreichende Narkosetiefe über den Versuchszeitraum gewährleisten zu können, wurde im weiteren Verlauf abhängig von der Narkosetiefe über den i.p. Katheter Narkosegemisch verabreicht (30 % der Ausgangsdosis). Um die Integrität der alveolokapillären Barriere mittels ELISA bestimmen zu können, wurden 90 min vor Versuchsende 1 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 75 µl 0,9 % NaCl intraarteriell über den Carotiskatheter bzw. intravenös über die laterale Schwanzvene (i.v., NV-Gruppe) appliziert.

5.2.4.3 Beendigung der Ventilation und Probenentnahme

Nach 4-stündiger Beatmung wurden 50 µl des Narkosegemisches für die Ventilierung über den i.p. Katheter appliziert. Nach weiteren 5 min erfolgte eine Verabreichung von 50 µl Heparin-Gemisch (siehe Tabelle 6) über den Carotiskatheter. Über den selben Katheter wurde nach einer 5-minütigen Wartezeit mit Hilfe einer 1 ml Spritze, die ein halbes EDTA-Plättchen enthielt, Blut entnommen, bis ein Herz- und Kreislaufstillstand gewährleistet war. Das Blut wurde in ein EDTA-Gefäß überführt um mit Hilfe eines Hämatologiegerätes Immunzellen zu bestimmen. Im Anschluss wurde das Blut zentrifugiert ($2.000 \times g$, 10 min, 4 °C) und das Plasma für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Die Maus wurde vom FlexiVent® entfernt, woraufhin eine eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt wurde. Diese wurde zentrifugiert ($400 \times g$, 5 min, 4 °C), der Überstand bei -80 °C eingefroren und die Zellen für die Analyse der Immunzellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen (siehe 5.2.5).

5.2.5 Färbung der BAL-Zellen für durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Zellen der BAL wurden mit 10 µl aCD16/CD32 Antikörper für 5 min auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Die Färbung der Oberfläche erfolgte mit den Antikörpern antiCD11c-Cy5 (aCD11c; 1:250), aCD11b-PE-Cy7 (1:200), aF4/80-PE (1:125), aLy6G-PerCP-Cy5.5 (1:200), aLy6C-V450 (1:125) und aMHCII-Alexa Fluor 700 (1:666) für 20 min bei 4 °C. Bei Versuchen mit Cxcl5^{-/-} und Cxcl5 WT erfolgte eine Oberflächenfärbung nach analogen Bedingungen mit den Antikörpern aCD11c-APC (1:250), aCD11b-PE-Cy7 (1:200), aF4/80-PE (1:125), aCD45-FITC (1:400), aLy6G-PerCP-Cy5.5 (1:200), aLy6C-BV510 (1:200), aMHCII-Alexa Fluor (1:666) und aSiglec F-BV421 (1:125). Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Proben mit 1 ml 1 × PBS (400 × g, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 300 µl 1 %-igem PFA aufgenommen. Nach einer Inkubation ü.N. bei 4 °C wurde 2 ml FACS Puffer zu den Zellen gegeben, woraufhin sie erneut zentrifugiert wurden (400 × g, 5 min, 4 °C). Nach einem erneuten Waschen der Zellen mit 2 ml FACS Puffer wurden die Zellen in 100 µl FACS Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl CountBright[™] Absolute Counting Beads, welche zuvor 1:10 verdünnt wurden, zu den Zellen gegeben. Die einzelnen Zellpopulationen wurden wie in Abbildung 10 dargestellt anhand ihrer Oberflächenmarker charakterisiert.



5.2.6 Histologische Untersuchungen

Für die histopathologischen Untersuchgen der Mauslungen wurden die infizierten bzw. beatmeten Tiere wie in 5.2.3.1 beschrieben mittels finaler Blutabnahme euthanasiert. Die Trachea wurde abgebunden, um einen Lungenkollaps zu vermeiden. Nach dem Öffnen des Thorax wurden die Lungen ohne vorherige Lavage oder Perfusion vorsichtig entnommen und in Einbettkassetten für 24 h bei RT in 4 %-igem Formalin fixiert. Nachfolgende Schritte wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gruber an der Freien Universität Berlin durchgeführt. Die Lungen wurden in Paraffin eingebettet und in 2 µm dünne Schnitte zerteilt. Die Schnitte wurden mit Hematoxylin & Eosin (H & E) gefärbt, wie bereits in [162] und [163] beschrieben. Pro Lunge wurden drei Abschnitte mikroskopisch von den Veterinärmedizinerinnen Dr. Corinne Gunther oder Dr. Kristina Dietert ausgewertet, um die Ausbreitung und Stärke pathologischer Veränderungen zu bewerten. Dazu wurden folgende spezifische Inflammationsparameter für die Lunge ausgewertet: Bereich der betroffenen Lunge; Verteilungen der Läsionen; peribronchiale, interstitielle und intra-alveoläre Inflammation; alveoläre Nekrose; perivaskuläre Inflammation und Ödembildung; Infiltration von Immunzellen; alveoläres Ödem; Pleuritis und Steatitis, wie bereits in [164] beschrieben. Ein Lungen-Inflammationsscore wurde aus dem Durchschnitte der folgenden Parameter, die je nach Ausprägung auf einer Skala von 0 (nicht betroffen) bis 4 (hochgradig) eingestuft worden sind, erstellt: Ausprägung der Inflammation, Immunzellinfiltration, Pleuritis und Steatitis. Alveoläres und perivaskuläres Ödem wurden auf einer Skala bis 5 (massiv) bewertet.

Bei mechanisch ventilierten Tieren wurde neben einer H & E Färbung zur verbesserten Darstellung von Bindegewebe, Basalmembran und Zellwänden zusätzlich eine PAS (*periodic acid-Schiff*) Reaktion durchgeführt. Dazu wurden die Lungenschnitte entparaffiniert, wozu sie für jeweils 15 min bei 70 °C zunächst dreimal in Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 0 %) inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine 5-minütige Inkubation der Schnitte in 1 %-iger Perjodsäure bei RT, woraufhin sie in destilliertem Wasser gespült und für anschließend für jeweils 5 min in Schiffs Reagenz, H₂O und Hämalaun gelagert wurden. Daraufhin erfolgte das Bläuen der Schnitte in H₂O. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung (jeweils für 15 min bei 70 °C in 70 %, 80 %, 96 % und 100 % Alkohol) wurden die Schnitte in Xylol aufgehellt und in Kanadabalsam eingebettet.

5.2.7 Ermittlung der vaskulären Permeabilität

Murines Serumalbumin (MSA) wurde im Plasma bzw. Serum sowie in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit der Mäuse mittels Mouse Albumin ELISA Kit nach Herstellerangaben quantifiziert. Bei Versuchen mit mechanischer Ventilierung wurde 90 min vor Beendigung des Beatmungsversuchs 1 mg Humanes Serumalbumin (HSA) in 75 µl 0,9 %-igem NaCl i.v. verabreicht. Die HSA Konzentration wurde mit Hilfe des Human Albumin ELISA Quantitation Set nach Herstellerangaben bestimmt.

Zur Ermittlung der vaskulären Permeabilität wurde folgende Formel genutzt:

$$Permeabilität = \frac{c (MSA / HSA)BALF}{c (MSA / HSA)Serum / Plasma}$$

5.2.8 Quantifizierung von Chemokinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren

Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren wurden in der BALF und dem Plasma bzw. Serum der Versuchstiere oder im Zellkultur-Überstand nach Herstellerangaben folgender Kits quantifiziert:

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten ELISA Kits

Analyt	Kit (Hersteller)
CXCL1	Mouse CXCL1/KC DuoSet ELISA (R&D Systems)
CXCL2	Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA (R&D Systems)
CXCL5	Mouse LIX DuoSet ELISA (R&D Systems)
VEGF	Mouse VEGF DuoSet ELISA (R&D Systems)
IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p40, TNF-α, IFN-γ, G-CSF, GM-CSF, CCL2, CCL3	ProcartaPlex® Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific)

5.2.9 In vitro Versuche

5.2.9.1 Kultivierung von T7 Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml T7 Wachstumsmedium überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (400 x g, RT) wurde der Überstand verworfen, die Zellen erneut in 10 ml T7 Wachstumsmedium aufgenommen und wiederholt zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml T7 Wachstumsmedium aufgenommen und in einer 75 cm² Zellkulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Aufteilen in neue Zellkulturflaschen oder Zellkulturplatten wurden die Zellen mit 37 °C warmen 1 × PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin / EDTA versetzt. Nach einer 2minütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit T7 Wachstumsmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation (400 x g, 5 min, RT) wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1 ml T7 Wachstumsmedium aufgenommen und nach einer 1:50-Verdünnung in eine neue 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Für weiterführende Experimente wurden die Zellen in Opti-MEM® aufgenommen, mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt und in Zellkulturplatten eingebracht.

5.2.9.2 Stimulation oder Infektion von T7 Zellen

Für Infektionsversuche wurden die Zellen in einer Konzentration von 2×10^{5} /ml in Zellkulturplatten eingebracht und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis sie einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten. Die Bakterien für eine Infektion der Zelllinie wurden analog zu den *in vivo* Infektionsversuchen ohne Zugabe von FCS gezüchtet (siehe 5.2.1.2) und in einer Konzentration von 1 × 10^{7} /ml in Opti-MEM® aufgenommen. Für eine Multiplizität der Infektion (MOI) von 1 wurden 10 µl der Bakteriensuspension pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Quantifizierung der sekretierten Proteine (siehe 5.2.8) bei -20 °C gelagert.

Für eine Blockierung des *toll-like* Rezeptors 2 (TLR2) vor der Infektion wurden nach Erneuerung des Kulturmediums 0,05 µg aTLR2 (T2.5) Antikörper pro Well einer 24-Well Zellkulturplatte eingebracht und für 30 min unter gleichbleibenden Bedingungen vor der *S. pn.*-Infektion inkubiert. Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurde die Bakteriensuspension pur und in 1:10 Verdünnungen auf Blutagarplatten gebracht und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt.

Zur Simulation einer mechanischen Ventilation *in vitro* wurden T7 Zellen in einer Konzentration von 1 × 10⁵/ml in Opti-MEM®, versetzt mit 1 % Penicillin / Streptomycin aufgenommen. 2 ml der Zellsuspension wurden in jedes Well einer Kollagen IV-beschichteten flexiblen Membranen einer BioFlex® Zellkulturplatte gebracht und bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Erneuerung des Mediums wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Hilfe des Flexcell® FX-5000[™] Tension Systems mit einer Frequenz von 0,25 Hertz (Hz) und einer Elongation von 18 % zyklisch gedehnt. Als Kontrolle dienten analog behandelte, unter statischen Konditionen inkubierte T7 Zellen. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur Quantifizierung der sekretierten Proteine (siehe 5.2.8) bei -20 °C gelagert.

5.2.9.3 Isolation und Infektion muriner vaskulärer Endothelzellen

Die Mäuse wurden wie in 5.2.3.1 beschrieben narkotisiert und durch eine finale Blutabnahme aus der Vena Cava euthanasiert. Die Lunge wurde freigelegt, nach Entfernung von umgebendem Fettgewebe, Herz und Thymus vollständig entnommen und in HBSS^{-/-} gewaschen. Das Lungengewebe wurde in $1 - 2 \text{ mm}^3$ große Stücke zerschnitten, in 10 ml Verdau-Lösung überführt und für 60 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. In der Inkubationszeit wurden 35 mm² Zellkulturschalen bei RT für 60 min mit 1 ml Fibronektin beschichtet und die magnetischen Beads vorbereitet. Dazu wurden pro Mauslunge 3 µl Dynabeads in 1000 µl HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und am Magneten platziert, sodass sich die Beads an der Rückwand des Reaktionsgefäßes anlagerten. Der Überstand wurde verworfen, das Reaktionsgefäß vom Magneten entfernt und erneut 1000 µl HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA zu den Beads gegeben. Dieser Waschvorgang wurde dreimal durchgeführt, bevor die Beads im ursprünglichen Volumen (4 µl / Maus) aufgenommen und mit 2,5 µl aCD144 Antikörper pro Lunge versetzt wurden. Die Suspension wurde für 60 min bei RT in einem Schüttler inkubiert, anschließend wie bereits beschrieben dreimal am Magneten gewaschen in 100 µl HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA aufgenommen.

Im Anschluss an die Inkubation der Lunge im Wasserbad wurden die Gewebestücke mit einer 10 ml Pipette für 5 min auf- und abpipettiert, um die Zellen aus dem Gewebe zu lösen. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 10 ml Endothelzell-Wachstumsmedium überführt und bei 400 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA aufgenommen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 700 µl HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA resuspendiert und mit den zuvor gewaschenen und mit Antikörpern inkubierten Dynabeads vermengt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei RT wurde die Suspension auf vier 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in jeweils 1 ml HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA aufgenommen. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben dreimal gewaschen, bevor die Zellen in 1 ml HBSS^{+/+} + 0,5 % BSA aufgenommen und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt wurden. Nach einem letzten Waschvorgang mit Hilfe des Magneten wurden die Zellen in 1 ml Endothelzell-Wachstumsmedium aufgenommen und in die mit Fibronektin beschichtete 35 mm² Zellkulturschale eingesäht. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium erneuert. Dies erfolgte alle 48 h, bis die Zellen eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten. Für Infektionsversuche wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin / EDTA analog zum Protokoll für T7 Zellen auf 24-Well Zellkulturplatten aufgeteilt (siehe 5.2.9.1). Wenn die Endothelzellen einen konfluenten Zellrasen gebildet hatten, wurden sie mit 1 × PBS gewaschen und mit 500 µl Opti-MEM® versetzt. Nach einer 3-stündigen Inkubation wurden die Endothelzellen analog zu den T7 Zellen für 24 h mit S. pn. stimuliert, bevor der Überstand abgenommen und bis zur Messung der Proteine bei -20 °C aufbewahrt wurde.

5.2.9.4 Isolation und Infektion alveolärer Epithelzellen

Die Mäuse wurden wie in 5.2.3.1beschrieben narkotisiert und durch eine finale Blutabnahme aus der Vena Cava euthanasiert. Zur Freilegung der Trachea wurde ein medianer Hautschnitt bis zum Kopf der Maus durchgeführt und das Gewebe oberhalb der Trachea entfernt. Die Lunge wurde über das Herz mit 5 ml HBSS^{-/-} gespült. Mit Hilfe einer 18 G Kanüle wurden über die Trachea vorsichtig 1,5 ml Dispase-Lösung (500 U) in die Lunge eingebracht, woraufhin die Spritze schnell gewechselt wurde, um anschließend 500 µl einer flüssigen 1 %-igen Agaroselösung zu applizieren. Nachdem sich diese verfestigt hatte, wurden Herz und Thymus entfernt, die mit Dispase und Agarose gefüllte Lunge herauspräpariert, dreimal in HBSS^{-/-} auf Eis geschwenkt und in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Dispaselösung bedeckt bei RT für 40 min inkubiert. 24,5 ml cDMEM wurden mit 2,5 mg DNase versetzt. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Lunge in eine 60 mm Petrischale mit 5 ml dieser Verdaulösung überführt. Mit Hilfe von zwei Pipetten wurden die Zellen aus dem Lungengewebe geklopft. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer 10 ml Pipette auf- und abpipettiert und durch ein 100 µm Zellsieb gegeben, um die Zellen zu vereinzeln. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (200 × g, 4 °C) wurde das Pellet in 1,5 ml cDMEM + 10 % FCS aufgenommen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und das Pellet mit den Zellen der vorherigen Zentrifugation zusammengeführt. Die Zellen wurden mit Hilfe von Tryptanblau quantifiziert, woraufhin pro 1×10^7 Zellen für die spätere Negativselektion jeweils 10 µl unkonjugiertes aCD45, aCD16/32 und aCD31 zu der Zellsuspension gegeben und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurden. In dieser Zeit wurden 10 μ l der magnetischen Beads pro 1 × 10⁷ Zellen wie in 5.2.9.3 beschrieben dreimal mit jeweils 1 ml 1 × PBS am Magneten gewaschen und anschließend in 100 µl 1 × PBS aufgenommen. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Zellsuspension mit 20 ml cDMEM versetzt und zentrifugiert (5 min, 200 × g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 25 ml cDMEM aufgenommen, erneut zentrifugiert und in 1,5 ml cDMEM resuspendiert. Zusammen mit den vorbereiteten Beads wurden die Zellen für 15 min bei RT inkubiert, auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und an einen Magneten platziert. Da hier eine Negativselektion angewendet wurde, wurden die Zellsuspension mit den Zellen, die nicht am Magneten gebunden waren in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen am Magneten wurden erneut in 1 ml cDMEM aufgenommen und am Magneten platziert. Der Überstand wurde ebenfalls in das 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, mit 10 ml cDMEM + 10 % FCS versetzt und bei 200 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml cDMEM + 10 % FCS aufgenommen und mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 / ml eingestellt und 500 µl der Epithelzell-Suspension pro Well in eine 24-Well Zellkulturplatte eingebracht. Die Epithelzellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, woraufhin alle 48 h das Medium erneuert wurde. Wenn die Zellen konfluent waren, wurden sie dreimal mit warmen 1 × PBS gewaschen und 500 µl DMEM + 2 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % HEPES pro Well zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation ü.N. wurden das Infektionsmedium erneuert und die Zellen analog zu den T7 Zellen für 24 h mit S. pn. stimuliert, bevor der Überstand abgenommen und bis zur Messung der Proteine bei -20 °C aufbewahrt wurde.

5.2.9.5 Isolation und Infektion alveolärer Makrophagen

Die Mäuse wurden wie in 5.2.3.1 beschrieben narkotisiert und durch eine finale Blutabnahme aus der Vena Cava euthanasiert. Zur Freilegung der Trachea wurde ein medianer Hautschnitt bis zum Kopf der Maus durchgeführt und das Gewebe oberhalb der Trachea entfernt. Fünf 1 ml Spritzen wurden mit jeweils 800 µl 1 × PBS befüllt. Eine 18 G Kanüle wurde die Trachea eingeführt, die Spritzen nacheinander aufgesetzt und die die Lunge fünfmal vorsichtig gespült. Die Lavageflüssigkeit wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bei 400 × g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 100 µl DMEM + 10 % FCS aufgenommen und mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt. 5 × 10⁴ Zellen in 200 µl DMEM + 10 % FCS wurden pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte eingebracht und für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium mit den nicht-adhärenten Zellen wurde entfernt und 200 µl frisches Medium zu den Zellen gegeben. Die Infektion erfolgte am kommenden Tag analog zu den T7 Zellen für 24 h mit *S. pn.*, bevor der Überstand abgenommen und bis zur Messung der Proteine bei -20 °C aufbewahrt wurde.

5.2.9.6 Isolation und Infektion muriner Knochenmarks-Neutrophiler

Die Mäuse wurden wie in 5.2.3.1 beschrieben narkotisiert und durch eine finale Blutabnahme aus der Vena Cava euthanasiert. Das Fell und Fleisch wurde vorsichtig von Femur und Tibia entfernt und das Bein vom Hüftknochen gelöst. Femur und Tibia wurden voneinander getrennt und die Fußknochen vorsichtig entfernt, ohne die Knochen zu beschädigen. Die Enden der Knochen wurden entfernt und das Knochenmark mit Hilfe einer 27 G Kanüle und 10 ml 1 × PBS herausgespült. Die Suspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 15 ml MACS Puffer übertragen und bei 300 × g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 5 ml MACS Puffer pro Maus aufgenommen und mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt. Nach einer erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Konzentration der Zellen in MACS Puffer auf 5 \times 10⁸/ml eingestellt und pro 1 \times 10⁸ Zellen 50 µl aLy6G-Biotin zu den Zellen gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden pro 1 × 10⁸ Zellen 150 µl MACS Puffer sowie 100 µl aBiotin-Microbeads hinzugegeben, woraufhin eine erneute Inkubation für 15 min bei 4 °C erfolgte. Die Zell-Antikörper-Microbead Suspension wurde mit 10 ml MACS Puffer versetzt, zentrifugiert (300 × g, 5 min, 4 °C) und in 500 µl MACS Puffer pro 1 × 10⁸ Zellen resuspendiert. Anschießend erfolgte die Isolierung der Ly6G-positiven Zellen mit Hilfe eines Magnet-Systems. Dazu wurde eine Säule (LS Column) in das magnetische Feld eines MidiMACS Separators eingebracht und mit 3 ml MACS Puffer versetzt. Die Zellsuspension wurde durch einen 30 µm Filter auf die Säule gegeben, wodurch Zellen, die an einen aLy6G Antikörper und die Microbeads gekoppelt waren, an dem Magneten hängen blieben. Die Zellen, die durch die Säule hindurchgingen, wurden verworfen. Anschließend wurden zum Waschen der Zellen und

zum Entfernen unspezifisch gebundener Zellen dreimal 3 ml MACS Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wurde vom Magneten entfernt, woraufhin sie zum Herauslösen der Zellen mit 5 ml MACS Puffer versetzt wurde. Die isolierten Neutrophilen wurden in einem 15 ml Reaktionsgefäß aufgefangen und mit Hilfe von Tryptanblau ausgezählt. Für anschließende Infektionsversuche wurden die Neutrophilen zentrifugiert ($300 \times g$, 5 min, 4 °C) und zu 5×10^5 /ml in Opti-MEM® resuspendiert. Pro Well einer 48-Well Zellkulturplatte wurden 250 µl der Zellsuspension eingebracht. Die *S. pn.*-Infektion der Neutrophilen erfolgte am selben Tag analog zu den T7 Zellen für 24 h, bevor der Überstand abgenommen und bis zur Messung der Proteine bei -20 °C aufbewahrt wurde.

5.2.9.7 Isolation und Infektion muriner Thrombozyten

Die Mäuse wurden wie in 5.2.3.1 beschrieben narkotisiert.150 µl des ACD-Puffers wurden in eine 1 ml Spritze gefüllt, in welche das Blut entnommen wurde. Durch diese finale Blutabnahme aus der Vena Cava wurden die Mäuse euthanasiert. Das mit ACD-Puffer versetzte Blut wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Eine Apyrase-Lösung (0,02 U/ml) wurde 1:1000 in CGS-Puffer verdünnt, wovon 200 µl zum Blut gegeben wurden. Nach einer Zentrifugation (200 × g, 10 min, 37 °C) wurden die oberste Schicht mit Zwischenphase und 25 % der untersten Sicht in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu den übrigen 75 % der erythrozytenhaltigen untersten Schicht wurden erneut 200 µl Apyrase-haltiger CGS-Puffer hinzugegeben. Beide Reaktionsgefäße wurden bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert, die obersten Schichten vorsichtig abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß vereint. In diese Lösung wurde entsprechend des Volumens PGI2 hinzugegeben, sodass eine Verdünnung von 1:1.000 erreicht wurde. Nach sanftem Mischen der Suspension und einer anschließenden Zentrifugation (1.000 × g, 6 min, 37 °C) wurde der Überstand verworfen, das Thrombozyten-Pellet in 1 ml CGS-Puffer (versetzt mit PGI2 und Apyrase) aufgenommen und erneut bei gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Tyrodes Puffer + 0,1 % Apyrase resuspendiert und die Zellen für eine Stunde bei RT ruhen lassen. Die Thrombozyten wurden mit Hilfe von Druchflusszytometrie ausgezählt, die Zellen erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert und in Tyrodes Puffer ohne Apyrase resuspendiert. Anschließend erfolgte eine S. pn.-Infektion analog zu den T7 Zellen, allerdings nicht für 24 h, sondern nur für eine Stunde.

5.2.10 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

GraphPad Prism (Version 7.0) wurde für die statistische Auswertung der Ergebnisse und die Erstellung der Graphen verwendet. Die Kurven zur Darstellung der Überlebensraten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode dargestellt und einem log-rank (Mantel-Cox) Test

ausgewertet. Zur statistischen Auswertung parametrischer Daten zweier Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test verwendet. Die Messdaten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Nicht-parametrischen Daten wurden als Median mit 25 – 75 % Interquartilabstand dargestellt und mit Hilfe eines Mann Whitney Tests statistisch ausgewertet. In der Experimentreihe zur Untersuchung frühzeitiger und später antibakterieller Therapie wurden mehrerer Zeitpunkte der *S. pn.*-infizierten, lösunsmittelbehandelen Kontrollgruppe mit Hilfe eines 1-way ANOVAs (Kruskal-Wallis-Test) zu den Werten des Behandlungsstarts verglichen. Parametrische wie auch nicht-parametrische Daten von mehr als zwei Gruppen wurden mit einem 2-way ANOVA statistisch ausgewertet. *P* Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Der Einfluss früher und später antimikrobieller Therapie auf die Resolution einer Streptokokken-induzierten Pneumonie in der Maus

Der Effekt frühzeitiger und verspäteter Ampicillin-Therapie auf den Krankheitsverlauf und die Immunantwort des Wirts sollte detailliert erforscht werden, um die Wichtigkeit einer frühzeitigen antibakteriellen Therapie zu verstehen. Dazu wurden C57BL/6J-Mäuse transnasal mit *S. pn.* infiziert und ab 24 h p.i. bzw. 48 h p.i. in 12-Stunden Intervallen mit Ampicillin therapiert. *S. pn.*-infizierte Kontrolltiere wurden mit 0,9 % NaCl behandelt.

6.1.1 <u>Eine retardierte Antibiotika-Therapie schützt nicht vor einem fatalen</u> <u>Pneumonie-Verlauf in Mäusen</u>

Tiere, die frühzeitig (24 h p.i.) behandelt wurden, konnten vor einem fatalen Pneumonie-Verlauf geschützt werden und zeigten eine Mortalität von lediglich 2,9 %, wohingegen ein später Therapiestart (48 h p.i.) in einer signifikant erhöhten Sterblichkeit von 79,6 % resultierte (Abbildung 11 A). Von außen sichtbare Anzeichen einer murinen Pneumonie, wie schwerfällige Atmung, eitrige Augen oder ungepflegtes Fell, wurden in einem klinischen Score zusammengefasst und über den Infektionsverlauf hinweg dokumentiert. 24 h nach Infektion wiesen die Tiere einen signifikant erhöhten klinischen Score im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollgruppe auf. Mit Hilfe einer frühzeitigen Therapie konnten diese klinische Symptome bereits 12 h nach initialer Ampicillin-Gabe signifikant reduziert werden und blieben im weiteren Verlauf auf basalem Niveau. 48 h nach Infektion, zum Startpunkt der späten Therapie, zeigten sich vermehrt äußere Pneumonie-Symptome, wodurch es zu einem Anstieg des klinischen Scores kam. Dieser konnte durch eine späte Therapie nicht reduziert werden (Abbildung 11 B). Auch die Fähigkeit, die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten (Abbildung 11 C) und das Gewicht (Abbildung 11 D) der infizierten Tiere waren 24 h p.i. bereits signifikant vermindert, konnten aber durch die frühzeitige Antibiotikagabe innerhalb von 12 bis 24 erhöht werden.



Abbildung 11: Späte Antibiotika-Therapie schützt *S. pn.*-infizierte Mäuse nicht vor fataler Pneumonie.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). **A**. Kaplan-Meier Kurven der Überlebensrate der einzelnen Gruppen, Log-rank Test. **B**. Klinischer Score, Median und 25 – 75 % Interquartilsabstand, 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. Kruskal-Wallis Test/Dunn's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. **C**. Körpertemperatur und **D**. Körpergewicht der jeweiligen Gruppen. **C**, **D**: Mittelwert ± SEM, 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. **A** – **D**: :^{*}# p < 0,05 und ^{****/#####} p < 0,0001.

6.1.2 <u>Der Zeitpunkt der Antibiotika-Gabe hat keinen Einfluss auf die antibakterielle</u> Wirkung

Um den Verlauf der bakteriellen Eliminierung zu messen und die Wirksamkeit der frühen und späten Therapie zu kontrollieren, wurden Lavage-Flüssigkeit (BAL), Lungen-Homogenat und Blut der infizierten Tiere auf Kolonie-bildende Einheiten (CFUs) untersucht. Es zeigte sich, dass die Kinetik der Bakterien-Abtötung in allen untersuchten Organen nach frühem und spätem Therapiebeginn vergleichbar ablief: 48 h nach Therapiebeginn war die bakterielle Last im Alveolarraum auf ~ 10^4 CFUs reduziert, unabhängig vom Start der Behandlung (Abbildung 12 A). Zum Zeitpunkt 48 h p.i. war in der Lunge eine höhere bakterielle Last zu finden als 24 h

p.i. (Abbildung 12 B). Infolge der frühzeitigen Therapie konnten in der Ampicillin-Gruppe niedrigere Werte gemessen werden als in der kontrollbehandelten Gruppe, aber nur eine geringe Reduktion im Vergleich zum Therapiestart. Durch die späte Behandlung konnte keine signifikante Verminderung erreicht werden, jedoch waren Tendenzen sichtbar. Im Blut (Abbildung 12 C) konnten bereits 24 h p.i. Erreger detektiert werden. Hier war ebenfalls eine Eliminierung zu beobachten: 12 h nach Therapiebeginn war nach beiden Behandlungsstarts eine Reduktion um mehr als 99 % erreicht und im Laufe von 48 h Therapie konnte die Erreberlast auf 0 – 10 CFU/µl Blut reduziert werden.



Abbildung 12: Die Kinetik der Bakterien-Eliminierung mittels Antibiotika-Therapie ist nicht abhängig vom Therapiebeginn.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). Bakterielle Last in **A**. bronchoalveolärer Lavage (BAL), **B**. Homogenisierter Lunge und **C**. Blut. **A** - **C**: Median ± Interquartilsabstand, 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. Kruskal-Wallis Test/Dunn's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. **A** - **C**: ^{*/#} *p* < 0,05, ^{**/###} *p* < 0,001, ^{***/####} *p* < 0,001. CFU= Kolonie-bildende Einheiten

6.1.3 <u>Die Ampicillin-Therapie hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Leukozyten im</u> <u>Alveolarraum</u>

Residente und rekrutierte Immunzellen sind an der Bekämpfung eindringender Pathogene beteiligt [79]. Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Überlebensrate infolge beeinflusster Zellrekrutierung stattfanden, wurden mittels Durchflusszytometrie diverse Leukozyten-Populationen ausgewertet. Die Mehrzahl der rekrutierten Leukozyten waren PMNs, die zum Zeitpunkt 24 h p.i. allein 60 % der Leukozyten darstellten (Abbildung 13 A). Im Verlauf der Pneumonie verminderte sich die Neutrophilen-Population, allerdings unabhängig von der Ampicillin-Therapie, da keine Unterschiede zu den kontrolltherapierten Gruppen erkennbar waren. Die residenten AlvMs zeigten nach frühzeitigem Therapiebeginn keine signifikanten Unterschiede, weder zum Infektionsstart noch zu den Kontrollgruppen (Abbildung 13 B). Bei spätem Therapiebeginn war im weiteren Infektionsverlauf ein prozentualer, aber nicht in totalen Zellzahlen widergespiegelter Anstieg der Makrophagen erkennbar. Allerdings können die erhöhten prozentualen Anteile an AlvMs durch den Rückgang der PMNs erklärt werden. Die Anzahl an iMs stieg im Zuge der Infektion signifikant an (Abbildung 13 C), blieb aber von der Antibiotika-Therapie unbeeinflusst.



Abbildung 13: Ampicillin hat keinen Einfluss auf Leukozyten-Populationen im Alveolarraum.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). Totale Anzahl und Frequenzen von **A**. Neutrophilen (PMNs), **B**. Alveolären Makrophagen (AlvMs) und **C**. Inflammatorischen Monozyten / Makrophagen (iMs), gemessen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) zum Analysezeitpunkt. **D**. Repräsentative Dot Blots zur Illustration der Analyse der Populationen. **A** – **C**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. # p < 0,05, *## p < 0,01, ### p < 0,001 und #### p < 0,0001.

6.1.4 Frühzeitige und späte Antibiotika-Therapie reduzieren lokale Zytokin-Level

Residente und rekrutierte Zellen der Lunge produzieren nach direkter oder indirekter Stimulation von Pathogenen inflammatorische Mediatoren. Infolge früher und später Ampicillin-Therapie konnten die lokalen inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1β, TNF-α und IFN-y im Alveolarraum reduziert werden (Abbildung 14 A). Auch die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sank nach frühzeitiger Therapie. Im Gegensatz dazu konnte im Verlauf einer frühen antibakteriellen Behandlung vermehrt IL-12p40, der geteilten Untereinheit von IL-12 und IL-23, nachgewiesen werden. Nach einem späten Therapiebeginn sank die Konzentration von IL-12p40. Das Ausmaß der Inflammation in der Lunge sollte auch auf histologischer Basis untersucht werden. Dazu wurden von Dr. Kristina Dietert, PhD, aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Gruber an der Freien Universität Berlin die histopathologisch darstellbare Ausbreitung und Schwere der S. pn.-Infektion, Inflammation und induzierten Läsionen des Gewebes einzeln bewertet und zu einem Gesamtscore zusammenfasst (Inflammationsscore, Abbildung 14 B). Für diese Bewertung wurden die fixierte Lunge geschnitten und anschließend mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H & E) beurteilt (Abbildung 14 C). Infolge einer frühen Therapie zeigten die antibiotisch behandelten Tiere pathologisch deutlich geringere Anzeichen von Läsionen und Entzündungen, wodurch der Inflammationsscore der antibiotisch behandelten Tiere signifikant niedriger blieb als der der kontrollbehandelten Gruppen. Dies konnte nach später Therapie nicht beobachtet werden, hier gab es weder Unterschiede zum Therapiestart, noch zur entsprechenden Kontrollgruppe.



Abbildung 14: Verminderte Zytokin-Level im Alveolarraum nach antibakterieller Therapie und histologische Analysen.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (A: n = 9, B: n = 4). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9 bzw. 4). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7 bzw. 4) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9 bzw. 4). **A**. Zytokin-Konzentrationen, in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, Mittelwert ± SEM, **B**. Inflammationsscore, zusammengestellt aus histologischen Inflammationsparametern der Lunge, Median ± Interquartilsabstand, Score-Einteilung: 0: nicht betroffen, 1: vereinzelt, 2: geringgradig, 3: mittelgradig, 4: hochgradig, 5: massiv. **C**: Repräsentative H & E Färbung ganzer Lungenschnitte. **A**, **B**: 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. **A**. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test und **B**. Kruskal-Wallis Test/Dunn's *multiple comparison* Test für den Vergleich Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. */# *p* < 0,001, ***/#### *p* < 0,001.

6.1.5 <u>Eine antibakterielle Therapie vermindert unabhängig vom Startzeitpunkt lokale</u> <u>Konzentrationen einzelner</u>

Lokale alveoläre Chemokine sorgen für die Rekrutierung von Leukozyten. In 6.1.3 konnte gezeigt werden, dass lokale Leukozyten-Populationen unbeeinflusst waren von einer antibakteriellen Therapie. Gleichbleibende Chemokin-Konzentrationen könnten dafür ursächlich gewesen sein und wurden aus diesem Grund ebenfalls analysiert. Der alveoläre Proteingehalt an CCL3 und CCL2, beides Monozyten-rekrutierende Chemokine, war nach einer frühen Behandlung deutlich niedriger als zu Therapiestart oder in den Kontrolltieren (Abbildung 15). Nach spätem Therapiebeginn zeigte sich 60 h p.i. ebenfalls eine tendenzielle Reduktion dieser Chemokine, welche im späteren Verlauf auch in den kontrollbehandelten Tieren nachgewiesen wurde. Der Wachstumsfaktor G-CSF scheint die Mobilisierung von Neutrophilen in einer Infektion zu regulieren [165], während GM-CSF beispielsweise die antiinflammatorische Immunantwort von AlvMs beeinflusst [166]. Die Kinetik von G-CSF spiegelte die von CCL2 wieder, während es nach frühzeitiger Therapie zu einem kurzfristigen Anstieg von GM-CSF kam. Auch hier sanken die Konzentrationen im Zuge der S. pn.-Infektion in den Ampicillin-therapierten Tieren in gleichem Maße wie in der Kontrollgruppe. Die CXCR2-Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL5 sind für die Neutrophilen Rekrutierung wichtig [167]. Im Laufe der Infektion stiegen die Konzentrationen dieser drei Chemokine in den infizierten, kontrollbehandelten Tieren an. Im Anschluss an eine Antibiotika-Therapie sanken die CXCL1 und CXCL2-Level, während CXCL5 erhöht blieb. Analog zu GM-CSF zeigte sich auch hier ein kurzfristiger Anstieg nach frühzeitigem Therapiebeginn.



Abbildung 15: Regulierte Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im Alveolarraum nach antibakterieller Therapie

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). Die Chemokine und Wachstumsfaktoren wurden in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bestimmt. Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. */# p < 0,05, **/## p < 0,01 und ***/### p < 0,001.

6.1.6 <u>Zirkulierende Immunzell-Populationen werden weder von früher noch von</u> später antibakterieller Therapie beeinflusst

Um auch über die systemische Immunantwort infolge der frühzeitigen und verspäteten antimikrobiellen Behandlung Aussagen treffen zu können, wurden mit Hilfe eines Hämatologiegerätes im Blut der Tiere Neutrophile, Monozyten, Eosinophile und Thrombozyten bestimmt. Die Frequenzen, aber nicht die totalen Zellzahlen an PMNs waren im Anschluss an eine frühe Ampicillin-Therapie reduziert (Abbildung 16 A). 24 h p.i., zu Beginn des frühen Behandlungsstarts, war ein signifikanter Anstieg an Monozyten im Vergleich zur kontrollinfizierten Gruppe zu vermerken (Abbildung 16 B). Im Laufe der Infektion sank dieser Wert, allerdings unabhängig von Ampicillin. Eosinophile waren ebenfalls nicht von einer Therapie beeinflusst, allerdings zeigten sich analog zu den PMNs auch hier verminderte Frequenzen infolge eines frühzeitigen Therapiestarts (Abbildung 16 C). Die Konzentration an Thrombozyten schien weder durch eine Infektion noch durch die nachfolgende Behandlung beeinflusst zu werden (Abbildung 16 D). Allerdings schien der Gesamtanteil an festen Bestandteilen im Blut, auch als Hämatokrit bezeichnet, durch die S. pn.-Infektion anzusteigen (Abbildung 16 E). Im Zuge einer frühen Ampicillin-Therapie sank der Wert im Vergleich zum Therapiestart, aber auch zu den kontrollbehandelten Tieren. Im Anschluss an eine späte Therapie ließ sich dieser Effekt nicht beobachten.



Abbildung 16: Eine antibakterielle Therapie hat keinen Einfluss auf Leukozyten- und Thrombozyten-Konzentrationen im Blut, jedoch auf den Hämatokrit.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). Die Bestimmung von **A**. Neutrophilen (PMNs), **B**. Monozyten, **C**. Eosinophilen (Eos), **D**. Thrombozyten und **E**. Hämatokrit (HCT) erfolgte mit einem Hämatologiegerät. **A** – **E**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. */# *p* < 0,05, **/## *p* < 0,001.

6.1.7 <u>Frühe, aber nicht späte antibakterielle Therapie verhindert den systemischen</u> <u>Anstieg inflammatorischer Mediatoren</u>

Infolge einer lokalen Inflammation in der Lunge kommt es oftmals zur systemischen Ausbreitung von Bakterien und Entzündung. Dies kann einerseits durch den aktiven Übertritt der Bakterien ins Blutsystem geschehen, wo es zu einer sekundären Entzündungsreaktion kommt oder als Folge einer geschädigten alveolokapillären Barriere eintreten, wodurch ein unkontrollierter Übertritt inflammatorischer Mediatoren aus der Alveole ins Blutsystem möglich ist. Zum Zeitpunkt 24 h p.i. konnten im Serum im Vergleich zu scheininfizierten Kontrolltieren keine erhöhten Proteinkonzentrationen der Zytokine (z.B. IL-6, TNF- α oder IFN-y; Abbildung 17 A) und Chemokine (z.B. CCL2 und CXCL1) sowie G-CSF (Abbildung 17 B) festgestellt werden. Eine frühe Ampicillin-Therapie, begonnen 24 h p.i., beugte dem Anstieg dieser Werte S. pn.-infizierte, kontrollbehandelte Tiere stark vor, wohingegen erhöhte Serumkonzentrationen dieser inflammatorischen Mediatoren aufwiesen. Zum Zeitpunkt 48 h p.i., bevor mit der späten Therapie begonnen wurde, waren die systemischen Zytokinwerte im Vergleich zu 24 h p.i. um das 10- bis 12-fache erhöht (IL-6 bzw. TNF-a). Auch bei den systemischen Chemokinen (Abbildung 17 B) zeigte sich, dass zum Zeitpunkt 48 h p.i. 5- bis 90-fach (CXCL1 bzw. CCL3) erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu 24 h p.i. messbar waren. Im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren konnte im Anschluss an diese späte antibakterielle Therapie keine signifikante Reduktion der Zytokin- oder Chemokin-Konzentrationen beobachtet werden. Lediglich bei TNF-a zeigten sich tendenzielle Unterschiede zwischen den Gruppen, diese waren aber nicht signifikant. Eine Reduktion der systemischen Inflammation konnte nach später Therapie erst zwei bis drei Tage nach Behandlungsstart und im späten Verlauf der Pneumonie beobachtet werden.

Systemische IL-10-Konzentrationen waren nur vereinzelt messbar. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen oder in Abhängigkeit vom Therapiestart beobachtet werden. IL-1 β ließ sich im Serum nicht nachweisen (Daten nicht gezeigt).

Systemische CXCL5-Konzentrationen ließen sich nicht auswerten, weil der Vorgang der Serum-Aufbereitung eine unkontrollierte CXCL5-Ausschüttung durch aktivierte Thrombozyten induziert.



Abbildung 17: Frühzeitige, jedoch nicht späte antibakterielle Therapie verhindert systemische Inflammation.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). Im Serum der analysierten Tiere wurden **A**. Zytokine, **B**. Chemokine und G-CSF gemessen. **A**, **B**: Mittelwert ± SEM; 2way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. */# p < 0,05, **/## p < 0,01, ***/### p < 0,001

6.1.8 <u>Eine frühzeitige antibakterielle Therapie schützt vor Entwicklung von Pleuritis,</u> <u>Steatitis und Leberschädigung</u>

Im Laufe einer Pneumonie kann es zu einer Schädigung sekundärer Organe und einer Entzündung des Brustfells oder des die Lunge umgebenden Fettgewebes kommen. Vor allem die Entzündung des Brustfells (Pleuritis) ist bei Patienten oftmals mit symptomatischen Atemschmerzen verbunden.

Die histologischen Analysen zur Untersuchung der Ausprägung der Entzündung von Brustfell und Fettgewebe wurden erneut von Dr. Kristina Dietert, PhD durchgeführt. Zum Zeitpunkt 24 h p.i. war noch kein signifikanter Unterschied zu den kontrollinfizierten Tieren sichtbar. Eine frühzeitige Therapie schützte vor der Entstehung einer Pleuritis (Abbildung 18 A), wohingegen diese 48 h p.i. bereits hochgradig ausgeprägt war und anschließend an einen späten Behandlungsstart nicht therapiert werden konnte. Analoge Ergebnisse zeigten sich für die Entwicklung einer Steatitis, einer Entzündung des die Lunge umgebenden Fettgewebes (Abbildung 18 B). Zur Analyse von Laborwerten wurden in den Serumproben im Labor von LABOklin (Bad Kissingen) die Konzentrationen der Aspartat-Aminotransferase (AST), einem Marker für Leberschädigung gemessen (Abbildung 18 C). Erhöhte AST-Werte zeigten sich 48 h p.i., aber nicht 24 h p.i. Ein früher Therapiestart verhinderte auch hier den Anstieg der AST-Werte, wohingegen ein später Start keine Reduktion der bereits erhöhten Werte bewirken konnte.


Abbildung 18: Frühzeitige, jedoch nicht späte antibakterielle Therapie schützt vor der Entwicklung von Pleuritis, Steatitis und Leberschädigung.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (A, B: n = 4, C: n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 4 bzw. 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 4 bzw. 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 4 bzw. 9). Histologische Analysen zur Ermittlung des Schweregrades von **A**. Pleuritis und **B**. Steatitis. **C**. Zur Untersuchung der Lungenschädigung wurde im Serum der Tiere Aspartat-Aminotransferase (AST) bestimmt. **A**, **B**: Score-Einteilung: 0: nicht betroffen, 1: vereinzelt, 2: geringgradig, 3: mittelgradig, 4: hochgradig, 5: massiv. Median ± Interquartilsabstand, **C**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test oder **A**, **B**. Kruskal-Wallis Test/Dunn's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. und **C**. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. * *p* < 0,05, ** *p* < 0,01, *** *p* < 0,001 und ****/#### *p* < 0,0001.

6.1.9 <u>Nur eine frühe Therapie zeigt einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines</u> perivaskulären Ödems

Die Erfassung der Ödembildung in der Lunge ist in der Pneumonie von besonderer Bedeutung, da es infolge dieser Flüssigkeitsansammlungen in Alveole und Interstitium zur Atemnot kommt und der Patient nur noch beeinträchtigt Sauerstoff aufnehmen kann [168].

Bei der Bildung von Ödemen kommt es zum Übertritt von Flüssigkeit aus dem Blut in das Interstitium (perivaskuläres Ödem) oder später in die Alveolen (alveoläres Ödem) der Lunge. Grundlage dafür ist eine erhöhte vaskuläre Permeabilität. Die histopathologische Auswertung zur Ausprägung der Ödeme wurde an H & E gefärbten Lungenschnitten mit Hilfe von Scores evaluiert. Bereits 24 h nach einer *S. pn.*-Infektion zeigte sich ein perivaskuläres Ödem (Abbildung 19 A, repräsentative Bilder in Abbildung 19 C). Innerhalb von 48 h konnte auch ein alveoläres Ödem nachgewiesen werden (Abbildung 19 B, repräsentative Bilder in Abbildung 19 D). Das perivaskuläre Ödem konnte nach frühem Therapiestart im Vergleich zur lösungsmittelbehandelten Kontrollgruppe zunächst reduziert werden, nahm allerdings im Laufe der Infektion erneut tendenziell zu (Abbildung 19 A und C). Eine späte Therapie hatte dahingegen keine Auswirkung auf die Ausbreitung des perivaskulären Ödems. Das Ausmaß des alveolären Ödems zeigte sich tendenziell geringer als das des perivaskulären Ödems. Eine frühzeitige antibakterielle Behandlung bewirkte eine tendenzielle, aber nicht signifikante Reduktion der Ausbreitung des alveolären Ödems im Vergleich zur Kontrollgruppe, wohingegen eine späte Behandlung keinen Therapieeffekt zeigte.



Abbildung 19: Die frühe antibakterielle Behandlung hat einen therapeutischen Effekt auf die Ödemausprägung.

Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 4). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 4). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 4) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 4). Histologische Scores zur Quantifizierung des Schweregrades an **A**. perivaskulärem und **B**. alveolärem Ödem. Score-Einteilung: 0: nicht betroffen, 1: vereinzelt, 2: geringgradig, 3: mittelgradig, 4: hochgradig, 5: massiv. **A**, **B**: Median ± Interquartilsabstand; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillinversus Lösungsmittel-Behandlung. Kruskal-Wallis Test/Dunn's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. * zeigt einen Unterschied zwischen Gruppen zum selben Zeitpunkt an, # zeigt den Unterschied zum Therapiestart an. */# p < 0,05, ** p < 0,01 und ***# p <0,0001. Repräsentative H & E Färbung zur Darstellung von alveolärem (*) und Perivaskulärem (#) Ödem nach **C**. frühzeitiger und **D**. später Therapie mit Ampicillin oder Lösungsmittel (0,9 % NaCl). Maßstabsbalken: 100 µm.

6.1.10 <u>Ein frühzeitiger Therapiebeginn verhindert die Schädigung der alveolokapillären</u> <u>Barriere</u>

Eine weitere Möglichkeit, die Integrität der alveolokapillären Barriere zu untersuchen, ist neben der histologischen Analyse der Ödemausprägung eine Quantifizierung von Makromolekülen in Blut und Alveolarraum. Dazu wurden die Konzentrationen an murinem Serumalbumin (MSA) in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Serum der analysierten Tiere mittels ELISA bestimmt. MSA ist ein Protein mit einem molekularen Gewicht von 67 kDa, welches im Blut zu finden ist und unter physiologischen Bedingungen nicht die alveolokapilläre Barriere übertritt. Bei einem Integritätsverlust der Barriere kann man dieses Protein aber auch im Alveolarraum nachweisen. Je höher das Verhältnis von MSA in BALF zu Serum, desto ausgeprägter ist demnach die Schädigung der alveolokapillären Barriere. 24 h p.i. konnte noch keine vermehrte Schädigung im Vergleich zur Lösungsmittel-infizierten Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 20 A). Der frühe Beginn der Ampicillin-Therapie verhinderte einen weiteren Anstieg, wodurch signifikante niedrigere Werte als bei den infizierten, lösungsmittelbehandelten Kontrolltieren gemessen werden konnten. 48 h nach der S. pn.-Infektion war eine signifikante Erhöhung der vaskulären Permeabilität im Vergleich zur Kontrollgruppe messbar. Ein später Therapiebeginn konnte diese entstandene Schädigung nicht beheben.

VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der die Zellen der alveolokapillären Barriere beeinflussen und somit die Permeabilität erhöhen kann und beispielsweise von Neutrophilen nach *S. pn.*-Stimulation sekretiert wird [56, 169]. Analog zur Permeabilität zeigte sich, dass ein frühzeitiger Therapiestart einen signifikanten Rückgang der VEGF-Konzentration im Alveolarraum bewirkte, während dies nach einer verzögerten Behandlung nicht der Fall war (Abbildung **20** B).



alveolokapillären Barriere und reduziert lokale VEGF-Level. Die Mäuse wurden mit *S. pn.* infiziert (n = 9). Beginnend 24 h (blau) bzw. 48 h (rot) nach Infektion wurden Behandlungsgruppen mit Ampicillin therapiert (n = 9). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 7) bzw. mit Lösungsmittel behandelt (0,9 % NaCl, n = 9). **A**. Quantifizierung der Permeabilität der alveolokapillären Barriere mittels Messung von murinem Serumalbumin (MSA) in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Serum. **B**. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in BALF. **A**, **B**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test für den Vergleich von Ampicillin- versus Lösungsmittel-Behandlung. 1-way ANOVA/Dunnett's *multiple comparison* Test für den Vergleich zu unbehandelten, *S. pn.*-infizierten Tieren zu Therapiebeginn. */# *p* < 0,05 und **/## *p* < 0,01.

6.2 Der Einfluss des Chemokins CXCL5 auf Neutrophile-Rekrutierung und Lungenschädigung in der Streptokokken-induzierten Pneumonie

Neutrophile gehören in vielen Inflammationsmodellen zu den ersten Zellen, die zum Ort der Infektion rekrutiert werden. Dies konnte im Zuge dieser Arbeit auch für die Pneumokokkeninduzierte Pneumonie in der Maus festgestellt werden (siehe 6.1.3). Für die Migration von PMNs in den Alveolarraum scheinen der Oberflächenrezeptor CXCR2 und seine Liganden bei vielen Erkrankungen eine tragende Rolle zu spielen, was beispielsweise in einem murinen Tuberkulose-Modell gezeigt werden konnte [67]. Ebenfalls wurde in jener Arbeit dargestellt, dass von den drei für die PMN-Rekrutierung wichtigen CXCR2 Liganden (CXCL1, CXCL2 und CXCL5) CXCL5 als erstes in der Lavageflüssigkeit infizierter Tiere nachweisebar und allein für mehr als 50 % der rekrutierten Neutrophilen zuständig war. Daten von Yamamoto *et al.* zeigten, dass nach LPS- oder Pneumokokken-Stimulation CXCL5 von Epithelzellen sekretiert wird und in diesem Modell ebenfalls eine Rolle bei der Neutrophile-Rekrutierung zu haben scheint [65, 170]. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welche detaillierten Funktionen CXCL5 in der Pneumonie hat und ob eine mögliche Reduktion der PMNs einen therapeutischen oder nachteiligen Effekt auf den Verlauf der Infektion mit sich bringt.

6.2.1 Die CXCR2 Liganden werden in vivo nach S. pn-Infektion sekretiert

Verschiedene Pneumokokken Stämme unterscheiden sich durch den Aufbau der Kapsel, die die Bakterien umkleidet (siehe 0). Zunächst sollte untersucht werden, ob neben dem bereits untersuchten *S. pn.* Serotyp 3 (Abbildung 21 A) auch Serotyp 2 zur Sekretion der CXCR2 Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL5 führt (Abbildung 21 B). Ein signifikanter Anstieg der Chemokin-Konzentrationen im Alveolarraum gegenüber kontrollinfizierter Tiere konnte für beide untersuchten Serotypen gemessen werden. Beide Serotypen waren demnach in der Lage, die Sekretion der untersuchten Chemokine zu induzieren. CXCL5 zeigte dabei im Vergleich zu CXCL1 und CXCL2 bei beiden untersuchten Serotypen den höchsten Anstieg zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Infektion. Während die Konzentration von CXCL5 im Anschluss an die Serotyp 3-Infektion im weiteren Verlauf tendenziell absank, nahm sie während der Serotyp 2-Infektion weiter zu. Zum Zeitpunkt 48 h p.i. waren die Proteinlevel nach Serotyp 3- (Mittelwert: 0,46 ng/ml) und Serotyp 2-Infektion (Mittelwert: 0,42 ng/ml) vergleichbar hoch. Im Gegensatz dazu stiegen die Proteinkonzentrationen der CMCL1 und CXCL2 im Verlauf einer Serotyp 3-Infektion stärker an als infolge einer Serotyp 2-Infektion.



6.2.2 Epithelzellen sind die Hauptquelle der CXCL5 Sekretion in der Mauslunge

Yamamoto *et al.* beschreiben in einem *in vivo* Modell, dass Epithelzellen (EpiCs) die Hauptquelle für CXCL5 nach einer *S. pn.*-Infektion in der Lunge sind [170]. Um diese Hypothese zu bestätigen und zusätzlich zu untersuchen, welche Zelltypen der Lunge CXCL1 und CXCL2 sekretieren, wurden verschiedene Lungen-residente oder -rekrutierte Zellpopulationen isoliert und mit *S. pn.* stimuliert. CXCL1 wurde infolge einer Pneumokokken-Infektion hauptsächlich von AlvMs (Abbildung 22 A), Epithelzellen (Abbildung 22 B) und Endothelzellen (Abbildung 22 C) sekretiert. AlvMs sekretieren neben CXCL1 auch CXCL2, ebenso wie PMNs (Abbildung 22 D). Auch EpiCs und Endothelzellen scheinen infolge einer *S. pn.*-Stimulation geringe Mengen CXCL2 zu sekretieren. CXCL5 wird von EpiCs und Thrombozyten (Abbildung 22 E) sekretiert. Da in den anschließenden *in vitro* Experimenten auf eine EpiC Zelllinie zurückgegriffen werden sollte, wurde diese wie die Primärzellen infiziert. Es zeigten sich weitestgehend analoge Sekretionsmuster (Abbildung 22 F), denn auch im Überstand der Zelllinie waren die Chemokine CXCL1 und CXCL5 nach *S. pn.*-Infektion in hohen Konzentrationen nachweisbar, allerdings konnte hier keine CXCL2 Sekretion nachgewiesen werden.



in vitro. **A**. Alveoläre Makrophagen, **B**. Lungen Epithelzellen, **C**. Lungen Endothelzellen, **D**. Neutrophile aus Knochenmark (PMNs), **E**. Thrombozyten aus dem Blut, und **F**. eine Epithel Zelllinie (T7) wurden mit *S*. *pn*. Serotyp 2 infiziert. Als Kontrolle wurde mit Lösungsmittel (1 × PBS) infiziert.

Die Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 wurden im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Versuche wurden 2 bis 3-mal unabhängig durchgeführt, repräsentative Experimente wurden für diese Darstellung ausgewählt. **A** – **F**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test. * p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 und ****p < 0.0001. n.n. = nicht nachweisbar.

6.2.3 Die Sekretion der CXCR2 Liganden von Epithelzellen ist TLR2-abhängig

Es ist bekannt, dass Oberflächenproteine von *S. pn.* von *toll-like* Rezeptoren (TLRs) erkannt werden. Lipoproteine können an die Rezeptoren TLR1, TRL2 und TLR6 binden. In einem Reportergen-Assay konnte bereits demonstriert werden, dass für eine *S. pn.*-induzierte Immunantwort TLR2 notwendig ist [134]. Dies sollte nun auch für Epithelzellen nachgewiesen werden. CXCL1 und CXCL5 wurden von T7 Zellen nach *S. pn.*-Infektion vermehrt sekretiert. Dies konnte durch eine vorherige Inkubation mit einem anti-TLR2 Antikörper inhibiert werden (Abbildung 23). Kein Einfluss konnte auf die CXCL2-Sekretion beobachtet werden. Hier waren nur vereinzelt Werte messbar, die meisten befanden sich unter dem Detektionslimit des ELISAs.



Abbildung 23: Die epitheliale Sekretion von CXCL1 und CXCL5 geschieht in Abhängigkeit vom *toll-like* Rezeptor 2 (TLR2).

T7 Zellen wurden mit einem anti-TLR2 Antikörper bzw. Lösungsmittel (1 × PBS) inkubiert und anschließend mit *S. pn.* Serotyp 2 infiziert. Zur Kontrolle wurden die Zellen analog mit Lösungsmittel infiziert. Die Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 wurden im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Die Versuche wurden 2-mal unabhängig durchgeführt, repräsentative Ergebnisse wurden für diese Darstellung ausgewählt. Mittelwert + SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test.

6.2.4 <u>Die Abwesenheit von CXCL5 resultiert in einer stark verminderten Neutrophile-</u> <u>Rekrutierung</u>

Während in einem Tuberkulose-Modell CXCL5 für eine verstärkte Neutrophile-Rekrutierung sorgt [67], scheint nach einer *E. coli* Infektion CXCL5 eine eher hemmende Wirkung zu besitzen und andere Chemokine oder Zytokine für die Migration der PMNs essentiell zu sein [171]. Infolge einer *S. pn.*-Infektion von WT und *Cxcl5*-Knockout Mäusen (*Cxcl5*^{-/-}) zeigte sich zum Zeitpunkt 24 h p.i. eine Verminderung der Neutrophile-Rekrutierung im Alveolarraum um 67 %, während keine Unterschiede zwischen den kontrollinfizierten Tieren zu beobachten waren (Abbildung 24 A). Im Blut zeigte sich zum selben Zeitpunkt keine signifikant veränderte Größe der Granulozyten Population (Abbildung 24 B).



wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 8). Neutrophile wurden in \mathbf{A} . bronchoalveolären Lavage (BAL) mittels FACS und \mathbf{B} . Blut mit Hilfe eines Hämatologie-Gerätes bestimmt. \mathbf{A} , \mathbf{B} : Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. **** p < 0,0001.

6.2.5 Trotz erhöhter bakterieller Last ist die Mortalität nicht beeinflusst

Neutrophile scheinen einen essentiellen Beitrag bei der Eliminierung von Pathogenen zu leisten [117], wurden in $Cxc/5^{-/-}$ Mäusen aber vermindert in den Alveolarraum rekrutiert. Die bakterielle Last der infizierten Tiere wurde zum Zeitpunkt 24 h p.i. untersucht. Es zeigte sich, dass im Alveolarraum (Abbildung 25 A) und im Lungengewebe (Abbildung 25 B) in Abwesenheit von CXCL5 signifikant erhöhte Mengen des Erregers nachweisbar waren. In Blut (Abbildung 25 C) und Milz (Abbildung 25 D) zeigten sich keine Unterschiede zwischen der WT und der $Cxc/5^{-/-}$ Gruppe. Trotz erhöhter bakterieller Last konnte kein nachteiliger Effekt auf die Überlebensrate der Tiere nachgewiesen werden: Die Mortalität der $Cxc/5^{-/-}$ Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Mortalität der WT Gruppe (Abbildung 25 E).



WT und $Cxc/5^{-/-}$ Mäuse wurden mit *S. pn.* Serotyp 2 infiziert (n = 14). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 8). *Colony Forming Units* (CFU) in **A**. bronchoalveolärer Lavage (BAL), **B**. Lunge, **C**. Blut und **D**. Milz. **A** – **D**: Zur verbesserten Darstellung und statistischen Auswertung nach der Formel Y=Y+1 modifiziert und anschließend logarithmiert. Median ± Interquartilsabstand; Mann Whitney Test. ** p < 0,01 und **** p < 0,0001. **E**. Kaplan-Meier Test der Überlebensrate der einzelnen Gruppen, Log-rank Test.

6.2.6 <u>Die Abwesenheit von CXCL5 beeinflusst neben Neutrophilen auch alveoläre</u> <u>Makrophagen im Alveolarraum</u>

Alveoläre Makrophagen haben eine wichtige Aufgabe in der Beseitigung von Pathogenen, aber auch Überresten körpereigener Zellen wie apoptotischer PMNs [83, 84]. Durch diese Phagozytose-Prozesse kann eine Schädigung des umliegenden Gewebes vermindert werden. Dabei kommt es allerdings in vielen Infektionen auch zu einem Rückgang dieses Zelltyps, was wiederum zu einer länger anhaltenden Inflammation führen kann. In *Cxcl5^{-/-}* Tieren waren nach einer *S. pn.*-Infektion trotz erhöhter bakterieller Last (siehe 6.2.5) signifikant mehr AlvMs im Alveolarraum nachweisbar als in der WT Gruppe (Abbildung 26 A). Die Rekrutierung anderer Immunzellen wie iMs (Abbildung 26 B) und DCs (Abbildung 26 C) war durch die Abwesenheit von CXCL5 und der damit verbundenen verminderten Migration von Neutrophilen nicht beeinflusst.



Abbildung 26: In *S. pn.*-infizierten Tieren sind alveoläre Makrophagen, aber nicht inflammatorische Monozyten / Makrophagen oder dendritische Zellen, durch eine *Cxcl5* Deletion beeinflusst.

WT und *Cxcl5^{-/-}* Mäuse wurden mit *S. pn.* Serotyp 2 infiziert (n = 14). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 8). **A**. Alveoläre Makrophagen (AlvMs), **B**. Inflammatorische Monozyten / Makrophagen (iMs) und **C**. Dendritische Zellen (DCs) wurden in der bronchoalveolären Lavage mittels FACS gemessen. **A** – **C**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. ** p < 0,01 und **** p < 0,0001.

6.2.7 <u>CXCL5</u> beeinflusst keine weiteren inflammatorischen Mediatoren in <u>Alveolarraum und Blut</u>

Da Neutrophile selbst inflammatorische Mediatoren sekretieren oder andere Zelltypen zur Expression entsprechender Gene stimulieren können, wurden im Alveolarraum (Abbildung **27** A) und im Blut (Abbildung **27** B) eine Vielzahl an Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren mit einem Multiplex-Assay gemessen. Es zeigten sich keine unterschiedlichen Konzentrationen der Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α oder IFN- γ . Auch die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF blieben durch die *Cxcl5* Deletion unverändert. Die Chemokine CCL2, CCL3 und CXCL1 waren ebenfalls gleichbleibend zwischen den Gruppen und es konnten keine signifikanten Unterschiede in Lavageflüssigkeit oder Plasma detektiert werden. Erwartungsgemäß führte die Deletion des *Cxcl5* Gens dazu, dass in den WT Tieren signifikant mehr CXCL5 gemessen wurden als in der Knockout Gruppe.



Deletion nicht beeinflusst.

WT und *Cxcl5^{-/-}* Mäuse wurden mit *S. pn.* Serotyp 2 infiziert (n = 14). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 8). Die Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren wurden in **A**. Alveolarraum und **B**. Plasma der Tiere mittels Multiplex bestimmt. Abkürzungen: BAL: Bronchoalveoläre Lavage, IL: Interleukin, TNF: Tumornekrosefaktor, IFN: Interferon, G-CSF: Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, GM-CSF: Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor. **A**, **B**: Mittelwert + SEM; 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test. **** *p* < 0,0001.

6.2.8 Im Zuge einer Serotyp 2-Infektion schützt die Abwesenheit von CXCL5 nicht vor Ödem-Entwicklung oder der bakteriellen Ausbreitung in die Peripherie

Analog zu einer Infektion mit Serotyp 3 Pneumokokken konnte bei mit Serotyp 2-infizierten WT Mäusen zum Zeitpunkt 24 h p.i. ein tendenzieller Anstieg der histopathologischen Anzeichen einer Pneumonie, zusammengefasst als Inflammationsscore, beobachtet werden (Abbildung 28 A und vergleiche Abbildung 14 B). Bei den *Cxcl5*-defizienten Tieren wurden zum WT vergleichbare Scores ermittelt. Im analysierten Zeitraum von 24 h nach einer *S. pn.*-Infektion wurde in keinem der Genotypen eine Entwicklung von alveolären Ödemen beobachtet (nicht dargestellt), allerdings konnten bereits minimal bis mittelgradig ausgebildete perivaskuläre Ödeme histologisch dargestellt werden (Abbildung 28 B). Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Cxcl5^{-/-}* Tieren festgestellt. Die Ausbreitung der Pneumokokken und eine damit zusammenhängende leichte Entzündung des die Lunge umgebenden Fettgewebes (Steatitis, Abbildung 28 C) konnte bei zwei von fünf Tieren 24 h p.i. in beiden Gruppen beobachtet werden. Anzeichen einer Entzündung des Brustfells (Abbildung 28 D) waren ebenfalls bei einzelnen Tieren beider Gruppen feststellbar. Beide *S. pn.*-infizierte Gruppen zeigten Anzeichen einer eitrigen Entzündung im Zuge der Pneumonie, die bei den mit 1 × PBS scheininfizierten Kontrolltieren nicht darstellbar waren (Abbildung 28 E).



Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 3). A. Inflammationsscore, zusammengestellt aus histologischen Inflammationsparametern der Lunge. Histologische Scores zur Quantifizierung des Schweregrades an B. Perivaskulärem Ödem, C. Steatitis und D. Pleuritis. A – D: Median \pm Interquartilsabstand. Score-Einteilung: 0: nicht betroffen, 1: vereinzelt, 2: geringgradig, 3: mittelgradig. 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. * *p* < 0,05. E. Repräsentative H & E Färbung scheininfizierter (oben) und S. pn.-infizierter (unten) WT (links) und *Cxcl5*-KO (rechts) Tiere zur Darstellung der eitrigen Pneumonie (*).

6.2.9 <u>Die Abwesenheit von CXCL5 vermindert die Schädigung der alveolokapillären</u> <u>Barriere</u>

Durch die Endothel- und Epithelschicht der alveolokapillären Barriere eindringende, aktivierte Neutrophile können zu einer Schädigung dieser schützenden Zellschicht zwischen Alveole und Blutgefäß führen [110-112]. Die Quantifizierung der Schrankenstörung zeigte, dass *Cxcl5*-defiziente Tiere zum Zeitpunkt 24 h p.i. niedrige Permeabilitätswerte aufwiesen, wohingegen WT Tiere bereits eine Störung der alveolokapillären Barriere zeigten (Abbildung 29 A). Ein Wachstumsfaktor, der zu einer Dissoziation der inter-endothelialen und -epithelialen Zell-Zell-Verbindungen führen kann, ist VEGF [74]. Dieser Wachstumsfaktor wird unter anderem von Neutrophilen, aber auch von inflammatorischen Monozyten / Makrophagen produziert und scheint neben seinem schädigenden Effekt und seiner Neutrophile-rekrutierenden Wirkung auch wichtig zu sein für die Gewebe-Reparatur [172]. Analog zu den reduzierten Permeabilitätswerten zeigten *Cxcl5^{-/-}* Tiere ebenfalls niedrige VEGF-Konzentrationen im Alveolarraum.



Abbildung 29: Die Abwesenheit von CXCL5 schützt vor Barriereschädigung nach S. pn.-Infektion.

WT und $Cxc/5^{-/-}$ Mäuse wurden mit *S. pn.* Serotyp 2 infiziert (n = 14). Kontrollgruppen wurden mit Lösungsmittel scheininfiziert (1 × PBS, n = 8). **A**. Die Bestimmung der Permeabilität der alveolokapillären Barriere erfolgte mittels Quantifizierung von murinem Serumalbumin (MSA) in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Plasma. **B**. Die Bestimmung von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) aus der BALF erfolgte mittels ELISA. **A**, **B**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. * p < 0,05 und *** p < 0,001.

6.3 Der Einfluss des Chemokins CXCL5 auf Neutrophile-Rekrutierung und Lungenschädigung in einem Modell mechanischer Beatmung

Die Rolle von CXCL5 auf die alveolokapillären Barriere sollte auch unabhängig von einer bakteriellen Infektion untersucht werden, weshalb ein Modell einer sterilen Lungenschädigung eingesetzt wurde. Dazu wurden Mäuse mit einem Beatmungsgerät unter Einsatz hoch- und niedrigvolumiger Tidalvolumina ventiliert. Mit diesem Modell kann die Situation von Patienten

auf der Intensivstation simuliert und der Effekt einer mechanischen Beatmung auf Zell-Rekrutierung, Lungenfunktion und Barriereschädigung untersucht werden.

6.3.1 <u>Mechanische Beatmung induziert die Sekretion von CXC-Chemokinen und</u> <u>Neutrophile-Infiltration *in vivo*</u>

Auch im Zuge einer sterilen Inflammation kommt es zu einer Rekrutierung von Neutrophilen. Dies kann beispielsweise durch Signale nekrotisierender Zellen eingeleitet werden [173, 174]. Im Zuge einer Ventilation mit hohem Tidalvolumen (HVT) über 240 min kam es in WT Tieren zur vermehrten Sekretion der CXCR2-Liganden CXCL1 und CXCL5 im Vergleich zur nichtventilierten (NV) WT Kontrollgruppe (Abbildung 30 A - C). Kein Einfluss konnte auf die Sekretion von CXCL2 gemessen werden. Zwischen nicht-ventilierten WT und $Cxc/5^{-/-}$ Tieren konnte kein Unterschied der Sekretion der CXC-Chemokine beobachtet werden. Infolge der vierstündigen Beatmung mit hohem Tidalvolumen zeigte sich jedoch eine verminderte CXCL1-Sekretion in der $Cxc/5^{-/-}$ Gruppe im Vergleich zu den WT Tieren.



Abbildung 30: Induktion der Ausschüttung von CXCL1 und CXCL5 nach hochvolumiger mechanischer Beatmung *in vivo*.

WT und $Cxc/5^{-/-}$ Mäuse wurden für 10 min mit einem Tidalvolumen von 9 mg/kg (NV: nicht ventiliert, n = 8-9) oder für 240 min (HVT: hochvolumige Ventilation, n = 8-15) mit einem Tidalvolumen von 33 ml/kg beatmet. **A**. CXCL1, **B**. CXCL2 und **C**. CXCL5 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, bestimmt mittels ELISA. **A** – **C**: Mittelwert + SEM. 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. * p < 0.05 und **** p < 0.0001.

6.3.2 <u>Mechanische zyklische Dehnung induziert die Ausschüttung von CXC-</u> Chemokinen und VEGF *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die mechanische Belastung der Epithelzellen ursächlich war für die erhöhten Chemokinlevel im Alveolarraum, wurde *in vitro* untersucht, ob eine zyklische Dehnung von Epithelzellen die Sekretion der CXC-Chemokine induziert. Nach periodischer, 18 %-iger Dehnung eines einschichtigen Epithelzellrasens zeigte sich im Vergleich zur analog behandelten statischen Kontrolle eine signifikante Erhöhung der CXCL1- und CXCL5-

Sekretion (Abbildung 31 A). CXCL2 konnte analog zur *S. pn.*-Infektion *in vitro* (siehe Abbildung 22 F) nicht im Zellüberstand detektiert werden. Die Sekretion von VEGF wurde nach periodischer Dehnung der Zellen ebenfalls vermehrt induziert, allerdings auf einem niedrigeren Niveau als die Chemokin-Konzentrationen (Abbildung 31 B).



wurden 2-mal unabhängig durchgeführt, ein repräsentatives Experiment wurden für diese Darstellung ausgewählt. **A**, **B**: Mittelwert + SEM; **A**. 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test, **B**: ungepaarter t-Test. ** p < 0,01 und **** p < 0,0001. n.n. =nicht nachweisbar.

6.3.3 <u>In Abwesenheit von CXCL5 ist die Rekrutierung von Neutrophilen im Zuge der</u> mechanischen Ventilation vermindert

Im Anschluss an hochvolumige mechanische Beatmung war eine Infiltration von Neutrophilen in den Alveolarraum zu beobachten, dabei war diese nach 240 min Ventilation bei den $Cxcl5^{-/-}$ Tieren im Vergleich zur HVT WT Gruppe im Mittel um 53 % vermindert (Abbildung 32 A, B). Bei den nicht-ventilierten Gruppen (Präparation und 10-minütige Ventilation mit niedrigem Tidalvolumen) zeigten sich keine Unterschiede in der Infiltration von Neutrophilen in den Alveolarraum. Im Blut wiesen die $Cxcl5^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zum WT vor und nach einer HVT-Beatmung tendenziell erhöhte Granulozyten-Konzentrationen auf. Anteilig an den Gesamtleukozyten war dieser Unterschied signifikant (Abbildung 32 C).



WT und *Cxcl5^{-/-}* Mäuse wurden für 10 min mit einem Tidalvolumen von 9 mg/kg (NV: nicht ventiliert, n = 8-9) oder für 240 min (HVT: hochvolumige Ventilation, n = 8-15) mit einem Tidalvolumen von 33 ml/kg beatmet. **A**. Neutrophile (PMNs) wurden in der bronchoalveolären Lavage mittels Durchflusszytometrie bestimmt. **B**. Repräsentative Dot Blots der Neutrophilen-Populationen im Alveolarraum. **C**. Neutrophile im Blut wurden mit Hilfe eines Hämatologie-Gerätes bestimmt. **A**, **C**: Mittelwert + SEM. 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test. ** p < 0,001, *** p < 0,001 und ****

6.3.4 <u>CXCL5 beeinflusst keine weitere Rekrutierung von Immunzellen in den</u> <u>Alveolarraum bei einer mechanischen Beatmung</u>

Auch im Zuge einer sterilen Inflammation werden AlvMs benötigt, um apoptotische oder nekrotische PMNs zu beseitigen und eine weitere Schädigung des Gewebes zu reduzieren [175]. Zu Beginn sowie nach der vierstündigen HVT Ventilation war die Zahl der AlvMs im Alveolarraum durch eine *Cxcl5* Deletion nicht beeinflusst (Abbildung 33 A). Allerdings zeigte sich eine Verminderung der AlvM-Frequenzen im Mittel von 87 auf 73 % im Anschluss an eine HVT Beatmung in der WT Gruppe, wohingegen bei der *Cxcl5^{-/-}* Gruppe kein Rückgang gemessen werden konnte, was mit einem Einstrom an Neutrophilen zusammenhing (siehe Abbildung 32). Des Weiteren zeigten sich in keiner Gruppe eine Veränderung der totalen Zellzahlen oder Frequenzen der iMs (Abbildung 33 B) und DC-Populationen (Abbildung 33 C) in den Alveolen.





WT und *Cxcl5*^{-/-} Mäuse wurden für 10 min mit einem Tidalvolumen von 9 mg/kg (NV: nicht ventiliert, n = 8-9) oder für 240 min (HVT: hochvolumige Ventilation, n = 8-15) mit einem Tidalvolumen von 33 ml/kg beatmet. Totale Zellzahlen und Prozente an Leukozyten von **A**. Alveolären Makrophagen (AlvMs), **B**. Inflammatorischen Monozyten / Makrophagen (iMs) und **C**. Dendritischen Zellen (DCs) wurden mittels FACS in der bronchoalveolären Lavage (BAL) bestimmt. **A** – **C**: Mittelwert + SEM. 2-way ANOVA/Tukey's *multiple comparison* Test.* *p* < 0,05 und ** *p* < 0,01.

6.3.5 <u>Die Abwesenheit von CXCL5 ist die Lungenfunktion unter mechanischer</u> <u>Beatmung verbessert</u>

Mit Hilfe des maximalen inspiratorischen Drucks (peak inspiratory pressure, PIP) ist eine Aussage darüber möglich, wie viel Widerstand in der relativ steifen Trachea während der Einatmung gemessen wird. Je höher dieser Wert, desto mehr Druck muss ausgeübt werden, um die Lunge zu ventilieren. Auch die Dehnbarkeit der Lunge kann bestimmt werden, und zwar mit Hilfe der "Compliance". Diese ist definiert als der Quotient aus Volumenänderung pro Druckänderung (C = $\Delta V \times \Delta P^{-1}$) und gibt Aufschluss darüber, wie viel Druck ausgeübt werden muss, um die im Gegensatz zur steifen Trachea relativ elastische Lunge selbst zu dehnen. Mehr Kraft muss beispielsweise aufgewendet werden, wenn die Lunge im Zuge einer Schädigung des Gewebes steifer wird. Die Anwendung eines erhöhten Drucks wiederum kann zu einer stärkeren Entwicklung von Ödemen führen als eine Beatmung mit geringerem Druck. Zusammenfassend lässt sich demnach sagen, dass eine niedrige Compliance sowie erhöhte PIP-Werte auf eine verschlechterte Lungenfunktion hinweisen. In Abwesenheit des Chemokins CXCL5 zeigten die Tiere im Verlauf der vierstündigen mechanischen HVT-Beatmung niedrigere PIP-Werte auf als in der WT Gruppe (Abbildung 34 A). Die Cxc/5defizienten Mäusen zeigten zwar im Vergleich zu den WT Tieren mit niedrigeren PIP Werten in das Experiment ein, der Unterschied war zum Zeitpunkt 0 h aber statistisch nicht signifikant. Nach 240 min Beatmung, zum Ende des Experiments, zeigten WT Tiere statistisch höhere PIP-Werte im Vergleich zu den Cxc/5-defizienten Mäusen (Abbildung 34 A rechts). Für erhöhte PIP-Werte können das Alter und das Gewicht der Tiere ursächlich sein, allerdings waren auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen messbar (Abbildung **34** B). Die Compliance der $Cxcl5^{-/-}$ Tiere war tendenziell niedriger als in der WT-Gruppe (Abbildung 34 C). Die Cxc/5-defizienten Mäuse zeigten bereits zu Beginn des Versuchs tendenziell niedrigere Werte, die Unterschiede waren allerdings nicht statistisch signifikant. Der Abfall in der Dehnbarkeit über die Beatmungszeit war bei den WT Tieren stärker ausgeprägt. Dies zeigte sich deutlich nach Normalisierung der Messwerte der Compliance auf den Anfangszeitpunkt t = 30 min. Der relative Complianceverlust war in den WT Tieren demnach signifikant stärker als in der Cxc/5^{-/-} Gruppe. Über den Verlauf der Beatmung entstanden in den Lungen der Cxcl5^{-/-} Tiere folglich signifikant weniger Versteifungen als in den Lungen der WT Tiere.



Abbildung 34: Die Lungenfunktion ist in Abwesenheit von CXCL5 nach mechanischer Beatmung verbessert.

WT und $Cxc/5^{-/-}$ Mäuse wurden für 240 min (HVT: hochvolumige Ventilation, n = 11-15) mit einem Tidalvolumen von 33 ml/kg beatmet. **A**. Maximaler inspiratorischer Druck (*peak inspiratory pressure*, PIP), gemessen alle 10 min (links) und zu Beginn und Ende (rechts). **B**. Alter und Gewicht der untersuchten Tiere. **C**. Dehnbarkeit der Lunge (Compliance), in absoluten Messwerten (oben) und normalisiert zu t = 30 min (unten). **A** - **C**: Mittelwert ± SEM. **A**. 2-way ANOVA mit aufeinander folgenden Messungen (links), 2-way ANOVA/Sidak's *multiple comparison* Test (rechts), **B**. ungepaarter t-Test. **C**. 2-way ANOVA mit aufeinander folgenden Messungen. **p* < 0,05, ** *p* < 0,01 und **** *p* < 0,0001.

6.3.6 <u>Histopathologische Untersuchungen der Lunge ventilierter Mäuse weisen auf</u> eine erhöhte Schädigung der Alveolarwand in Anwesenheit von CXCL5 hin

Zur Beurteilung der Entstehung von Ödemen und Emphysemen, der Schädigung der die Alveole auskleidenden Epithelzellen und der Bildung hyaliner Membranen, erfolgten histopathologische Untersuchungen der Lungen von WT und Cxc/5^{-/-} Tieren. Hyaline Membranen weisen auf einen diffusen alveolären Schaden hin. Sie entstehen, wenn Plasmaproteine aufgrund einer Permeabilitätserhöhung aus dem vaskulären Kompartiment in übertreten und gemeinsam mit nekrotischen den Alveolarraum Alveolarzellen charakteristische transparente (hyaline) Membranen bilden. Die Auswertung der einzelnen Tiere ergab, dass in allen Tieren der Cxc/5-defizienten Gruppe nach HVT Beatmung nur vereinzelt Hyalin-Membranen in den Alveolen vorkamen, während bei drei von vier WT Tieren tendenziell mehr dieser Strukturen gefunden werden konnten (Abbildung 35 A und F). Bei der Entwicklung von alveolären und perivaskulären Ödemen konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet werden, ebenso nicht beim Auftreten alveolärer Emphyseme (Abbildung 35 B - D). Diese Überblähung der alveolaren Strukturen entsteht beispielsweise, wenn durch Inflammation und der damit verbundenen Leukozyten-Rekrutierung Proteasen freigesetzt werden, die die Struktur der Alveolen schädigen. Dadurch können die Alveolen kollabieren und die darin enthaltene Luft bleibt in diesen Blasen gefangen [176]. Unterschiede zeigten sich aber in der Schädigung der Alveolarwand, welche beispielsweise durch Nekrose von Epithelzellen versursacht werden kann. Während in Abwesenheit von CXCL5 die Tiere nur minimale bis geringgradige Schädigungen aufwiesen, konnte in der WT Gruppe eine gering- bis mittelgradige Ausprägung charakterisiert werden (Abbildung 35 E und F).



6.3.7 In Abwesenheit von CXCL5 ist die alveolokapilläre Barriere unter mechanischer Beatmung geschützt

Im Laufe der vierstündigen HVT Beatmung erhöhte sich die Permeabilität der alveolokapillären Barriere bei den WT Tieren im Vergleich zu den nicht-beatmeten Kontrolltieren signifikant (Abbildung 36 A). In Abwesenheit von CXCL5 zeigte sich nach hochvolumiger Ventilation eine signifikant geringere vaskuläre Permeabilität im Vergleich zu den WT Tieren, jedoch nicht zur nicht-ventilierten Kontrollgruppe (Abbildung 36 A). Beide Genotypen zeigten im Anschluss an die Beatmung signifikant erhöhte VEGF Werte, wobei im Gegensatz zum Infektionsmodell (vgl Abbildung 29 B) kein Unterschied zwischen der WT und der *Cxcl5^{-/-}* Gruppe detektiert werden konnte (Abbildung 36 B).



Abbildung 36: Bei einer mechanische Beatmung schützt die Abwesenheit von CXCL5 vor einer Schädigung der alveolokapilläre Barriere.

WT und $Cxc/5^{-/-}$ Mäuse wurden für 10 min mit einem Tidalvolumen von 9 mg/kg (NV: nicht ventiliert, n = 8-9) oder für 240 min (HVT: hochvolumige Ventilation, n = 8-15) mit einem Tidalvolumen von 33 ml/kg beatmet. **A.** Die Bestimmung der Permeabilität der alveolokapillären Barriere mittels Quantifizierung von humanem Serumalbumin (HSA, 90 min vor Versuchsende appliziert) in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) und Plasma. **B.** Die Bestimmung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) aus der BALF erfolgte mittels ELISA. **A, B**: Mittelwert ± SEM; 2-way ANOVA/Tukey's multiple comparison Test. * p < 0.05, ** p < 0.01 und **** p < 0.0001.

7 Diskussion

7.1 Etablierung eines Modells der frühzeitigen und späten Antibiotikatherapie bei Pneumokokken-induzierter Pneumonie

Bei einer Lungenentzündung handelt es sich um eine schwerwiegende Infektion der unteren Atemwege. Vor allem die Ausbreitung des Pathogens (*S. pneumoniae* gilt dabei als der häufigste Erreger [10]) von der Lunge in die Peripherie wird mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert, während nicht-invasive Formen oftmals milder verlaufen [5, 7]. Die Mortalität der Pneumonie liegt trotz antibakterieller Therapie bei 12 - 13 % [5, 6], wobei sie bei Patienten, die wegen einer schwerwiegenden Infektion auf die Intensivstation eingewiesen werden müssen, deutlich höher ist [9, 34, 177, 178]. In den letzten Jahren konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass eine umgehende antibakterielle Therapie innerhalb von vier Stunden nach Vorstellung des Patienten beim Arzt mit einer verbesserten Überlebensrate assoziiert ist [19, 20].

Die im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zum Vergleich zwischen frühzeitigem und spätem Behandlungsstart hatten die Ziele, diese Aussagen zu bestätigen, zugrundeliegende Mechanismen zu untersuchen sowie Ansatzpunkte für adjuvante Therapien herauszustellen.

Zum frühzeitigen Behandlungsstart zum Zeitpunkt 24 h p.i. zeigten die infizierten Tiere bereits äußerlich sichtbare Krankheitssymptome wie ungepflegtes Fell oder ruhigeres Verhalten, was eine Verschlechterung des allgemeinen Befindens der Tiere implizierte. Auch Körpertemperatur und -gewicht waren 24 h p.i. signifikant reduziert. Des Weiteren konnten Pneumokokken in Lunge, Alveolarraum und Blut nachgewiesen werden. Die Infektion hatte sich demnach bereits von einer lokalen Infektion in die Peripherie ausgebreitet. In den histopathologischen Untersuchungen der Lunge zeigten sich bereits perivaskuläre Ödeme, jedoch keine Hinweise auf ein alveoläres Ödem oder eine Schädigung der alveolokapillären Barriere. In unserem Modell hatten die Tiere demnach bereits zum Zeitpunkt 24 h p.i., dem Start der frühen Therapie, eine Pneumonie und Bakteriämie ausgebildet. Die frühe Behandlung zeigte dennoch einen protektiven Effekt, weshalb 97 % der *S. pn.*-infizierten Tiere die Infektion überlebten.

Problematisch bei der Therapie einer Pneumonie ist wie bei anderen Erkrankungen unter anderem auch, dass viele Patienten erst bei einer weit fortgeschrittenen Erkrankung in medizinische Betreuung kommen oder dass Komorbiditäten den Krankheitsverlauf beschleunigen. Aus diesem Grund ist eine frühzeitige Behandlung (analog zu dem im Modell gewählten frühem Therapiebeginn) nicht mehr möglich, was eine der Ursachen für die hohe Mortalität der Pneumonie ist. Weitere Gründe für das Versterben von Patienten trotz antimikrobieller Therapie sind vielseitig. Resistenzen gegenüber verwendeten Antibiotika werden als eine Ursache genannt. Auch die falsche Dosierung des Antibiotikums kann ein Grund für das Versterben von Patienten sein [179]. Generell werden beispielsweise hohes Alter und männliches Geschlecht als Risikofaktoren genannt, die in dem für die vorliegende Arbeit gewählten Modell aber nicht dargestellt wurden [34].

Eine stark fortgeschrittene Pneumonie sollte in dem experimentellen Tiermodell mit Hilfe eines späteren Behandlungsstarts zum Zeitpunkt 48 h p.i., also nur 24 h nach Beginn der frühzeitigen Therapie, repräsentiert werden. Zu diesem Zeitpunkt waren Körpergewicht- und Temperatur der Versuchstiere weiter gesunken und die äußerlich erkennbaren Symptome einer Pneumonie hatten sich noch verstärkt. Neben einem perivaskulärem Ödem konnten auch ausgeprägte alveoläre Ödeme nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigte sich eine deutliche Schädigung der alveolokapillären Barriere und eine ausgeprägte systemische Inflammation hatte sich bereits ausgebildet. Im Gegensatz zu einer frühen Therapie war ein Behandlungsstart zu diesem Zeitpunkt nicht mehr protektiv, weshalb nur etwa 20 % der therapierten Versuchstiere diese Erkrankung überlebten.

Die im Infektionsmodell beobachtete Mortalität ist damit höher als die bei Patienten dokumentierte Sterblichkeit, obwohl einige beim Menschen bestehende Risikofaktoren wie hohes Alter oder Komorbiditäten bei den Tieren nicht vorlagen. Allerdings werden schwer erkrankte Patienten im Krankenhaus intensiver und umfangreicher therapiert als die Mäuse in dem für diese Arbeit verwendeten Modell. Sie erhalten beispielsweise, wenn die Monotherapie mit einem einzelnen Antibiotikum nicht mehr ausreichend sein könnte, Makrolide, die entzündungshemmend wirken und so zu einer verbesserten Überlebenschance beitragen können [21, 180]. Auch eine zusätzliche Flüssigkeitszufuhr gegen die Dehydrierung wird gewährleistet. Solch eine intensive Betreuung stellt das in dieser Arbeit verwendete Modell nicht bereit, was ein zusätzlicher Grund für die hohe Mortalität der spät therapierten Tiere sein könnte.

Es muss des Weiteren angebracht werden, dass sich die Immunreaktion von Mensch und Maus in vielen Punkten unterscheidet. Mäuse, die abgeschirmt von vorherigen Infektionen in einer Tierhaltung geboren wurden, zeigen beispielsweise eine andere Reaktion auf Pathogene als Menschen, deren Immunsystem durch vorherige Infektionen besser adaptiert ist. Da naive Labormäuse beispielsweise keine T-Gedächtniszellen aufweisen, ähnelt ihre Immunantwort eher der Neugeborener als der Erwachsener. Mäuse, die unter Exposition von Mikroben leben, wie freilebende Tiere oder solche aus einem Zoofachgeschäft, weisen dagegen diese Lymphozyten-Population auf [181]. Bereits die gemeinsame Haltung von Labor- und Fachgeschäft-Mäusen genügt, um eine Immunreaktion hervorzurufen, die der Erwachsener ähnlicher ist. Weiterführende Experimente könnten diesen Ansatz des "Co-Housings" nutzen, um die Immunreaktion der Tiere ähnlicher der von Patienten zu gestalten. Auch der Aufbau der Lunge unterscheidet sich zwischen Maus und Mensch. Während die Maus nur einen linken Lungenlappen hat, sind beim Menschen zwei linke Lappen ausgeprägt. Die Zellen der alveolokapillären Barriere sind dünner bei der Maus (0,32 µm) als beim Menschen (0,62 µm), was möglicherweise Einfluss auf Gasaustausch und Lungenmechanik hat [182]. Des Weiteren werden für tierexperimentelle Untersuchungen Inzuchtlinien verwendet, um die genetische Varianz zwischen den Tieren zu minimieren. Auch dies steht im Gegensatz zu humanen Patienten, die eine hohe genetische Streuung aufweisen. Trotz all der Unterschiede, die zwischen einem murinen Modell und humanen Patienten herrschen, zeigen die Versuchstiere der für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente im Verlauf der Pneumonie sehr viele Überschneidungen zum Menschen. So zeigten Rodriguez *et al.*, dass die Mortalität immunkompetenter Pneumonie-Patienten trotz adäquater antibakterieller Therapie und Behandlung von Komorbiditäten bei 20,7 % liegen kann [178]. Vor allem das Voranschreiten der Infektion mit der Ausbreitung in die Peripherie, einer messbaren Erhöhung inflammatorischer Mediatoren in Alveolarraum und Blutsystem und der Schädigung sekundärer Organe spiegelt den Infektionsverlauf im Menschen wider.

In dieser Arbeit sollte der Fokus nicht auf die Therapie- oder Resistenz-assoziierten [179], sondern auf die wirtsspezifischen Probleme bei der Behandlung einer Pneumonie gelegt Diese umfassen beispielsweise die häufig auftretende unkontrollierte werden. Hyperinflammation, die im Zuge einer Infektion zu einer Schädigung des Lungengewebes, Multiorganversagen und Sepsis führen kann [179]. Auch bereits bestehende eitrige Entzündungen, beispielsweise der Lunge, zählen zu den wirtsspezifischen Problemen, werden aber in dieser Arbeit nicht adressiert. Der Fokus auf wirtsspezifische Probleme bei der Therapie konnte erzielt werden, indem die Faktoren falsche Dosierung und Resistenzen durch die kontrollierte Durchführung der Experimente und die Wahl eines nicht resistenten S. pn.-Stammes ausgeschlossen wurden. Für die Entwicklung neuer adjuvanter Therapien, die wirtsspezifische Probleme bei der Infektionsresolution adressieren, ist eine detaillierte Untersuchung der genauen Abläufe der Immunreaktion essentiell. Der Fokus richtete sich hierbei vor allem auf die Frage, welche potentiell schädigenden Prozesse der Immunantwort durch eine antimikrobielle Therapie reversibel sind und an welchen Stellen die alleinige Eliminierung der Pathogene nicht ausreicht, um dem Patienten zu helfen. Um diese Frage genauer zu untersuchen, bietet sich das für diese Arbeit gewählte Modell der frühzeitigen, protektiven im Vergleich zur verspäteten, unzureichenden Therapie mit Ampicillin sehr gut an. Versuchsaufbaus detaillierte Mechanismen Mit Hilfe des konnten hinter dem Therapieversagen untersucht und Ansätze für die Entwicklung neuer adjuvanter Behandlungsmöglichkeiten herausgestellt werden.

7.2 Mögliche Mechanismen hinter dem Therapieversagen einer späten antibakteriellen Behandlung

In der Klinik stehen Mediziner vor der schweren Aufgabe, die Therapie eines Pneumonie-Patienten zu modifizieren, sollte sich dessen Verfassung trotz antibakterieller Behandlung nicht verbessern. Neben den Fragen, ob eventuelle Resistenzen ursächlich sind [183] oder die richtige Antibiotika-Klasse und -Dosis [184-186] eingesetzt wurde, müssen hierbei auch wirtsspezifische Probleme in Betracht gezogen werden. Denn trotz adäquat eingesetzter antimikrobieller Behandlung verschlechtert sich der Zustand vieler Patienten im Zuge der Behandlung [178]. Die Autoren dieser und weiterer Studien nehmen an, dass bei der Entwicklung einer schweren invasiven Pneumonie und einer damit assoziierten Sepsis eine Hyperinflammation zu einer schweren Schädigung der Organe führt [34, 178, 187].

Um diese Annahme zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit exploriert, welche Prozesse ursächlich für die unterschiedlichen Überlebensraten der frühzeitig und verspätet behandelten Tiere sind. Dafür wurden lokale und systemische inflammatorische Reaktionen detailliert ausgewertet. Auffällig war, dass viele Prozesse in den *S. pn.*-infizierten Mäusen zu beiden Behandlungsstarts analog verliefen. Die Eliminierung der Pneumokokken erfolgte nach frühzeitigem und spätem Therapiebeginn in vergleichbarem Umfang und schien demnach nicht ursächlich zu sein für die unterschiedliche Mortalität der Versuchsgruppen. Des Weiteren schien die Anwesenheit von Immunzellen im Alveolarraum generell nicht durch die eingesetzte Therapie beeinflusst zu werden, da keine Unterschiede zu den infizierten, Lösungsmittel-therapierten Tieren gemessen werden konnten. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob Unterschiede in der Apoptose- bzw. Nekroserate der Leukozyten zwischen den Gruppen vorzufinden waren, da entsprechende Marker (z. B. 7-AAD und Annexin V zur Unterschiedung apoptotischer von nekrotisierenden Zellen [188]) nicht untersucht wurden. Wie im Alveolarraum war auch im Blut kein Effekt von Ampicillin auf die zirkulierenden Neutrophilen und Monozyten messbar.

Die gleichbleibende Anzahl an Neutrophilen in der Lunge könnte in der von der antibakteriellen Therapie unbeeinflussten Konzentration des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL5 im Alveolarraum der Tiere begründet liegen [67]. Diese unveränderten CXCL5-Level scheinen nicht in der Methodik der Aufbereitung der Lavage und einer damit verbundenen unkontrollierten Ausschüttung des Chemokins begründet zu sein, da signifikante Unterschiede zur kontroll-infizierten Gruppe nachweisbar waren. Möglicherweise kann die CXCL5-Sekretion von Epithelzellen durch die zellulären Bestandteile der antibakteriell lysierten Pneumokokken vermehrt induziert werden. Dies wurde bereits von Baumgartner *et al. in vitro* für einen Serotyp 3 *S. pn.* Stamm an humanen Epithelzellen des Nasopharynx gezeigt. Hier induzierten antibiotisch lysierte Bakterien eine stärkere Sekretion des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL8 [189], einem humanen Analog von CXCL5, als intakte Pneumokokken [190]. Ein weiterer Mechanismus hinter der unveränderten CXCL5-Konzentration könnten die erhöhten IL-12p40 Werte sein. IL-12p40 ist eine Untereinheit der beiden Interleukine IL-12 und IL-23. Die Sekretion von IL-12 wird beispielsweise durch freigesetzte Pneumokokken-RNA induziert [191] und scheint ebenfalls die Rekrutierung von Neutrophilen zu begünstigen [192]. IL-23 kann die IL-17 Sekretion einiger T-Zell Populationen induzieren [193, 194]. In einem Klebsiella pneumoniae-Infektionsmodell wurde gezeigt, dass IL-17 zu einer stärkeren CXCL5-Sekretion alveolärer Epithelzellen führt, welche wiederum eine vermehrte Neutrophile-Rekrutierung induziert [195]. Im Laufe der Resolution der Pneumonie kam es in allen überlebenden Tieren zum Rückgang der Neutrophilen im Alveolarraum. Im Menschen konnte gezeigt werden, dass Patienten, bei denen die Resolution verzögert abläuft, auch zwei Wochen nach einer antibakteriellen Therapie mehr Neutrophile im Alveolarraum aufwiesen als Patienten mit einer unkomplizierten Pneumonie [196]. Die Autoren dieser Studie konnten auch beobachten, dass inflammatorische Mediatoren im Blut der Patienten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar waren, die lokalen Zellpopulation der Patienten aber längere Zeit erhöht waren. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigten keinen Unterschied an Neutrophilen zwischen früher und später Therapie. Allerdings muss angemerkt werden, dass nach spätem Behandlungsbeginn zu den Zeitpunkten 72 h, 96 h und 120 h p.i. nur 20 % der zu Experimentstart infizierten Tiere überlebt hatten, welche in die Analyse einfließen konnten. Diese Tiere zeigten zwar zu Beginn des Versuchs eine vergleichbare Ausprägung der messbaren Symptomatik und wurden deshalb nicht aus dem Experiment ausgeschlossen, möglicherweise waren sie dennoch in der Lage, die Infektion mit eigenen Kräften besser zu bekämpfen als die Mehrzahl der übrigen Tiere. Dadurch könnte es zu einer Verschiebung der Ergebnisse gekommen sein, da nur die Mäuse, die zu diesen späten Zeitpunkten noch am Leben waren, analysiert wurden und die schweren Verläufe, die im Zuge des Versuches euthanasiert werden mussten, nicht mit in die Analysen aufgenommen werden konnten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen in dieser Arbeit wurde in anderen Studien an *S. pn.*infizierten, Ampicillin-behandelten Mäusen festgestellt, dass eine Ampicillin-Therapie zu einer zumindest tendenziellen Reduktion von Neutrophilen im Alveolarraum führen kann [197, 198]. Direkte immunomodulatorische Effekte von β-Laktamen auf die Leukozyten-Rekrutierung sind nicht bekannt, es konnte aber gezeigt werden, dass Ampicillin möglicherweise die Differenzierung humaner T-Zellen einleiten kann [199]. Dennoch scheint die in anderen Studien beobachtete Reduktion der Leukozyten im Alveolarraum eher indirekt und im Zusammenhang mit der Eliminierung der Bakterien durch das Antibiotikum induziert worden zu sein. Die oben diskutierten Chemokine und Interleukine wurden in den genannten Arbeiten nicht quantifiziert, weshalb keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit diese ebenfalls beeinflusst waren. Obwohl die Anzahl der im Alveolarraum vorgefundenen Immunzellpopulationen in den Versuchen der vorliegenden Arbeit nicht durch Ampicillin beeinflusst wurde, schienen sich ihre Aktivierungsgrade im Anschluss an eine Therapie signifikant zu vermindern. Dies wurde indirekt anhand der sekretierten inflammatorischen Mediatoren gemessen, deren Level mit Ausnahme von CXCL5, GM-CSF und IL-12 / -23 nach beiden Behandlungsstarts absanken. Der Wachstumsfaktor GM-CSF wird beispielsweise von alveolären Epithelzellen sekretiert [200] und ist essentiell für die Funktionalität alveolärer Makrophagen und der damit einhergehenden Elimination von Pathogenen [166, 201]. Das Absinken der anderen Mediatoren-Konzentrationen war vor allem nach frühzeitiger Behandlung deutlich erkennbar. Auch nach später Behandlung kam es zu einer signifikanten Reduktion vieler Zytokin- und Chemokin-Level, allerdings muss an dieser Stelle erneut auf den geringen Gruppenumfang ab dem Zeitpunkt 72 h p.i. hingewiesen werden, weshalb diese Daten nur unter Vorbehalt interpretiert werden können.

Bei den Mediatoren IL-1 β , TNF- α und IFN- γ konnte eine tendenzielle Zunahme der Konzentrationen 12 h nach frühzeitigem Therapiestart im Alveolarraum gemessen werden. Diese kurzfristige Erhöhung der Sekretion könnte auf den lytischen Eigenschaften von Ampicillin basieren. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Verwendung eines lytischen Antibiotikums zu einer stärkeren TNF- α -Sekretion in Makrophagen führt als die Verwendung eines nicht-lytischen Antibiotikums [202] und dass die Zellwand grampositiver Bakterien die Sekretion von TNF- α und IL-6 in humanen Monozyten induzieren kann [203].

Da dieser Anstieg der Zytokin-Konzentrationen nur kurzfristig war und die früh therapierten Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits eine verbesserte äußerlich erkennbare Symptomatik und eine normalisierte Körpertemperatur aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Anstieg zu keiner Benachteiligung der Versuchstiere führte. Die frühzeitige Therapie verhinderte erfolgreich das Voranschreiten der Infektion und die Ausbildung von bakterieninduzierten Läsionen, bereits entwickelte Gewebeschädigungen konnten jedoch nicht vermindert werden. Diese Läsionen spiegelten sich jedoch in dieser Versuchsgruppe nicht in weiteren Symptomen wider. Zu Beginn der späten Therapie war es bereits zu einer stärkeren Schädigung des Lungengewebes gekommen, vermutlich aufgrund der längeren Exposition mit einer hohen bakteriellen Last und Inflammation. Auch hier bewirkte die antibakterielle Behandlung keinen Rückgang der bereits ausgebildeten Läsionen.

Zum späten Therapiebeginn hatten sich Infektion und damit einhergehende entzündliche Reaktionen im Körper der Tiere bereits in die Peripherie ausgebreitet, was pathologisch beispielsweise an der hochgradig entwickelten Pleuritis sowie Steatitis erkennbar war. Die bakterielle Last im Blut der Versuchstiere zum Zeitpunkt 48 h p.i. lag auf einem ähnlichen Niveau wie beim frühen Behandlungsstart und beide Therapien führten zu einer umgehenden Reduktion der bakteriellen Last im Blut. Zum Zeitpunkt 24 h p.i. konnte trotz hoher Erregerlast im Blut der Versuchstiere noch kein signifikanter Anstieg der inflammatorischen Mediatoren im Serum im Vergleich zu den kontroll-infizierten Tieren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren die Werte zum Zeitpunkt 48 h p.i. stark erhöht und es zeigten sich vermehrt leberspezifische Entzündungswerte. Bei Pneumonie-Patienten werden die lokal produzierten Zytokine im Alveolarraum stärker sekretiert und sind deshalb besser quantifizierbar als im Blut [204, 205]. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die systemischen Konzentrationen von beispielsweise IL-6 und IFN-y in Pneumonie-Patienten ebenfalls erhöht sind und mit der Schwere der Erkrankung korrelieren. Im Gegensatz dazu können die inflammatorischen Mediatoren in der BAL nicht mit dem aktuellen Krankheitsverlauf assoziiert werden [204-206]. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der die lokale Inflammation unabhängig von der weiteren Entwicklung der Pneumonie im Zuge der antibakteriellen Behandlung abnimmt, wohingegen die systemischen Konzentrationen mit der Schwere der Pneumonie korrelierten. Des Weiteren konnten Endeman et al. keinen Unterschied in den systemischen Zytokin-Leveln zwischen adäquat und inadäquat antibakteriell therapierten Patienten messen. Allerdings wurde dieses Ergebnis nicht in Abhängigkeit der Schwere der Pneumonie untersucht. Deshalb ist keine Aussage darüber möglich, ob es, wie in dieser Dissertation, Abhängigkeiten zwischen systemischer Inflammation und Krankheitsverlauf gab [207].

Mehrere Ursachen könnten der Beobachtung zugrunde liegen, dass zum Zeitpunkt des späteren Behandlungsstarts signifikant erhöhte systemische Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren gemessen wurden, während dies zu 24 h p.i. trotz vergleichbarer bakterieller Last noch nicht der Fall war. Zum einen hatte das Blutsystem eine um 24 Stunden verlängerte bakterielle Expositionszeit, wodurch die vaskulären Endothelzellen und zirkulierenden Immunzellen vermehrt Zytokine und Chemokine produzieren konnten. Achouiti et al. konnten ebenfalls eine Zunahme der gemessenen inflammatorischen Mediatoren im Blut S. pn.-infizierter Mäuse über die Zeit messen, allerdings stieg hier auch die bakterielle Last im gleichen Zeitraum an, weshalb nicht gesagt werden kann, ob die vermehrte Inflammation eine direkte Folge der erhöhten bakteriellen Last war oder die verlängerte Inkubationszeit der Bakterien im Blut zu diesem Ergebnis führte [208]. Neben dem bekannten Vorgang des aktiven Übertritts der Bakterien aus dem Lungenkompartiment in die Peripherie [209-211] und der darauffolgenden sekundären systemischen Entzündungsreaktion, könnte es auch zu einem unkontrollierten Übergang der lokalen inflammatorischen Mediatoren über die zum Zeitpunkt 48 h p.i. geschädigte alveolokapilläre Barriere gekommen sein. Die Schädigung der alveolokapillären Barriere wird in vielen Studien und Übersichtsarbeiten als ein zentraler Schritt bei der Pathogenese einer Pneumonie beschrieben, der im Zusammenhang mit der Entwicklung von Atemversagen, Sepsis und der Schädigung weiterer Organe stehen kann [113, 212, 213].

92

Die Schädigung dieser zellulären Barriere wurde in dieser Arbeit nur durch die frühzeitige Therapie verhindert. Gracia *et al.* zeigten in einer Studie mit *S. pn.*-infizierten Ratten ebenfalls, dass eine frühzeitige Therapie einer Schädigung des Lungengewebes vorbeugen kann und das Versterben infizierter Tiere verhindert. Allerdings wurde in dieser Studie bereits eine Stunde nach Infektion mit der frühen Behandlung gestartet, weshalb im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit in jener Studie nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Tiere bereits eine Pneumonie entwickelt hatten oder eine irreversible Schädigung des Lungengewebes vorlag [214]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der von Gracia *et al.* zeigen des Weiteren, dass die antibiotische Lyse der Bakterien, die eine Freisetzung intrazellulärer, teilweise gewebeschädigender Substanzen wie Pneumolysin mit sich zieht [215, 216], nicht in jedem Fall zu einer messbaren Erhöhung der vaskulären Permeabilität führt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine frühzeitige, aber auch eine späte antibakterielle Therpie die Bakterien effektiv eliminierten. Weder der frühe noch der späte Start führte zu einer Verringerung der Leukozyten in Blut und Alveolarraum, reduzierten aber die lokalen Konzentrationen inflammatorischer Mediatoren. Während eine frühzeitige Behandlung die der alveolokapillären Barriere, eine systemische Inflammation Schädigung und Leberschädigung verhinderte, verfehlte die späte Therapie diese Effekte, was wahrscheinlich ursächlich war für die stark erhöhte Mortalität dieser Tiere. Als Schlussfolgerung sollte demnach die antibakterielle Therapie unverzüglich nach Vorstellung des Patienten erfolgen, worauf beispielsweise auch Daniel et al. und Phua et al. im Jahr 2016 hinwiesen [19, 20]. Des Weiteren sollten als Ergebnis dieser Doktorarbeit die Verminderung der systemischen Inflammation und der Schutz der alveolokapillären Barriere im Fokus der Entwicklung neuer adjuvanter Therapien stehen. So konnte beispielsweise in weiteren Forschungen dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Peptide Adrenomedullin und Vasculotide eine Barrierestörung in der Maus vermindern können [31, 212]. Weiterführende Studien sollten allerdings noch durchgeführt werden, um die Wirksamkeit im Menschen zu untersuchen. Den Weg in die Klinik schaffen leider nur wenige der in der Präklinik als vielversprechend geltenden Agenzien (z.B. GM-CSF [217, 218]). Daher besteht die Aufgabe der Grundlagenforscher und Präklinker weiterhin darin, mögliche Wirkmechanismen und Angriffspunkte für adjuvante Therapien zu identifizieren. Das Ziel ist dabei, die Mortalität der Pneumonie, die seit der Einführung der antibakteriellen Behandlung bei 12 - 13 % stagniert, weiter zu senken.

7.3 Die Rolle von VEGF bei der der Erhöhung der alveolokapillären Permeabilität

Die Konzentration des lokal gemessenen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) zeigte in dem gewählten Modell früher und später antibakterieller Behandlung einen zur vaskulären Permeabilität analogen Verlauf. Dies weist darauf hin, dass VEGF eine potentielle Ansatzstelle für adjuvante Therapien sein könnte. Nach einer Serotyp 2 *S. pn.*-Infektion sowie im Anschluss an die in dieser Arbeit durchgeführte mechanische Ventilation von WT und *Cxcl5*-defizienten Versuchstieren konnte ebenfalls ein Anstieg von VEGF festgestellt werden. Deshalb soll an dieser Stelle genauer auf den möglichen Einfluss dieses Mediators auf die alveolokapilläre Barriere eingegangen werden. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben bereits eine vermehrte VEGF Sekretion nach mechanischer Beatmung [97, 219]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass VEGF einen direkten Einfluss auf die Erhöhung der vaskulären Permeabilität hat, beispielsweise indem es zur Bildung parazellulärer Spalten führt [56]. Eine Inhibition von VEGF mit Hilfe von siRNA kann im Ventilations-Modell dazu führen, dass sich die induzierte Lungenschädigung vermindert und die Infiltration von Neutrophilen reduziert wird. Ob dies ein direkter Effekt von VEGF ist, oder indirekt als Folge der geringeren Gewebeschädigung auftritt, wurde jedoch nicht untersucht [219].

Allerdings ist VEGF auch essentiell für die Bildung neuer Blutgefäße, die Regeneration des Lungengewebes und kann das Überleben von Endothelzellen verlängern [172, 220]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von VEGF dazu führen kann, dass eine LPS-induzierte Schädigung der alveolokapillären Barriere vermindert wird [221]. Das Wirkspektrum von VEGF ist demnach umfangreich und reicht von Barriere-destabilisierend bis –regenerierend. Verschiedene Studien beschreiben gegensätzliche Ergebnisse und die Rolle von VEGF bei der bakteriellen und sterilen Inflammation ist immer noch nicht im Detail verstanden.

In Beatmungsmodellen mit mechanischer Ventilation wurde bereits gezeigt, dass neben Epithelzellen auch inflammatorische Monozyten / Makrophagen in der Lage sind, VEGF zu sekretieren und damit die Permeabilität von Endothelzellen zu erhöhen [97]. In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Ventilationsversuchen mit WT und *Cxcl5*-defizienten Versuchstieren konnte nach vierstündiger invasiver Beatmung noch keine Rekrutierung dieser Zellpopulationen in den Alveolarraum festgestellt werden. Dies legt nahe, dass inflammatorische Monozyten / Makrophagen in diesen Experimenten nicht die Hauptquelle für VEGF sind. In vielen Studien wurde beschrieben, dass Typ II Epithelzellen VEGF Sekretion allein ein mechanischer Stimulus hinreichend ist, konnte in der vorliegenden Arbeit *in vitro* nach zyklischer Dehnung von Epithelzellen beobachtet werden. Allerdings könnte dies auch ein indirekter Effekt gewesen sein und die VEGF Sekretion nicht unmittelbar als Ergebnis der

94

mechanischen Belastung, sondern als Folge der vermehrten Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren ausgelöst worden sein. Es ist bekannt, dass Zytokine wie IL-6 und TNF-a eine VEGF-Ausschüttung induzieren können [225, 226]. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Neutrophile-rekrutierenden Chemokins CXCL5 bei der Schädigung der vaskulären Permeabilität untersucht. Über den Einfluss der CXCR2-Liganden CXCL5, CXCL1 und CXCL2 auf die VEGF Sekretion wurden bisher noch keine Studien veröffentlicht. Diese Chemokine wurden infolge der für diese Arbeit durchgeführten zyklischen Dehnung der Epithelzellen ebenfalls vermehrt sekretiert und könnten eine VEGF Sekretion induziert haben. Die ebenfalls durchgeführten in vivo Versuche lassen allerdings darauf schließen, dass CXCL5 die VEGF Sekretion nicht beeinflusst, da die Konzentration dieses Wachstumsfaktors in WT und Cxc/5^{-/-} Tieren nach hochvolumiger Ventilation vergleichbar war. Dennoch könnte die zyklischen Dehnungsversuche in weiterführenden Experimenten analog an Epithelzellen, isoliert aus Cxcl5-/- Mäusen durchgeführt werden, um einen Einfluss von CXCL5 auf die VEGF Sekretion von Epithelzellen zu explorieren. Auch Neutrophile speichern VEGF in ihren Granula [227], welches sie nach Stimulation freisetzen können. In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellen korrelierten die Menge an Neutrophilen im Alveolarraum nicht mit den VEGF-Konzentrationen, da bei ventilierten Cxcl5^{-/-} Tieren vergleichbare Mengen des Proteins gemessen wurden wie bei analog behandelten WT Tieren trotz unterschiedlich starker Neutrophile-Rekrutierung. In diesem Modell scheinen Neutrophile also keinen Einfluss auf die Gesamtmenge an VEGF zu haben. Dennoch unterschieden sich die Gruppen in der messbaren Schädigung der alveolokapillären Barriere. Im Zuge einer mechanischen Ventilation, die eine sterile Inflammation auslöst, zeigte sich demnach keine Assoziation zwischen dem in der Lavageflüssigkeit messbaren VEGF und der Zunahme der vaskulären Permeabilität. Es gibt in diesem Modell also keinen Hinweis darauf, dass VEGF für die Induktion einer Schrankenstörung verantwortlich ist.

Im Gegenzug dazu zeigte sich in den Modellen der *S. pn.*-induzierten Lungenschädigung ein Zusammenhang zwischen VEGF-Menge und vaskulärer Permeabilität. So entwickelte sich die Proteinkonzentration an VEGF nach einer Serotyp 2- wie auch Serotyp 3-Infektion parallel zur Schädigung der alveolokapillären Barriere und war bei einer *Cxcl5*-Defizienz sowie nach frühzeitiger Therapie signifikant reduziert. Möglicherweise unterscheidet sich die Rolle von VEGF bei Entstehung der vaskulären Permeabilität zwischen steriler und bakterieller Inflammation. Weiterführende Experimente sollten untersuchen, inwieweit sich eine Inhibition von VEGF, beispielsweise mit Hilfe von siRNA oder Rezeptor-Blockade, auf die Entwicklung der vaskulären Permeabilität in einer *S. pn.*-Infektion und bei einer invasiven Beatmung auswirkt. Anschließend könnte in Betracht gezogen werden, ob ein Eingreifen in eine VEGF-vermittelte Permeabilität ein möglicher Ansatz für eine adjuvante Therapie sein könnte.

7.4 Die alveolokapilläre Barriere in Abhängigkeit von CXCL5

Wie im Voraus diskutiert, scheint die Intaktheit der alveolokapillären Barriere von zentraler Wichtigkeit für den Gasaustausch und die Verhinderung einer unkontrollierten Ausbreitung der Inflammation von der Lunge in die Peripherie zu sein. Im ersten Teil wurde untersucht, inwieweit der Zeitpunkt des Therapiebeginns ausschlaggebend war für diese Vorgänge nach einer *S. pn.*-Infektion. Im weiteren Verlauf wurde analysiert, inwieweit das Neutrophile-rekrutierende Chemokin CXCL5 Einfluss auf die Entwicklung einer Schrankenstörung haben kann. Neben der Beeinträchtigung der alveolokapillären Barriere im Zuge einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie wurde in dieser Arbeit des Weiteren untersucht, wie eine mechanische Ventilation, die bei Pneumonie-erkrankten Patienten häufig eingesetzt wird, die vaskuläre Permeabilität erhöhen kann. Die mechanische Ventilation induziert einen Lungenschaden, der im Gegenzug zu einer bakteriellen Infektion eine sterile Inflammation hervorruft.

7.4.1 Alveoläre Epithelzellen sind die Hauptquelle von CXCL5 in der Lunge

Die Sekretion der CXCR2-Liganden CXCL1 und CXCL5 im Alveolarraum erfolgte frühzeitig nach einer Pneumokokken-Infektion sowie nach einer vierstündigen Ventilation mit hohem Tidalvolumen. Eine erhöhte CXCL2-Konzentration konnte dagegen nur nach einer Serotyp 3-Infektion, nicht nach einer in vivo Serotyp 2-Infektion oder im Anschluss an eine Ventilation gemessen werden. In vitro dagegen war zu beobachten, dass eine Serotyp 3-Infektion zu einer Sekretion aller drei analysierten CXCR2-Liganden in rekrutierten und residenten Zellen der Lunge führte. Dabei wurde nicht jedes dieser Chemokine von allen Zelltypen sekretiert. Stattdessen wiesen die verschiedenen Zellen unterschiedliche Sekretionsmuster der einzelnen Liganden auf. Primäre alveoläre Epithelzellen wie auch eine Typ II Epithel Zelllinie waren in der Lage, infolge einer S. pn.-Infektion CXCL5 zu sekretieren. Wie bereits im M. tuberculosis-Modell gezeigt [67], war dies in Epithelzellen auch nach einer S. pn.-Infektion abhängig von TLR2. Auch infolge einer simulierten mechanischen Ventilation in vitro, bei der T7 Zellen zyklisch gedehnt wurden, zeigte sich eine vermehrte CXCL1 und CXCL5 Sekretion. Dieser Vorgang der Umwandlung einer mechanischen Stimulation in die Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren wird als Mechanotransduktion bezeichnet und konnte im Tiermodell wie auch bei invasiv beatmeten Patienten beobachtet werden. Auf Grundlage dieser früheren Studien wurden die Beatmungsparameter in der Klinik angepasst, um eine durch die mechanische Beatmung induzierte schädigende Immunantwort zu reduzieren. In Folge der Herabsetzung des eingesetzten Plateaudrucks und Tidalvolumens [37] konnte im Patienten eine verringerte Mortalität und im Tiermodell ein Rückgang der Lungenschädigung
festgestellt werden [40, 228]. Allerdings kann auch eine niedrigvolumige Ventilation in gesunden Versuchstieren eine Schädigung des Lungengewebes hervorrufen [41].

Nouailles et al. und Jeyaseelan et al. beschrieben bereits, dass Epithelzellen die Hauptquelle für CXCL5 infolge einer *M. tuberculosis*-Infektion oder LPS-Stimulation sind [67, 229]. Auch Yamamoto et al. konnten zeigen, dass eine Epithelzell-spezifische Deletion von RelA, einem Bestandteil von NF-KB, zu einer signifikanten Reduktion der messbaren CXCL5-Menge in der Lunge und im Alveolarraum infolge einer LPS-Stimulation bzw. zu Beginn einer S. pn.-Infektion führte [65, 170]. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten sie ebenfalls, dass Epithelzellen (Typ II wie auch Typ I) eine wichtige Quelle für CXCL5 sind, wobei die Sekretion von CXCL1 und CXCL2 vom Knockout unbeeinflusst war und demnach von andere Zelltypen übernommen wurde. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da CXCL2 nur in sehr geringem Maße von Epithelzellen sekretiert und CXCL1 beispielsweise auch von AlvMs in den Überstand abgegeben wurde. Der Knockout von RelA führte in den S. pn.-Infektionsexperimenten von Yamamoto et al. allerdings zu keiner kompletten Blockierung der CXCL5-Sekretion. Außerdem war bereits nach 24-stündiger Infektion kein Unterschied zu den WT Tieren mehr sichtbar. Daraus lässt sich entweder schließen, dass epitheliales RelA nur zu Beginn einer Infektion essentiell für eine CXCL5-Sekretion ist und weitere, NF-kBunabhängige Prozesse zur Ausschüttung von CXCL5 führen, oder aber dass auch andere Zellen neben Epithelzellen in der Lage sind, dieses Chemokin zu produzieren. Traber et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Expression von Cxc/5 auch durch STAT3, also ohne Einbeziehung von NF-kB, mit Hilfe von Oncostatin-M, einem Zytokin der IL-6 Familie, induziert werden kann [146]. Auch andere inflammatorische Mediatoren, wie IL-17, TNF-α oder IL-1β können die CXCL5-Sekretion von Epithelzellen induzieren [230, 231]. Dies könnte die zeitliche Verzögerung der CXCL5-Sekretion in den RelA-Knockouts erklären, da die genannten Zytokine erst im Verlauf der Infektion ansteigen.

Weiterführende *in vitro* Experimente könnten zeigen, ob eine *S.pn.*-abhängige Induktion der CXCL5-Sekretion trotz Inhibition von TLR2 und damit NF- κ B, beispielsweise durch IL-6, IL-1 β , TNF- α oder IL-17 in Epithelzellen möglich ist. Die Zytokine könnten von den Epithelzellen selbst produziert werden und die Sekretion von CXCL5 initiieren (autokriner Mechanismus) oder von anderen Zellen, um anschließend auf die Epithelzellen zu wirken (z. B. alveoläre Makrophagen oder PMNs, parakriner Mechanismus). Diese Zellen könnten sich entweder in Ko-Kultur mit den Epithelzellen befinden oder in einem separaten Experiment infiziert werden, um anschließend auf die unstimulierten Epithelzellen zu geben.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit auch bei Thrombozyten nach einer Stimulation mit Pneumokokken eine vermehrte CXCL5-Ausschüttung beobachtet werden. Thrombozyten speichern CXCL5 in Vesikeln, wodurch sie unmittelbar auf eine Stimulation reagieren können [171, 232]. Das von Yamamoto *et al.* quantifizierte CXCL5 in Lungengewebe und Alveolarraum

könnte demnach auch durch Thrombozyten bedingt gewesen sein, die entweder durch die Erreger oder durch die verwendete Präparationstechnik zu einer Ausschüttung von CXCL5 stimuliert worden sind.

7.4.2 CXCL5 ist notwendig für eine vollständige Rekrutierung der Neutrophilen

Die Rekrutierung von Neutrophilen zum Ort der Infektion erfolgt häufig über die Stimulation des Chemokin-Rezeptors CXCR2. Nach M. tuberculosis-Infektion oder LPS-Stimulation von *Cxcr2^{-/-}* Tieren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Migration von PMNs in den Alveolarraum vollständig inhibiert war [67, 233]. Der Chemokin-Rezeptor ist demnach essentiell für die Neutrophilen-Rekrutierung in diesen Infektionsmodellen. Oft werden Chemokine, die an einen gemeinsamen Rezeptor binden, als redundant angesehen. Dass dies für die CXCR2 Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL5 nicht der Fall zu sein scheint, wurde bereits im murinen Tuberkulose-Modell dargestellt [67] und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden: Im Zuge einer S. pn.-Infektion und nach mechanischer Beatmung resultierte der Knockout von Cxcl5 in einer um 67 bzw. 53 % reduzierten Infiltration von Neutrophilen in den Alveolarraum, ein Prozess welcher durch andere Neutrophile-rekrutierende Vorgänge nicht kompensiert werden konnte. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Nouailles et al. dargestellten Beobachtungen und widersprechen damit denen von Mei et al., die eine Migrations-hemmende Wirkung von CXCL5 im Zuge einer E. coli-Infektion beschrieben hatten [67, 171]. Die Rekrutierung der Neutrophilen von der Zirkulation ins Lungengewebe konnte in der vorliegenden Arbeit an den im Blut gemessenen Zellzahlen nicht beobachtet werden: Weder nach einer S. pn.-Infektion noch infolge einer Ventilation konnte ein signifikanter Rückgang der gemessenen Neutrophilen im Blut von WT oder Cxcl5-defizienten Tieren beobachtet werden. Dies könnte in einer schnellen Rekrutierung neuer PMNs aus dem Knochenmark begründet liegen, wo bis zu 120 Millionen Neutrophile gespeichert werden. Dadurch kann sich die Menge an Blut-Neutrophilen innerhalb von Stunden um das zehnfache steigern [234]. Im Blut, aber nicht im Alveolarraum, wiesen Cxcl5-defiziente Mäuse bereits vor einer mechanischen Ventilation tendenziell mehr Neutrophile auf als die WT Tiere. Nouailles et al., die den gleichen Knockout-Stamm nutzten, der auch für die vorliegenden Arbeit verwendet wurde, konnten bereits nachweisen, dass naive Cxcl5-defiziente Tiere mehr Neutrophile im Knochenmark aufweisen als WT Mäuse. Bisher ist kein direkter Einfluss von CXCL5 auf die Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark bekannt. Stattdessen konnte bisher gezeigt werden, dass PMNs über den Rezeptor CXCR4 und seinen Liganden CXCL12 im Knochenmark zurückgehalten werden, während CXCR2 mit den Liganden CXCL1 und CXCL2 die Freisetzung der PMNs ins Blut initiiert [151]. Da aber auch CXCL5 an CXCR2 bindet, wäre ein Effekt des Chemokins auch auf die Abgabe der Neutrophilen aus dem

Knochenmark denkbar. Möglicherweise kommt es zu einer Ansammlung dieser Zellen in Knochenmark und Blut, da sie auch unter basalen Bedingungen in Abwesenheit von CXCL5 nur vermindert in die Gewebe rekrutieren können. In weiterführenden Experimenten sollten mittels Durchflusszytometrie die Immunzellen im Blut naiver Tiere erneut überprüft werden, um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, ob naive *Cxcl5^{-/-}* Mäuse neben der erhöhten Anzahl von Neutrophilen im Knochenmark auch mehr PMNs im Blut aufweisen.

7.4.3 CXCL5-unabhängige Wege der Neutrophilen-Rekrutierung

Da eine Deletion von Cxc/5 nicht zu einer vollständigen Inhibition der PMN-Migration führt, scheinen weitere, CXCL5-unabhängige Mechanismen bei einer S. pn.-Infektion und dem Modell der mechanischen Ventilation dazu führen zu können, dass diese Immunzellen zum Ort der Inflammation wandern. Weitere CXCR2-abhängige Wege wirken über CXCL1 und möglicherweise auch über CXCL2. Wenn die Liganden von CXCR2 inhibiert oder deletiert werden, kommt es bei vielen Infektionsmodellen, analog zu dem hier vorliegenden, zu einer Reduktion der Neutrophilen-Infiltration ins Gewebe [235, 236]. So scheint beispielsweise eine Neutralisierung des Chemokins CXCL2 in einer Klebsiella pneumoniae-Pneumonie zu einer stark verminderten Migration von PMNs zu führen [237]. Allerdings ist für ein murines Modell einer pulmonalen Nocardia asteroides-Infektion beschrieben, dass CXCL2 keinen Effekt bei der Neutrophile-Rekrutierung aufweist [238]. In einem Kombinationsmodell aus i.p.verabreichtem Alkohol und S. pn.-Infektion konnte rekombinantes CXCL1, nicht aber CXCL2 zu einer Eliminierung der Pathogene führen. Ursächlich dafür könnte eine mit Hilfe des Chemokins induzierte Migration von Neutrophilen gewesen sein. Diese Zellen wurden in dieser Studie von den Autoren allerdings nicht guantifiziert [239]. Die Liganden von CXCR2 scheinen demnach in den genannten Studien wie auch in der vorliegenden Arbeit keine redundanten, sondern additive Effekte auf die Rekrutierung von Neutrophilen in den Alveolarraum auszuüben. Welche prozentualen Anteile CXCL1 und CXCL2 an der Rekrutierung von Neutrophilen in Folge einer S. pn.-Infektion besitzen, sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Eine Blockade des geteilten Rezeptors CXCR2 in Infektionsexperimenten oder nach LPS-Stimulation führt häufig zur kompletten Inhibierung der PMN-Rekrutierung [67, 233, 240]. Dies ist auch in Modellen einer sterilen Inflammation, wie einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung zu beobachten. Auch hier kann eine Blockierung von CXCR2 zur vollständigen Inhibition der PMN-Infiltrierung ins entzündliche Gewebe führen [241].

Aber auch CXCR2-unabhängige Signalwege können eine Migration von Neutrophilen ins Lungengewebe bewirken. Dies zeigte sich in einigen Infektionsexperimenten, unter anderem mit *S. pn.*-infizierten *Cxcr2*-defizienten Tieren [242]. In diesen Experimenten oder nach

Blockierung des Rezeptors mit Hilfe eines anti-CXCR2 Antikörpers und anschließender Infektion mit *Legionella pneumophila*, zeigte sich jeweils eine starke Verminderung, jedoch keine vollständige Inhibition der Neutrophilen-Migration in den Alveolarraum [242, 243]. Weitere Veröffentlichungen zeigen ebenfalls lediglich eine Reduktion der Neutrophilen-Infiltration, allerdings wurde bei nicht die Migration in den Alveolarraum, sondern die Neutrophilen im Lungengewebe quantifiziert [161, 238]. Reutershan *et al.* konnten zeigen, dass *Cxcr2*-defiziente Neutrophile nach LPS-Stimulation nicht in den Alveolarraum wanderten, jedoch im Lungengewebe zu finden waren. Mit Hilfe einer separaten Färbung systemischer und lokaler Neutrophiler und einer Perfusion der Lunge konnten die Autoren des Weiteren zeigen, dass sich die Zellen im vaskulären Kompartiment und in Adhärenz zu den Gefäßwänden befanden. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine klassische Analyse des gesamten lavagierten Lungengewebes auch die vaskulär adhärenten Neutrophile erfasst und somit nicht spezifisch jene Neutrophile identifizieren kann, die ins interstitielle Gewebe migriert sind [233].

Eine Inhibition der Signalweiterleitung des CXCR2 Rezeptors in einem sterilen Inflammationsmodell mit Zigarettenrauch führte ebenfalls zu einer Reduktion, aber keiner vollständigen Blockierung des Einstroms an Neutrophilen [244]. Es konnte beispielsweise in einem Arthritis-Modell gezeigt werden, dass Leukotrin B₄, ein Lipid Metabolit, dass in Leukozyten vorkommt, über die Bindung an den Rezeptor BLT1 auf der Oberfläche von Neutrophilen ebenfalls eine Migration der Zellen zum Inflammationsort induziert [231]. Ein weiterer Chemokin-Rezeptor auf der Oberfläche von PMNs ist CCR1, der beispielsweise die Liganden CCL3, CCL4 und CCL5 bindet. Bei einer *Candida*-Infektion hatte dieser Rezeptor einen positiven Einfluss auf die Rekrutierung der Neutrophilen in die Nieren der Versuchstiere [245]. Auch eine Überexpression von CCL5 im Lungengewebe führte zu einer verstärken Migration von PMNs [246].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CXCL5 nicht der einzige Ligand des Rezeptors CXCR2 ist, der in sterilen und infektiösen Inflammationsmodellen die Rekrutierung von Neutrophilen herbeiführen kann. Des Weiteren sind auch CXCR2-unabhängige Wege bekannt, die die Migration dieser Immunzellen initiieren können. Dennoch muss hervorgehoben werden, dass eine Deletion von *Cxcl5* eine starke Reduktion der PMN-Rekrutierung bewirkt und CXCL5 in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Modellen demnach das wichtigste Chemokin für die Migration von Neutrophilen ist.

7.4.4 Folgen einer reduzierten Neutrophile-Rekrutierung

Vielfach wurde gezeigt, dass Neutrophile essentiell sind für die Elimination der Pneumokokken in der Lunge [192, 242, 247]. Aus diesem Grund kann geschlussfolgert werden, dass die in

der vorliegenden Arbeit beobachtete erhöhte bakterielle Last in den Cxc/5-defizienten Tieren in der verminderten Anzahl an Neutrophilen im Alveolarraum begründet liegt. Dagegen zeigte sich die Zahl der alveolären Makrophagen im Vergleich zum WT erhöht. Alveoläre Makrophagen, wie bereits von Knapp et al. und Morimoto et al. beschrieben, spielen in einer S. pn.-Infektion eine tragende Rolle bei der Beseitigung körpereigener Zellreste wie apoptotischer Neutrophiler und tragen weniger zur Eliminierung des Pathogens bei [83, 84]. Die Phagozytose der toxischen Zellbestandteile ist dabei essentiell für die Resolution der Inflammation [83]. Es ist bekannt, dass die Phagozytose zellulärer Bestandteile alveoläre Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen anregt [248, 249]. Durch intratracheale Verabreichung des Pneumokokken-eigenen Virulenzfaktors Pneumolysin wurde gezeigt, dass dieser eine Reduktion der alveolären Makrophagen bewirkt [250]. Auch im Zuge viraler Infektionen oder bei Erkrankungen mit intrazellulären Bakterien kommt es zu einer Verminderung alveolärer Makrophagen [251-253]. Ursächlich hierfür ist, dass diese Pathogene Makrophagen als Wirtszellen einnehmen und die Immunzellen über eine induzierte Apoptose die Elimination der Erreger herbeiführen können [254]. Bei aus inflammatorischen Monozyten differenzierten Makrophagen, die selbst Bakterien eliminieren, wurde der Vorgang der induzierten Apoptose nach einer S. pn.-Infektion ebenfalls bereits beschrieben [255].

In dem in der vorliegenden Arbeit gewählten Modell der mechanischen Beatmung konnte kein Unterschied in der Menge alveolärer Makrophagen im Alveolarraum zwischen WT und *Cxcl5^{-/-}* Mäusen festgestellt werden. Möglicherweise war hier die Menge apoptotischer Neutrophiler geringer, da diese nicht die Aufgabe der Pathogen-Eliminierung übernahmen. Es sollte demnach in weiterführenden Experimenten zum einen untersucht werden, wie viele der gemessenen Neutrophilen Apoptose-Marker tragen (z. B. 7-AAD und Annexin V [256]). Des Weiteren könnte überprüft werden, ob eine reduzierte Anzahl apoptotischer Neutrophiler dazu führt, dass alveoläre Makrophagen vermindert diese zellulären Bestandteile beseitigen und ob dies vor dem Verlust dieser anti-inflammatorisch agierenden Zellen im Alveolarraum schützen könnte.

Im vorherigen Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der bakteriellen Last mittels (verspäteter) antibakterieller Therapie nicht unmittelbar die Schädigung des umliegenden Gewebes vermindert. In *Cxcl5*-defizienten und *S. pn.*-infizierten Versuchstieren war die Zahl an Pneumokokken erhöht. Dies schien ebenfalls nicht direkt zu einer Entwicklung von Ödemen oder einer vermehrten Schädigung der alveolokapillären Barriere zu führen. Die Mortalität der Tiere war nicht beeinflusst, was möglicherweise im Zusammenhang mit dem Schutz der zellulären Barriere stand. Der Virulenzfaktor PLY hat einen direkten negativen Einfluss auf die alveolokapilläre Barriere und kann zur Schädigung des Lungengewebes führen, weshalb eine erhöhte bakterielle Last stets mit einer gesteigerten vaskulären Permeabilität assoziiert wurde [250, 257]. Diese Beobachtung konnte basierend

auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt werden. Vielmehr ließ sich ein protektiver Effekt einer verminderten Neutrophile-Rekrutierung, trotz vermehrter Pneumokokken, beobachteten. Die Menge an freigesetztem PLY in Alveolarraum und Lunge wurde allerdings nicht quantifiziert, dies könnte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Zusätzlich könnte die Analyse weiterer Zeitpunkte nach der Infektion zeigen, ob die erhöhte bakterielle Last im weiteren Verlauf der Infektion eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität mit sich bringt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten Versuche anderer Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen pulmonalen Infektionserregern, dass die CXCR2vermittelte vollständige Rekrutierung von Neutrophilen die Versuchstiere schützt und eine verminderte oder inhibierte PMN-Migration die Mortalität erhöht [161, 235, 238]. Eine stark reduzierte Neutrophile-Infiltration bei S. pn.-infizierten Cxcr2-Knockout Mäusen führte zu einer signifikant erhöhten bakteriellen Last und einer Mortalität von 100 % innerhalb von vier Tagen p.i. [242]. Die Autoren dieser Studie zeigten des Weiteren, dass ein prozentualer Knockout von Cxcr2 von 10 - 75 % die bakterielle Last stufenweise erhöht, was mit einer sinkenden Überlebensrate der Tiere assoziiert war. Die zusammenfassende Aussage der Studie war, dass bereits eine Reduktion der lokalen Neutrophilen um 10 bis 25 % zu einer gesteigerten Mortalität S. pn.-infizierter Mäuse führt. Dagegen zeigten die Analysen der vorliegenden Arbeit, dass eine um mehr als die Hälfte reduzierte Neutrophilen-Infiltration, die mit einer erhöhten bakteriellen Last assoziiert war, keine verschlechterte Überlebensrate mit sich brachte. Mögliche Gründe für diese Abweichungen könnte die Verwendung unterschiedlicher Maus- und Bakterienstämme sein. Die von Herbold et al. genutzten BALB/c Mäuse scheinen beispielsweise weniger resistent gegenüber einer S. pn.-Infektion zu sein als der für die vorliegende Arbeit verwendete C57BL/6J Stamm [258]. Des Weiteren wiesen die infizierten WT Tiere eine höhere bakterielle Last und eine stärkere Rekrutierung von Neutrophilen zum Zeitpunkt 24 h p.i. auf als die Mäuse in den Experimenten für diese Doktorarbeit, was ebenfalls ursächlich für die beobachteten Unterschiede in den Überlebensraten sein könnte. Weiterführende Experimente mit einer höheren Infektionsdosis könnten Hinweise darauf geben, ab welchem Umfang eine vermehrte und unkontrollierte Pneumokokkenlast zu irreversiblen Schädigungen des umliegenden Gewebes und einer signifikanten Erhöhung der Mortalität führt.

Wie sich eine vollständige Depletion von Neutrophilen auf die bakterielle Last bei einer *S. pn.*-Infektion auswirkt, wurde von Garvy und Harmsen [247] untersucht: Bei einer Infektion mit einer geringen Infektionsdosis scheint die Depletion von Neutrophilen keinen Einfluss auf die bakterielle Last zu haben. Im Gegensatz dazu führte eine vorherige Eliminierung der PMNs nach Infektion mit einer hohen Infektionsdosis zu einer unkontrollierten Vermehrung der Bakterien in der Lunge. Allerdings muss angemerkt werden, dass in diesen Versuchen ein anti-GR-1 Antikörper für die Depletion verwendet wurde. GR-1 bindet jedoch an Ly6G auf Neutrophilen wie auch an Ly6C auf Monozyten, weshalb in dieser Studie wahrscheinlich nicht nur Neutrophile, sondern auch Monozyten depletiert wurden und somit keine Aussage darüber getroffen werden kann, inwieweit sich eine alleinige Neutrophilen-Depletion auf die bakterielle Last auswirkt. Aussagen über die Beschaffenheit der alveolokapillären Barriere oder die Mortalität der untersuchten Tiere wurden in dieser Studie leider nicht getroffen.

In Cxc/5^{-/-} Mäusen konnte in der vorliegenden Arbeit auch im Anschluss an eine mechanische Beatmung eine geschützte alveolokapilläre Barriere und eine verbesserte Dehnbarkeit der Lunge beobachtet werden. Die untersuchten WT Tiere wiesen im Vergleich zur Cxc/5-/--Gruppe eine erhöhte vaskuläre Permeabilität auf. Thatcher et al. konnten in einem anderen murinen Modell steriler Inflammation, induziert durch Zigarettenrauch, beobachten, dass eine reduzierte Anzahl von Neutrophilen ebenfalls zu einer verminderten Schädigung des Lungengewebes führt [244]. Eine Inhibition der PMN-Infiltration wie auch eine Depletion von Neutrophilen führte ebenfalls zu einer Verminderung der Gewebeschädigung in einem Reperfusionsschaden-Modell in Kaninchen, bei dem eine induzierte Durchblutung eines vorher minderdurchbluteten Gewebes eine Schädigung induzieren kann [259]. Es lässt sich aus den in der vorliegenden Arbeit generierten Ergebnissen schlussfolgern, dass nicht primär die Pneumokokken für die Schädigung der alveolokapillären Barriere verantwortlich sind. Vielmehr weisen die Analysen darauf hin, dass die Reaktionen des Immunsystems des Wirtes vermehrt zur Erhöhung der vaskulären Permeabilität beitragen. Zur Validierung dieser Ergebnisse sollten diese Versuche mit einer höheren Infektionsdosis oder einem anderen Mausstamm wiederholt werden, um das Modell robuster zu gestalten. Die reine Anwesenheit von Neutrophilen scheint in dem gewählten S. pn.-Infektionsmodell nicht zu einer Schädigung der alveolokapillären Barriere zu führen, wie nach früher und später antimikrobieller Therapie beobachtet wurde. Ob in den untersuchten Inflammationsmodellen die von aktivierten PMNs am Ort der Inflammation sekretierten zytotoxischen Moleküle alleine oder bereits der Vorgang der Migration der Neutrophilen durch die Zellen der alveolokapillären Membran die Schädigung herbeiführt, sollte in weiterführenden Experimenten näher betrachtet werden. Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten einerseits, dass die Rekrutierung von Neutrophilen durch die zelluläre Barriere ohne eine Schädigung ablaufen kann [109], allerdings widersprechen andere Studien dieser Beobachtung und zeigen, dass durch den Vorgang der Migration PMNs die Apoptose von Epithelzellen bewirken können [110-112].

7.4.5 <u>Möglicher therapeutischer Effekt von CXCL5 und einer verminderten oder</u> inhibierten Neutrophile-Rekrutierung

Eine vollständige Inhibierung der Neutrophile-Rekrutierung ist beim Menschen nicht praktikabel, da der Patient sich erst mit etablierter Infektion beim Arzt vorstellt. Dennoch könnte eine Verminderung zusätzlich infiltrierender PMNs als adjuvante Therapie bei einer Pneumonie oder anderen Erkrankungen mit starker Neutrophile-Migration vorteilhaft sein. Bei erfolgreicher Eliminierung der Infektionserreger mit Hilfe einer antibakteriellen Therapie wäre eine Reduktion der infiltrierenden Neutrophilen möglicherweise sinnvoll, um eine mit Neutrophilen assoziierte Schädigung des infizierten Gewebes zu vermindern. Bei Infektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien sollte eine solche Therapie allerdings nicht angewendet werden, da Neutrophile einen großen Beitrag bei der Beseitigung von Bakterien leisten und eine unkontrollierte Vermehrung der Pathogene zusätzlich schädlich für die Infizierten wäre. Eine Übersichtsarbeit von Boppana et al. fasst eine große Anzahl von CXCR1- und CXCR2-Inhibitoren zusammen, die bei den untersuchten Krankheitsmodellen die Neutrophile-Rekrutierung vermindern oder vollständig blockieren können [260]. Es gibt mehrere Ansätze zur Unterbindung der Wirksamkeit eines Rezeptors. Antagonisten, auch Inhibitoren genannt, binden an einen Rezeptor (an oder außerhalb der Bindungsstelle des Liganden) und verhindern durch die induzierte Konformationsänderung des Proteins die Bindung und Signalinduktion der eigentlichen Liganden. So konnten beispielsweise die CXCR2-Inhibitoren Antileukinate und Reparixin in vivo eine Bleomycin- bzw. LPS-induzierte Neutrophilen-Rekrutierung in die Lunge reduzieren [261, 262]. In beiden Modellen konnte einhergehend mit der verminderten PMN-Migration ebenfalls eine geringere vaskuläre Permeabilität gemessen werden. Ein anderer therapeutischer Ansatz umfasst Chemokin-Analoga, die im Gegensatz zu Antagonisten dem eigentlichen Liganden strukturell sehr ähnlich sind und an dessen Stelle am Rezeptor binden, aber keine Signalweiterleitung induzieren. So konnte in dem bereits genannten Modell der Zigarettenrauch-induzierten sterilen Inflammation das Chemokin-Analogon SCH-N die Migration von Neutrophilen in die Bronchien inhibieren und damit einhergehend die Inflammation in der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindern [244]. Weiterführende Experimente, die eine verspätete antibakterielle Behandlung mit einer Blockade von CXCR2 oder einer Deletion von Cxcl5 kombinieren, könnten hilfreich sein, um einen möglichen Ansatz für eine adjuvante Therapie in der Pneumonie zu untersuchen. Auch eine Reduktion der Neutrophilen-Infiltration bei der mechanischen Ventilation kann von Vorteil sein, um eine Schädigung des Lungengewebes und eine Verschlechterung der Lungenfunktion zu vermindern. Um zu untersuchen, ob mechanisch beatmete Patienten von solch einer Therapie profitieren würden, könnten Antikörper zur Neutralisierung von CXCL5 oder zur Blockierung von CXCR2 in weiteren Experimenten mit WT Tieren mit Beginn der

Beatmung zum Einsatz kommen. Dies wäre ein therapeutischer Ansatz, der im Gegensatz zu einer *Cxcl5* Deletion auch im Patienten anwendbar wäre.

7.4.6 <u>Mechanismen hinter dem Schutz der alveolokapillären Barriere in Abwesenheit</u> von CXCL5

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass die Deletion von Cxcl5 zu einer verringerten Schädigung des Lungengewebes und einem Schutz der alveolokapillären Barriere führt. Dies könnte damit erklärt werden, dass weniger Neutrophile zum Ort der Inflammation rekrutiert werden, was mit einer verminderten Schädigung des umliegenden Gewebes assoziiert werden kann. Neben Neutrophilen exprimieren aber auch Endothelzellen und Bronchialepithelzellen den Chemokin-Rezeptor CXCR2, an welchen CXCL5 bindet [233]. Es könnte demnach auch einen direkten Einfluss von CXCL5 auf die Endothelzellen der alveolokapillären Barriere geben, der bei WT Tieren zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität führen kann. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass in Cxcr2^{-/-} Mäusen nach einer LPS-Injektion in das Gehirn neben einer verminderten Neutrophile-Rekrutierung die zerebralen Endothelzellen auch eine reduzierte Expression von Adhäsions-Molekülen im Vergleich zur WT Gruppe aufwiesen, was die Infiltration von Leukozyten vermindern könnte. Des Weiteren scheint CXCR2 für eine Aktivierung der Endothelzellen essentiell zu sein [263]. Diese Aktivierung ließ sich aber auch durch CXCL1 induzieren, weshalb nicht gesagt werden kann, dass CXCL5 für diese CXCR2-induzierte Endothel-Aktivierung essentiell ist. Für die Lunge konnte gezeigt werden, dass CXCR2 auf Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs benötigt wird, um nach einer LPS-Stimulation die vaskuläre Permeabilität zu erhöhen [233]. Es kann neben der reduzierten Migration von Neutrophilen aufgrund der Abwesenheit eines CXCL5-Chemokingradienten also auch der direkte Effekt von CXCL5 auf die Zellen der alveolokapillären Barriere ausschlaggebend für den Schutz vor einer erhöhten vaskulären Permeabilität sein.

Weiterführende Experimente sollten durchgeführt werden, um die zugrundeliegenden Mechanismen zu untersuchen. Eine Antikörper-vermittelte Depletion von Neutrophilen mit anschließender mechanischer Beatmung könnte zeigen, ob Unterschiede in der induzierten Permeabilität zwischen WT und *Cxcl5^{-/-}* Mäusen auch unabhängig von rekrutierten Neutrophilen auftreten. Ein weiterer Ansatz könnte in der Generation von Maus-Chimären liegen, wie es bereits von Reutershan *et al.* untersucht wurde [233]. Die Autoren dieser Studie konnten beobachten, dass die CXCR2-Expression auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs zwar essentiell ist für eine LPS-induzierte PMN-Rekrutierung in den Alveolarraum, aber keine Veränderung der vaskulären Permeabilität mit sich bringt. Wenn andererseits lediglich Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs (wie beispielsweise Endothelzellen) *Cxcr2*-defizient waren

und Neutrophile ungehindert dem Chemokingradienten in der Lunge folgen konnten, war die alveolokapilläre Barriere geschützt. Reutershan et al. schlussfolgerten aus diesen Ergebnissen, dass allein die Expression des Chemokin-Rezeptors auf nichthämatopoetischen Zellen ausschlaggebend ist für die Schädigung der zellulären Barriere. Allerdings nutzte diese Arbeitsgruppe kleine Versuchsgruppen, bestehend aus vier Tieren und LPS als Stimulanz. LPS ist auf gramnegativen Bakterien zu finden und ruft damit möglicherweise eine andere Immunreaktion hervor als ein grampositiver Infektionserreger oder eine im Zuge einer mechanischen Beatmung hervorgerufene sterile Inflammation. Aber auch nach einer LPS-Stimulation kommt es zum Einstrom von Neutrophilen, welche in Apoptose und Nekrose gehen und von alveolären Makrophagen eliminiert werden [264]. Dennoch könnte die Verwendung von Chimären aus WT und Cxcr2^{-/-} Aufschluss darüber geben, ob auch im Falle einer mechanischen Beatmung oder einer S. pn.-Infektion die CXCR2 Expression auf Endothelzellen essentiell für die Schädigung der alveolokapillären Barriere ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine intakte alveolokapilläre Barriere neben ihrer Aufgabe des Gasaustauschs essentiell ist, um eine unkontrollierte Ausbreitung einer Inflammation aus der Lunge in die Peripherie zu verhindern und der Bildung von Ödemen entgegenzuwirken. Eine umgehende antimikrobielle Behandlung und die Reduktion der infiltrierenden Neutrophilen in den Alveolarraum sind Wege, die vor eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität schützen können. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern eine Kombination beider Modelle als möglicher Ansatz für die Therapie von Pneumonie-Patienten dienen kann, um die seit Jahrzehnten gleichbleibende Mortalität dieser Infektionskrankheit zu senken.

8 Literaturverzeichnis

- 1. World Health Organization (WHO). **The top 10 causes of death. Fact sheet 310** [updated May 2018]. Geneva, Switzerland: WHO. Accessed 28.05.2018 [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/]
- 2. World Health Organization (WHO). **Fact Sheet Pneumonia** [updated November 2016]. Geneva, Switzerland: WHO. Accessed 28.05.2018
- 3. Statistisches Bundesamt (Destatis). **Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt** Accessed 23.05.2017 [https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/ Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html]
- 4. Kolditz M, Tesch F, Mocke L, Hoffken G, Ewig S, Schmitt J: **Burden and risk factors** of ambulatory or hospitalized CAP: A population based cohort study. *Respir Med* 2016, **121**:32-38.
- 5. Ludwig E, Bonanni P, Rohde G, Sayiner A, Torres A: **The remaining challenges of pneumococcal disease in adults**. *Eur Respir Rev* 2012, **21**(123):57-65.
- 6. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G: New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* 2009, **64**(12):1062-1069.
- 7. Tilghman R, Finland M: Clinical significance of bacteremia in pneumococcic pneumonia. *Archives of internal medicine* 1937, **59**(4):602-619.
- 8. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, Reed C, Grijalva CG, Anderson EJ, Courtney DM *et al*: **Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults**. *The New England journal of medicine* 2015, **373**(5):415-427.
- GmbH A-IfaQuFiG: Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2014. PNEU Ambulant erworbene Pneumonie. Qualitätsindikatoren. 2015. In.: AQUA - Institut für angewandte Qualitätsförderung und Forschung im Gesundheitswesen GmbH; 2015.
- 10. Brown PD, Lerner SA: **Community-acquired pneumonia**. *The Lancet* 1998, **352**(9136):1295-1302.
- 11. Welte T, Torres A, Nathwani D: Clinical and economic burden of communityacquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012, **67**(1):71-79.
- 12. Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E: Nasopharyngeal carriage of Streptococcus pneumoniae by adults and children in community and family settings. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004, **38**(5):632-639.
- 13. Gray BM, Converse GM, 3rd, Dillon HC, Jr.: Epidemiologic studies of Streptococcus pneumoniae in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis* 1980, 142(6):923-933.
- 14. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS: **The Streptococcus pneumoniae Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms**. *Infection and Immunity* 2010, **78**(2):704-715.
- 15. Seyoum B, Yano M, Pirofski LA: The innate immune response to Streptococcus pneumoniae in the lung depends on serotype and host response. *Vaccine* 2011, **29**(45):8002-8011.
- 16. Pletz MW, Ewig S, Heppner HJ, Welte T: [Position Paper on Adult Pneumococcal Vaccination: Position Paper of the German Respiratory Society and the German Geriatric Society]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2015, **69**(11):633-637.
- 17. Gattarello S, Borgatta B, Solé-Violán J, Vallés J, Vidaur L, Zaragoza R, Torres A, Rello J: Decrease in Mortality in Severe Community-Acquired Pneumococcal Pneumonia: Impact of Improving Antibiotic Strategies (2000-2013). Chest 2014, 146(1):22-31.

- Kolditz M, Ewig S, Klapdor B, Schutte H, Winning J, Rupp J, Suttorp N, Welte T, Rohde G: Community-acquired pneumonia as medical emergency: predictors of early deterioration. *Thorax* 2015, **70**(6):551-558.
- 19. Daniel P, Rodrigo C, McKeever TM, Woodhead M, Welham S, Lim WS, British Thoracic S: Time to first antibiotic and mortality in adults hospitalised with communityacquired pneumonia: a matched-propensity analysis. *Thorax* 2016, **71**(6):568-570.
- 20. Phua J, Dean NC, Guo Q, Kuan WS, Lim HF, Lim TK: Severe community-acquired pneumonia: timely management measures in the first 24 hours. *Critical care (London, England)* 2016, **20**:237.
- 21. Ewig S, Hoffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gatermann S *et al*: [Management of Adult Community-acquired Pneumonia and Prevention Update 2016]. *Pneumologie (Stuttgart, Germany)* 2016, **70**(3):151-200.
- 22. Mainardi J-L, Villet R, Bugg TD, Mayer C, Arthur M: Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2008, **32**(2):386-408.
- 23. Anderson R, Steel HC, Cockeran R, Smith AM, von Gottberg A, de Gouveia L, Brink A, Klugman KP, Mitchell TJ, Feldman C: Clarithromycin alone and in combination with ceftriaxone inhibits the production of pneumolysin by both macrolide-susceptible and macrolide-resistant strains of Streptococcus pneumoniae. *J Antimicrob Chemother* 2007, **59**(2):224-229.
- 24. Steel HC, Theron AJ, Cockeran R, Anderson R, Feldman C: **Pathogen- and hostdirected anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics**. *Mediators of inflammation* 2012, **2012**:584262.
- 25. Nie W, Zhang Y, Cheng J, Xiu Q: **Corticosteroids in the treatment of community**acquired pneumonia in adults: a meta-analysis. *PloS one* 2012, **7**(10):e47926.
- 26. Siemieniuk RA, Meade MO, Alonso-Coello P, Briel M, Evaniew N, Prasad M, Alexander PE, Fei Y, Vandvik PO, Loeb M *et al*: Corticosteroid Therapy for Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of internal medicine* 2015, **163**(7):519-528.
- 27. Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schutte H *et al*: **Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability**. *Circ Res* 2002, **91**(7):618-625.
- 28. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrueck B, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzenrath M, Brell B, Suttorp N, Hippenstiel S: **Perturbation of endothelial junction proteins by Staphylococcus aureus alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin**. *Histochemistry and cell biology* 2006, **126**(3):305-316.
- 29. Hagner S, Welz H, Kicic A, Alrifai M, Marsh LM, Sutanto EN, Ling KM, Stick SM, Muller B, Weissmann N *et al*: **Suppression of adrenomedullin contributes to vascular leakage and altered epithelial repair during asthma**. *Allergy* 2012, **67**(8):998-1006.
- 30. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M: Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *The American journal of pathology* 2006, **168**(6):1921-1930.
- 31. Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel Á, Suttorp N, Rosseau S: Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax* 2010, **65**(12):1077-1084.
- 32. Muller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, Paddenberg R, Menger MD, Kershaw O, Gruber AD *et al*: **Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin**. *Critical care (London, England)* 2014, **18**(2):R73.
- 33. Leeper KV, Jr., Torres A: **Community-acquired pneumonia in the intensive care unit**. *Clinics in chest medicine* 1995, **16**(1):155-171.
- 34. Mongardon N, Max A, Bougle A, Pene F, Lemiale V, Charpentier J, Cariou A, Chiche JD, Bedos JP, Mira JP: **Epidemiology and outcome of severe pneumococcal pneumonia admitted to intensive care unit: a multicenter study**. *Critical care (London, England)* 2012, **16**(4):R155.

- 35. Pierson DJ: Indications for mechanical ventilation in adults with acute respiratory failure. *Respiratory care* 2002, **47**(3):249-262; discussion 262-245.
- 36. Ferrer M, Travierso C, Cilloniz C, Gabarrus A, Ranzani OT, Polverino E, Liapikou A, Blasi F, Torres A: Severe community-acquired pneumonia: Characteristics and prognostic factors in ventilated and non-ventilated patients. *PloS one* 2018, **13**(1):e0191721.
- 37. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2000, **342**.
- 38. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G: **High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure**. *The American review of respiratory disease* 1988, **137**(5):1159-1164.
- 39. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS: Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama* 1999, 282(1):54-61.
- 40. Woods SJ, Waite AA, O'Dea KP, Halford P, Takata M, Wilson MR: **Kinetic profiling** of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015, **308**(9):L912-921.
- 41. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ: **Mechanical** ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Critical care (London, England)* 2009, **13**(1):R1.
- 42. Maniatis NA, Kardara M, Hecimovich D, Letsiou E, Castellon M, Roussos C, Shinin V, Votta-Vellis EG, Schwartz DE, Minshall RD: **Role of caveolin-1 expression in the pathogenesis of pulmonary edema in ventilator-induced lung injury**. *Pulmonary circulation* 2012, **2**(4):452-460.
- 43. Wolfson RK, Mapes B, Garcia JGN: Excessive mechanical stress increases HMGB1 expression in human lung microvascular endothelial cells via STAT3. *Microvascular research* 2014, **92**:50-55.
- 44. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS: Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *Jama* 2000, 284(1):43-44.
- 45. Hepokoski M, Englert JA, Baron RM, Crotty-Alexander LE, Fuster MM, Beitler JR, Malhotra A, Singh P: Ventilator-induced lung injury increases expression of endothelial inflammatory mediators in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 2017, **312**(4):F654-f660.
- 46. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, Liles WC: Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extrapulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2006, **86**(8):790-799.
- 47. O'Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert CW, Liggitt D, Martin TR, Matute-Bello G: Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Critical care (London, England)* 2006, 10(5):R136.
- 48. Barrowcliffe MP, Jones JG: **Solute permeability of the alveolar capillary barrier**. *Thorax* 1987, **42**(1):1-10.
- 49. Guillot L, Nathan N, Tabary O, Thouvenin G, Le Rouzic P, Corvol H, Amselem S, Clement A: **Alveolar epithelial cells: Master regulators of lung homeostasis**. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013, **45**(11):2568-2573.
- 50. Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD, Millar AB: **Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells**. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **31**(2):241-245.

- 51. Millan J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ: Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveola- and F-actin-rich domains. *Nature cell biology* 2006, **8**(2):113-123.
- 52. Carman CV, Sage PT, Sciuto TE, de la Fuente MA, Geha RS, Ochs HD, Dvorak HF, Dvorak AM, Springer TA: **Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes**. *Immunity* 2007, **26**(6):784-797.
- 53. Bazzoni G, Dejana E: Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* 2004, **84**(3):869-901.
- 54. Vestweber D: Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation through endothelial cell contacts. *Ernst Schering Foundation symposium proceedings* 2007(3):151-167.
- 55. Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E: **Histamine Induces Tyrosine Phosphorylation of Endothelial Cell-to-Cell Adherens Junctions**. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 1999, **19**(10):2286-2297.
- 56. Weis SM, Cheresh DA: Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005, **437**(7058):497-504.
- 57. Garcia JG, Schaphorst KL: **Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability**. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 1995, **43**(2):117-126.
- 58. Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W: Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 1998, **111 (Pt 13)**:1853-1865.
- 59. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG: The role of adherens junctions and VEcadherin in the control of vascular permeability. *Journal of cell science* 2008, 121(Pt 13):2115-2122.
- 60. Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER: **Cell number and cell characteristics of the normal human lung**. *The American review of respiratory disease* 1982, **126**(2):332-337.
- 61. Cerrada A, de la Torre P, Grande J, Haller T, Flores AI, Perez-Gil J: **Human decidua**derived mesenchymal stem cells differentiate into functional alveolar type II-like cells that synthesize and secrete pulmonary surfactant complexes. *PloS one* 2014, **9**(10):e110195.
- 62. Parmigiani S, Solari E, Bevilacqua G: **Current concepts on the pulmonary surfactant in infants**. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2005, **18**(6):369-380.
- 63. Mason RJ, Williams MC: **Type II alveolar cell. Defender of the alveolus**. *The American review of respiratory disease* 1977, **115**(6 Pt 2):81-91.
- 64. Bhaskaran M, Kolliputi N, Wang Y, Gou D, Chintagari NR, Liu L: **Trans-differentiation** of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway. *J Biol Chem* 2007, 282(6):3968-3976.
- 65. Yamamoto K, Ferrari JD, Cao Y, Ramirez MI, Jones MR, Quinton LJ, Mizgerd JP: **Type** I alveolar epithelial cells mount innate immune responses during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2012, **189**(5):2450-2459.
- 66. Cheng Ds, Han W, Chen SM, Sherrill TP, Chont M, Park GY, Sheller JR, Polosukhin VV, Christman JW, Yull FE *et al*: **Airway Epithelium Controls Lung Inflammation and Injury through the NF-B Pathway**. *The Journal of Immunology* 2007, **178**(10):6504-6513.
- 67. Nouailles G, Dorhoi A, Koch M, Zerrahn J, Weiner J, 3rd, Fae KC, Arrey F, Kuhlmann S, Bandermann S, Loewe D *et al*: **CXCL5-secreting pulmonary epithelial cells drive destructive neutrophilic inflammation in tuberculosis**. *J Clin Invest* 2014, **124**(3):1268-1282.
- 68. Chattopadhyay R, Dyukova E, Singh NK, Ohba M, Mobley JA, Rao GN: Vascular Endothelial Tight Junctions and Barrier Function Are Disrupted by 15(S)-

Hydroxyeicosatetraenoic Acid Partly via Protein Kinase Cε-mediated Zona Occludens-1 Phosphorylation at Threonine 770/772. The Journal of Biological Chemistry 2014, 289(6):3148-3163.

- 69. Taddei A, Giampietro C, Conti A, Orsenigo F, Breviario F, Pirazzoli V, Potente M, Daly C, Dimmeler S, Dejana E: Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology* 2008, 10:923.
- 70. Wang YC, Khan Z, Kaschube M, Wieschaus EF: Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature* 2012, **484**(7394):390-393.
- 71. Turner JR, Rill BK, Carlson SL, Carnes D, Kerner R, Mrsny RJ, Madara JL: **Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation**. *The American journal of physiology* 1997, **273**(4 Pt 1):C1378-1385.
- 72. Hastings RH, Folkesson HG, Matthay MA: **Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **286**(4):L679-689.
- 73. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(9):678-689.
- 74. Broermann A, Winderlich M, Block H, Frye M, Rossaint J, Zarbock A, Cagna G, Linnepe R, Schulte D, Nottebaum AF *et al*: **Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo**. *J Exp Med* 2011, **208**(12):2393-2401.
- 75. Prevotat A, Rouyer C, Gosset P, Kipnis E, Faure K, Guery B: **Biphasic lung injury during Streptococcus pneumoniae infection in a murine model**. *Medecine et maladies infectieuses* 2017.
- 76. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA: The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 1999, **27**(2):304-312.
- 77. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA: **The acute respiratory distress syndrome**. *J Clin Invest* 2012, **122**.
- 78. Weibel ER: On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, **191**(5):504-513.
- 79. Quinton LJ, Mizgerd JP: **Dynamics of lung defense in pneumonia: resistance, resilience, and remodeling**. *Annu Rev Physiol* 2015, **77**:407-430.
- 80. Kompetenznetz akute und chronische Leukämien: **Blut und Blutbildung.** [updated 31.03.2015]. Accessed 28.05.2018 [https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/ content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/]
- 81. Westphalen K, Gusarova GA, Islam MN, Subramanian M, Cohen TS, Prince AS, Bhattacharya J: Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature* 2014, **506**(7489):503-506.
- 82. Kuronuma K, Sano H, Kato K, Kudo K, Hyakushima N, Yokota S, Takahashi H, Fujii N, Suzuki H, Kodama T *et al*: **Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of Streptococcus pneumoniae by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A**. *J Biol Chem* 2004, **279**(20):21421-21430.
- 83. Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, Rooijen Nv, Poll Tvd: Alveolar Macrophages Have a Protective Antiinflammatory Role during Murine Pneumococcal Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003, **167**(2):171-179.
- 84. Morimoto K, Amano H, Sonoda F, Baba M, Senba M, Yoshimine H, Yamamoto H, Ii T, Oishi K, Nagatake T: Alveolar Macrophages that Phagocytose Apoptotic Neutrophils Produce Hepatocyte Growth Factor during Bacterial Pneumonia in Mice. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 2001, 24(5):608-615.

- 85. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, Deswarte K, Malissen B, Hammad H, Lambrecht BN: Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. The Journal of Experimental Medicine 2013, 210(10):1977-1992.
- 86. van Furth R, Cohn ZA: **THE ORIGIN AND KINETICS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES**. *The Journal of Experimental Medicine* 1968, **128**(3):415-435.
- 87. Landsman L, Jung S: Lung Macrophages Serve as Obligatory Intermediate between Blood Monocytes and Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology* 2007, **179**(6):3488-3494.
- 88. Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A: **The prolonged life-span of** alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38**(4):380-385.
- Tarling JD, Lin H-s, Hsu S: Self-Renewal of Pulmonary Alveolar Macrophages: Evidence From Radiation Chimera Studies. *Journal of leukocyte biology* 1987, 42(5):443-446.
- 90. Imperatore F, Maurizio J, Vargas Aguilar S, Busch CJ, Favret J, Kowenz-Leutz E, Cathou W, Gentek R, Perrin P, Leutz A *et al*: **SIRT1 regulates macrophage self-renewal**. *The EMBO journal* 2017, **36**(16):2353-2372.
- 91. Koppe U, Hogner K, Doehn JM, Muller HC, Witzenrath M, Gutbier B, Bauer S, Pribyl T, Hammerschmidt S, Lohmeyer J *et al*: Streptococcus pneumoniae stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. *J Immunol* 2012, **188**(2):811-817.
- 92. Islam MA, Proll M, Holker M, Tholen E, Tesfaye D, Looft C, Schellander K, Cinar MU: Alveolar macrophage phagocytic activity is enhanced with LPS priming, and combined stimulation of LPS and lipoteichoic acid synergistically induce proinflammatory cytokines in pigs. *Innate immunity* 2013, **19**(6):631-643.
- 93. Soroosh P, Doherty TA, Duan W, Mehta AK, Choi H, Adams YF, Mikulski Z, Khorram N, Rosenthal P, Broide DH *et al*: Lung-resident tissue macrophages generate Foxp3+ regulatory T cells and promote airway tolerance. *J Exp Med* 2013, 210(4):775-788.
- 94. Geissmann F, Jung S, Littman DR: Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003, **19**(1):71-82.
- 95. Davis KM, Nakamura S, Weiser JN: Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of S. pneumoniae colonization in mice. *J Clin Invest* 2011, **121**(9):3666-3676.
- 96. Winter C, Taut K, Srivastava M, Länger F, Mack M, Briles DE, Paton JC, Maus R, Welte T, Gunn MD *et al*: Lung-Specific Overexpression of CC Chemokine Ligand (CCL)
 2 Enhances the Host Defense to Streptococcus pneumoniae
 Infection in Mice: Role of the CCL2-CCR2 Axis. The Journal of Immunology 2007, 178(9):5828-5838.
- 97. Shi CS, Huang TH, Lin CK, Li JM, Chen MH, Tsai ML, Chang CC: **VEGF Production by Ly6C+high Monocytes Contributes to Ventilator-Induced Lung Injury**. *PloS one* 2016, **11**(10):e0165317.
- 98. Gane JM, Stockley RA, Sapey E: TNF-α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The Pro- and Anti-Inflammatory Roles of the TNF-α Receptors Support the Concept of Selective TNFR1 Blockade In Vivo. Journal of immunology research 2016, 2016:13.
- 99. Zheng MZ, Pan HD, Pan JX, Guo JX: Monocyte-induced NK cell inactivation: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2011, **33**(1):150-156.
- 100. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P *et al*: **Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance**. *Nature* 2009, **461**(7261):282-286.
- 101. Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, White S, Dzutsev A, Hieny S, Kelsall B, Trinchieri G, Sher A: **NK cell-derived interferon-gamma orchestrates cellular dynamics and**

the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity* 2012, **36**(6):1047-1059.

- 102. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C: Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptorinduced actin remodeling. *Science* 2004, **305**(5687):1153-1157.
- 103. Cohen N, Margalit R, Pevsner-Fischer M, Yona S, Jung S, Eisenbach L, Cohen IR: Mouse dendritic cells pulsed with capsular polysaccharide induce resistance to lethal pneumococcal challenge: roles of T cells and B cells. *PloS one* 2012, 7(6):e39193.
- 104. Yago T, Zarnitsyna VI, Klopocki AG, McEver RP, Zhu C: **Transport governs flow**enhanced cell tethering through L-selectin at threshold shear. *Biophysical journal* 2007, **92**(1):330-342.
- 105. Read RA, Moore EE, Moore FA, Carl VS, Banerjee A: **Platelet-activating factorinduced polymorphonuclear neutrophil priming independent of CD11b adhesion**. *Surgery* 1993, **114**(2):308-313.
- 106. Hill ME, Bird IN, Daniels RH, Elmore MA, Finnen MJ: Endothelial cell-associated platelet-activating factor primes neutrophils for enhanced superoxide production and arachidonic acid release during adhesion to but not transmigration across IL-1 beta-treated endothelial monolayers. *J Immunol* 1994, 153(8):3673-3683.
- 107. Chu KK, Kusek ME, Liu L, Som A, Yonker LM, Leung H, Cui D, Ryu J, Eaton AD, Tearney GJ *et al*: **Illuminating dynamic neutrophil trans-epithelial migration with micro-optical coherence tomography**. *Sci Rep* 2017, **8**:45789.
- 108. Sumagin R, Nava P, Nusrat A, Parkos CA: Neutrophil interactions with apical epithelial ICAM-1 contribute to resolution of inflammation by promoting intestinal epithelial wound repair. *The FASEB Journal* 2013, 27(1_supplement):137.139-137.139.
- 109. Martin TR, Pistorese BP, Chi EY, Goodman RB, Matthay MA: Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability. *J Clin Invest* 1989, **84**(5):1609-1619.
- 110. Ginzberg HH, Cherapanov V, Dong Q, Cantin A, McCulloch CA, Shannon PT, Downey GP: **Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase**. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2001, **281**(3):G705-717.
- 111. Ginzberg HH, Shannon PT, Suzuki T, Hong O, Vachon E, Moraes T, Abreu MT, Cherepanov V, Wang X, Chow CW *et al*: Leukocyte elastase induces epithelial apoptosis: role of mitochondial permeability changes and Akt. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2004, **287**(1):G286-298.
- 112. Le'Negrate G, Selva E, Auberger P, Rossi B, Hofman P: Sustained polymorphonuclear leukocyte transmigration induces apoptosis in T84 intestinal epithelial cells. *The Journal of cell biology* 2000, **150**(6):1479-1488.
- 113. Zemans RL, Colgan SP, Downey GP: **Transepithelial migration of neutrophils:** mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009, **40**(5):519-535.
- 114. Cloutier A, Guindi C, Larivée P, Dubois CM, Amrani A, McDonald PP: Inflammatory Cytokine Production by Human Neutrophils Involves C/EBP Transcription Factors. *The Journal of Immunology* 2009, **182**(1):563-571.
- 115. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA: **The neutrophil as a cellular source of chemokines**. *Immunological reviews* 2000, **177**:195-203.
- 116. Serhan CN: **Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways**. *Annual review of immunology* 2007, **25**:101-137.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science 2004, 303(5663):1532-1535.

- 118. Tak T, Tesselaar K, Pillay J, Borghans JA, Koenderman L: **What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited**. *Journal of leukocyte biology* 2013, **94**(4):595-601.
- 119. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L: In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of **5.4** days. *Blood* 2010, **116**(4):625-627.
- 120. Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR: Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, **100**(19):10948-10953.
- 121. Nwakoby IE, Reddy K, Patel P, Shah N, Sharma S, Bhaskaran M, Gibbons N, Kapasi AA, Singhal PC: **Fas-Mediated Apoptosis of Neutrophils in Sera of Patients with Infection**. *Infection and Immunity* 2001, **69**(5):3343-3349.
- 122. Iwaniuk A, Jablonska E, Jablonski J, Ratajczak-Wrona W, Garley M: **Expression of selected proteins of the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in human leukocytes exposed to N-nitrosodimethylamine**. *Human & experimental toxicology* 2015, **34**(6):591-600.
- 123. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989, **83**(3):865-875.
- 124. Bratton DL, Henson PM: **Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins**. *Trends in Immunology* 2011, **32**(8):350-357.
- 125. Mócsai A: Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine* 2013, **210**(7):1283-1299.
- 126. Mauler M, Seyfert J, Haenel D, Seeba H, Guenther J, Stallmann D, Schoenichen C, Hilgendorf I, Bode C, Ahrens I *et al*: **Platelet-neutrophil complex formation-a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples**. *Journal of leukocyte biology* 2016, **99**(5):781-789.
- 127. Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ: Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *British journal of haematology* 1999, **106**(2):391-399.
- 128. Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, Fan S, Nicolai L, Busch B, Yavuz G, Luckner M, Ishikawa-Ankerhold H, Hennel R *et al*: **Migrating Platelets Are Mechano**scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell* 2017, **171**(6):1368-1382.e1323.
- 129. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P: Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 2012, **12**(3):324-333.
- 130. Looney MR, Nguyen JX, Hu Y, Van Ziffle JA, Lowell CA, Matthay MA: Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest* 2009, **119**(11):3450-3461.
- 131. Richardson RM, Pridgen BC, Haribabu B, Ali H, Snyderman R: Differential crossregulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation. *J Biol Chem* 1998, **273**(37):23830-23836.
- 132. Zarbock A, Kempf T, Wollert KC, Vestweber D: Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation. *Journal of Molecular Medicine* 2012, **90**(4):353-359.
- 133. Fernandez EJ, Lolis E: **Structure, function, and inhibition of chemokines**. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2002, **42**:469-499.
- 134. Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, Stafford S, Periselneris J, Aldridge C, Vollmer W *et al*: **TLR-Mediated Inflammatory Responses to Streptococcus pneumoniae Are Highly Dependent on Surface Expression of Bacterial Lipoproteins**. *The Journal of Immunology Author Choice* 2014, **193**(7):3736-3745.

- 135. Wolfmeier H, Radecke J, Schoenauer R, Koeffel R, Babiychuk VS, Drucker P, Hathaway LJ, Mitchell TJ, Zuber B, Draeger A *et al*: Active release of pneumolysin prepores and pores by mammalian cells undergoing a Streptococcus pneumoniae attack. *Biochim Biophys Acta* 2016, **1860**(11 Pt A):2498-2509.
- 136. Martner A, Dahlgren C, Paton JC, Wold AE: **Pneumolysin released during Streptococcus pneumoniae autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils**. *Infect Immun* 2008, **76**(9):4079-4087.
- 137. Johnson MK, Boese-Marrazzo D, Pierce WA, Jr.: Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets. *Infect Immun* 1981, **34**(1):171-176.
- 138. Taylor SD, Sanders ME, Tullos NA, Stray SJ, Norcross EW, McDaniel LS, Marquart ME: The cholesterol-dependent cytolysin pneumolysin from Streptococcus pneumoniae binds to lipid raft microdomains in human corneal epithelial cells. *PloS one* 2013, **8**(4):e61300.
- 139. Rogers PD, Thornton J, Barker KS, McDaniel DO, Sacks GS, Swiatlo E, McDaniel LS: Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 2003, **71**(4):2087-2094.
- 140. Dessing MC, Hirst RA, de Vos AF, van der Poll T: **Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice**. *PloS one* 2009, **4**(11):e7993.
- 141. Chavez-Sanchez L, Garza-Reyes MG, Espinosa-Luna JE, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F: **The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans**. *Human immunology* 2014, **75**(4):322-329.
- 142. Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, Goldstraw P, Young A, Tetley TD: Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PloS one* 2011, **6**(7):e21827.
- 143. Mizgerd JP, Scott ML, Spieker MR, Doerschuk CM: Functions of IkappaB proteins in inflammatory responses to Escherichia coli LPS in mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **27**(5):575-582.
- 144. Quinton LJ, Jones MR, Simms BT, Kogan MS, Robson BE, Skerrett SJ, Mizgerd JP: **Functions and regulation of NF-kappaB RelA during pneumococcal pneumonia**. *J Immunol* 2007, **178**(3):1896-1903.
- 145. Pittet LA, Quinton LJ, Yamamoto K, Robson BE, Ferrari JD, Algul H, Schmid RM, Mizgerd JP: Earliest innate immune responses require macrophage RelA during pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011, **45**(3):573-581.
- 146. Traber KE, Hilliard KL, Allen E, Wasserman GA, Yamamoto K, Jones MR, Mizgerd JP, Quinton LJ: Induction of STAT3-Dependent CXCL5 Expression and Neutrophil Recruitment by Oncostatin-M during Pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol 2015, 53(4):479-488.
- 147. Ku CL, von Bernuth H, Picard C, Zhang SY, Chang HH, Yang K, Chrabieh M, Issekutz AC, Cunningham CK, Gallin J *et al*: Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 2007, 204(10):2407-2422.
- 148. Picard C, Casanova JL, Puel A: Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency. *Clinical microbiology reviews* 2011, **24**(3):490-497.
- 149. Valles PG, Lorenzo AG, Bocanegra V, Valles R: Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play? International journal of nephrology and renovascular disease 2014, 7:241-251.
- 150. Uddin M, Betts C, Robinson I, Malmgren A, Humfrey C: The chemokine CXCR2 antagonist (AZD5069) preserves neutrophil-mediated host immunity in non-human primates. *Haematologica* 2017, **102**(2):e65-e68.
- 151. Eash KJ, Greenbaum AM, Gopalan PK, Link DC: **CXCR2 and CXCR4** antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J Clin Invest* 2010, **120**(7):2423-2431.

- 152. Sabroe I, Jones EC, Whyte MK, Dower SK: **Regulation of human neutrophil** chemokine receptor expression and function by activation of Toll-like receptors 2 and 4. *Immunology* 2005, **115**(1):90-98.
- 153. Jablonska J, Wu ČF, Andzinski L, Leschner S, Weiss S: **CXCR2-mediated tumor**associated neutrophil recruitment is regulated by IFN-beta. *International journal of cancer* 2014, **134**(6):1346-1358.
- 154. Gao Y, Guan Z, Chen J, Xie H, Yang Z, Fan J, Wang X, Li L: CXCL5/CXCR2 axis promotes bladder cancer cell migration and invasion by activating PI3K/AKT-induced upregulation of MMP2/MMP9. International journal of oncology 2015, 47(2):690-700.
- 155. Halpern JL, Kilbarger A, Lynch CC: Mesenchymal stem cells promote mammary cancer cell migration in vitro via the CXCR2 receptor. *Cancer letters* 2011, 308(1):91-99.
- 156. Li A, King J, Moro A, Sugi MD, Dawson DW, Kaplan J, Li G, Lu X, Strieter RM, Burdick M *et al*: **Overexpression of CXCL5 is associated with poor survival in patients with pancreatic cancer**. *The American journal of pathology* 2011, **178**(3):1340-1349.
- 157. Saintigny P, Massarelli E, Lin S, Ahn YH, Chen Y, Goswami S, Erez B, O'Reilly MS, Liu D, Lee JJ *et al*: **CXCR2 expression in tumor cells is a poor prognostic factor and promotes invasion and metastasis in lung adenocarcinoma**. *Cancer research* 2013, **73**(2):571-582.
- 158. Wang LY, Tu YF, Lin YC, Huang CC: **CXCL5 signaling is a shared pathway of neuroinflammation and blood-brain barrier injury contributing to white matter injury in the immature brain**. *Journal of neuroinflammation* 2016, **13**:6.
- 159. Spehlmann ME, Dann SM, Hruz P, Hanson E, McCole DF, Eckmann L: CXCR2dependent mucosal neutrophil influx protects against colitis-associated diarrhea caused by an attaching/effacing lesion-forming bacterial pathogen. *J Immunol* 2009, **183**(5):3332-3343.
- 160. Hosking MP, Liu L, Ransohoff RM, Lane TE: **A protective role for ELR+ chemokines** during acute viral encephalomyelitis. *PLoS pathogens* 2009, **5**(11):e1000648.
- 161. Tsai WC, Strieter RM, Mehrad B, Newstead MW, Zeng X, Standiford TJ: CXC chemokine receptor CXCR2 is essential for protective innate host response in murine Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Infect Immun* 2000, **68**(7):4289-4296.
- 162. Reppe K, Radunzel P, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M: **Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection**. *Infect Immun* 2015, **83**(12):4617-4629.
- 163. Dames C, Akyuz L, Reppe K, Tabeling C, Dietert K, Kershaw O, Gruber AD, Meisel C, Meisel A, Witzenrath M *et al*: Miniaturized bronchoscopy enables unilateral investigation, application, and sampling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, 51(6):730-737.
- 164. Dietert K, Gutbier B, Wienhold SM, Reppe K, Jiang X, Yao L, Chaput C, Naujoks J, Brack M, Kupke A *et al*: **Spectrum of pathogen- and model-specific histopathologies in mouse models of acute pneumonia**. *PloS one* 2017, **12**(11):e0188251.
- 165. Bajrami B, Zhu H, Kwak HJ, Mondal S, Hou Q, Geng G, Karatepe K, Zhang YC, Nombela-Arrieta C, Park SY *et al*: **G-CSF maintains controlled neutrophil mobilization during acute inflammation by negatively regulating CXCR2** signaling. *J Exp Med* 2016, **213**(10):1999-2018.
- 166. Trapnell BC, Whitsett JA: **Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense**. *Annu Rev Physiol* 2002, **64**:775-802.
- 167. Koltsova EK, Ley K: **The mysterious ways of the chemokine CXCL5**. *Immunity* 2010, **33**(1):7-9.
- 168. Boyd JE, Bewman JH, Brigham KL: **Permeability pulmonary edema. Diagnosis and management**. *Archives of internal medicine* 1984, **144**(1):143-147.

- 169. van Der Flier M, Coenjaerts F, Kimpen JL, Hoepelman AM, Geelen SP: **Streptococcus pneumoniae induces secretion of vascular endothelial growth factor by human neutrophils**. *Infect Immun* 2000, **68**(8):4792-4794.
- 170. Yamamoto K, Ahyi AN, Pepper-Cunningham ZA, Ferrari JD, Wilson AA, Jones MR, Quinton LJ, Mizgerd JP: Roles of lung epithelium in neutrophil recruitment during pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014, **50**(2):253-262.
- 171. Mei J, Liu Y, Dai N, Favara M, Greene T, Jeyaseelan S, Poncz M, Lee JS, Worthen GS: CXCL5 regulates chemokine scavenging and pulmonary host defense to bacterial infection. *Immunity* 2010, **33**(1):106-117.
- 172. Song J, Lu H, Zheng X, Huang X: Effects of Vascular Endothelial Growth Factor in Recovery Phase of Acute Lung Injury in Mice. *Lung* 2015, **193**(6):1029-1036.
- 173. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL: **Identification of a key** pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 2007, **13**(7):851-856.
- 174. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P: Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010, **330**(6002):362-366.
- 175. Thorp E, Subramanian M, Tabas I: The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis. *European journal of immunology* 2011, **41**(9):2515-2518.
- 176. Sharafkhaneh A, Hanania NA, Kim V: **Pathogenesis of Emphysema: From the Bench to the Bedside**. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2008, **5**(4):475-477.
- 177. Angus DC, Marrie TJ, Obrosky DS, Clermont G, Dremsizov TT, Coley C, Fine MJ, Singer DE, Kapoor WN: Severe community-acquired pneumonia: use of intensive care services and evaluation of American and British Thoracic Society Diagnostic criteria. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**(5):717-723.
- 178. Rodriguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Sole-Violan J, De Mendoza D, Rello J: Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med* 2009, **35**(3):430-438.
- 179. File TM, Jr.: Optimal treatment strategies for community-acquired pneumonia: non-responders to conventional regimens. *Chemotherapy* 2001, **47** Suppl **4**:11-18; discussion 26-17.
- 180. Pereira JM, Goncalves-Pereira J, Ribeiro O, Baptista JP, Froes F, Paiva JA: **Impact of antibiotic therapy in severe community-acquired pneumonia: Data from the Infauci study**. *Journal of critical care* 2018, **43**:183-189.
- 181. Beura LK, Hamilton SE, Bi K, Schenkel JM, Odumade OA, Casey KA, Thompson EA, Fraser KA, Rosato PC, Filali-Mouhim A *et al*: **Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice**. *Nature* 2016, **532**(7600):512-516.
- 182. Irvin CG, Bates JHT: **Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size**. *Respiratory research* 2003, **4**(1):4-4.
- 183. Waterer GW, Buckingham SC, Kessler LA, Quasney MW, Wunderink RG: Decreasing beta-lactam resistance in Pneumococci from the Memphis region: analysis of 2,152 isolates From 1996 to 2001. *Chest* 2003, 124(2):519-525.
- 184. Llor C, Perez A, Carandell E, Garcia-Sangenis A, Rezola J, Llorente M, Gestoso S, Bobe F, Roman-Rodriguez M, Cots JM *et al*: Efficacy of high doses of penicillin versus amoxicillin in the treatment of uncomplicated community acquired pneumonia in adults. A non-inferiority controlled clinical trial. *Atencion primaria* 2017.
- 185. Lee JH, Kim SW, Kim JH, Ryu YJ, Chang JH: **High-dose levofloxacin in community**acquired pneumonia: a randomized, open-label study. *Clinical drug investigation* 2012, **32**(9):569-576.
- 186. Dunbar LM, Wunderink RG, Habib MP, Smith LG, Tennenberg AM, Khashab MM, Wiesinger BA, Xiang JX, Zadeikis N, Kahn JB: **High-dose, short-course levofloxacin** for community-acquired pneumonia: a new treatment paradigm. *Clinical infectious*

diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2003, **37**(6):752-760.

- 187. Garcia-Vidal C, Fernandez-Sabe N, Carratala J, Diaz V, Verdaguer R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F: **Early mortality in patients with community-acquired pneumonia: causes and risk factors**. *Eur Respir J* 2008, **32**(3):733-739.
- 188. Kumar G, Degheidy H, Casey BJ, Goering PL: Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 2015, **85**:45-51.
- 189. Henkels KM, Frondorf K, Gonzalez-Mejia ME, Doseff AL, Gomez-Cambronero J: IL-8induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). *FEBS letters* 2011, 585(1):159-166.
- 190. Baumgartner D, Aebi S, Grandgirard D, Leib SL, Draeger A, Babiychuk E, Hathaway LJ: Clinical Streptococcus pneumoniae isolates induce differing CXCL8 responses from human nasopharyngeal epithelial cells which are reduced by liposomes. *BMC Microbiology* 2016, **16**:154.
- 191. Spelmink L, Sender V, Hentrich K, Kuri T, Plant L, Henriques-Normark B: Toll-Like Receptor 3/TRIF-Dependent IL-12p70 Secretion Mediated by Streptococcus pneumoniae RNA and Its Priming by Influenza A Virus Coinfection in Human Dendritic Cells. *mBio* 2016, 7(2).
- 192. Sun K, Salmon SL, Lotz SA, Metzger DW: Interleukin-12 promotes gamma interferon-dependent neutrophil recruitment in the lung and improves protection against respiratory Streptococcus pneumoniae infection. *Infect Immun* 2007, **75**(3):1196-1202.
- 193. Price AE, Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM: Marking and quantifying IL-17Aproducing cells in vivo. *PloS one* 2012, **7**(6):e39750.
- 194. Riol-Blanco L, Lazarevic V, Awasthi A, Mitsdoerffer M, Wilson BS, Croxford A, Waisman A, Kuchroo VK, Glimcher LH, Oukka M: **IL-23 receptor regulates unconventional IL-17-producing T cells that control bacterial infections**. *J Immunol* 2010, **184**(4):1710-1720.
- 195. Chen K, Eddens T, Trevejo-Nunez G, Way EE, Elsegeiny W, Ricks DM, Garg AV, Erb CJ, Bo M, Wang T *et al*: **IL-17 Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against K. pneumoniae**. *Cell Host Microbe* 2016, **20**(5):596-605.
- 196. Fujimura M, Yasui M, Nishi K, Nomura M, Shinagawa S, Tagami A, Matsuda T: Comparison of bronchoalveolar lavage cell findings in complete-resolution pneumonia and delayed-resolution pneumonia. *The American journal of the medical sciences* 1999, **317**(4):222-225.
- 197. Majhi A, Kundu K, Adhikary R, Banerjee M, Mahanti S, Basu A, Bishayi B: Combination therapy with ampicillin and azithromycin in an experimental pneumococcal pneumonia is bactericidal and effective in down regulating inflammation in mice. *Journal of Inflammation (London, England)* 2014, **11**:5-5.
- 198. Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, Gutbier B, Opitz B, Neudecker J, Ruckert J: **Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia**. *J Antimicrob Chemother* 2015, **70**.
- 199. Mor F, Cohen IR: Beta-lactam antibiotics modulate T-cell functions and gene expression via covalent binding to cellular albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(8):2981-2986.
- 200. Mir-Kasimov M, Sturrock A, McManus M, Paine R, 3rd: Effect of alveolar epithelial cell plasticity on the regulation of GM-CSF expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012, **302**(6):L504-511.
- 201. Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC: **GM-CSF** regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001, **15**(4):557-567.
- 202. Orman KL, English BK: Effects of antibiotic class on the macrophage inflammatory response to Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis* 2000, **182**(5):1561-1565.

- 203. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A: Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 1994, **62**(7):2715-2721.
- 204. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WE, Groeninx van Zoelen EC, Hoogsteden HC, Hendriks RW, van der Eerden MM: Local and systemic cytokine profiles in nonsevere and severe community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2013, **41**(6):1378-1385.
- 205. Monton C, Torres A, El-Ebiary M, Filella X, Xaubet A, de la Bellacasa JP: Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. *Critical care medicine* 1999, **27**(9):1745-1753.
- 206. Calbo E, Alsina M, Rodriguez-Carballeira M, Lite J, Garau J: **The impact of time on the systemic inflammatory response in pneumococcal pneumonia**. *Eur Respir J* 2010, **35**(3):614-618.
- 207. Endeman H, Meijvis SC, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, van Moorsel CH, Grutters JC, Biesma DH: Systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2011, **37**(6):1431-1438.
- 208. Achouiti A, de Vos AF, de Beer R, Florquin S, van 't Veer C, van der Poll T: Limited Role of the Receptor for Advanced Glycation End Products during *Streptococcus pneumoniae* Bacteremia. *Journal of Innate Immunity* 2013, **5**(6):603-612.
- 209. Gradstedt H, Iovino F, Bijlsma JJE: **Streptococcus pneumoniae Invades Endothelial Host Cells via Multiple Pathways and Is Killed in a Lysosome Dependent Manner**. *PloS one* 2013, **8**(6):e65626.
- 210. Clarke TB, Francella N, Huegel A, Weiser JN: Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* 2011, **9**(5):404-414.
- 211. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M: Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 2005, **73**(8):4653-4667.
- 212. Gutbier B, Jiang X, Dietert K, Ehrler C, Lienau J, Van Slyke P, Kim H, Hoang VC, Maynes JT, Dumont DJ *et al*: Vasculotide reduces pulmonary hyperpermeability in experimental pneumococcal pneumonia. *Critical Care* 2017, **21**(1):274.
- 213. Müller-Redetzky H, Kellermann U, Thomas T, Wienhold S, Marfa P, Katharina H, Vater A, Maasch C, Klussmann S, Menger M *et al*: Neutralizing the complement component C5a protects against lung injury and extrapulmonary organ injury in pneumococcal pneumonia induced sepsis. *European Respiratory Journal* 2014, 44(Suppl 58).
- 214. Gracia M, Martinez-Marin C, Huelves L, Gimenez MJ, Aguilar L, Carcas A, Ponte C, Soriano F: Pulmonary damage and bacterial load in assessment of the efficacy of simulated human treatment-like amoxicillin (2,000 milligrams) therapy of experimental pneumococcal pneumonia caused by strains for which amoxicillin MICs differ. Antimicrobial agents and chemotherapy 2005, 49(3):996-1001.
- 215. Spreer A, Kerstan H, Bottcher T, Gerber J, Siemer A, Zysk G, Mitchell TJ, Eiffert H, Nau R: Reduced release of pneumolysin by Streptococcus pneumoniae in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003, **47**(8):2649-2654.
- 216. Rubins JB, Duane PG, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner DE: **Toxicity** of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 1993, 61(4):1352-1358.
- 217. Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW: A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **166**(2):138-143.
- 218. Paine R, 3rd, Standiford TJ, Dechert RE, Moss M, Martin GS, Rosenberg AL, Thannickal VJ, Burnham EL, Brown MB, Hyzy RC: **A randomized trial of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor for patients with acute lung injury**. *Critical care medicine* 2012, **40**(1):90-97.

- 219. Li LF, Huang CC, Liu YY, Lin HC, Kao KC, Yang CT, Liao SK: **Hydroxyethyl starch** reduces high stretch ventilation-augmented lung injury via vascular endothelial growth factor. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2011, **157**(5):293-305.
- 220. Domigan CK, Warren CM, Antanesian V, Happel K, Ziyad S, Lee S, Krall A, Duan L, Torres-Collado AX, Castellani LW *et al*: Autocrine VEGF maintains endothelial survival through regulation of metabolism and autophagy. *Journal of cell science* 2015, **128**(12):2236-2248.
- 221. Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Yamada W, Shimizu M, Nakamura M, Yonemaru M, Ikeda E, Adachi Y, Fujishima S *et al*: **Protective role of vascular endothelial growth** *factor in endotoxin-induced acute lung injury in mice*. *Respiratory research* 2007, **8**(1):60.
- 222. Kaner RJ, Crystal RG: Compartmentalization of vascular endothelial growth factor to the epithelial surface of the human lung. *Mol Med* 2001, **7**(4):240-246.
- 223. Abadie Y, Bregeon F, Papazian L, Lange F, Chailley-Heu B, Thomas P, Duvaldestin P, Adnot S, Maitre B, Delclaux C: **Decreased VEGF concentration in lung tissue and vascular injury during ARDS**. *Eur Respir J* 2005, **25**(1):139-146.
- 224. Maloney JP, Gao L: Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells. *Mediators of inflammation* 2015, 2015:387842.
- 225. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ: Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996, 271(2):736-741.
- 226. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S: **Regulation** of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995, 270(21):12607-12613.
- 227. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocidalo MA, Hakim J: Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997, **90**(10):4153-4161.
- 228. Petrucci N, De Feo C: Lung protective ventilation strategy for the acute respiratory distress syndrome. The Cochrane database of systematic reviews 2013(2):Cd003844.
- 229. Jeyaseelan S, Manzer R, Young SK, Yamamoto M, Akira S, Mason RJ, Worthen GS: Induction of CXCL5 during inflammation in the rodent lung involves activation of alveolar epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **32**(6):531-539.
- 230. Liu Y, Mei J, Gonzales L, Yang G, Dai N, Wang P, Zhang P, Favara M, Malcolm KC, Guttentag S *et al*: **IL-17A and TNF-alpha exert synergistic effects on expression of CXCL5 by alveolar type II cells in vivo and in vitro**. *J Immunol* 2011, **186**(5):3197-3205.
- 231. Chou RC, Kim ND, Sadik CD, Seung E, Lan Y, Byrne MH, Haribabu B, Iwakura Y, Luster AD: Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis. *Immunity* 2010, **33**(2):266-278.
- 232. Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G: The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of leukocyte biology* 2010, **87**(3):501-508.
- 233. Reutershan J, Morris MA, Burcin TL, Smith DF, Chang D, Saprito MS, Ley K: Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* 2006, **116**(3):695-702.
- 234. Furze RC, Rankin SM: Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 2008, **125**(3):281-288.
- 235. Cai S, Batra S, Lira SA, Kolls JK, Jeyaseelan S: CXCL1 regulates pulmonary host defense to Klebsiella Infection via CXCL2, CXCL5, NF-kappaB, and MAPKs. *J Immunol* 2010, **185**(10):6214-6225.

- 236. Chen SC, Mehrad B, Deng JC, Vassileva G, Manfra DJ, Cook DN, Wiekowski MT, Zlotnik A, Standiford TJ, Lira SA: **Impaired pulmonary host defense in mice lacking** expression of the CXC chemokine lungkine. *J Immunol* 2001, **166**(5):3362-3368.
- 237. Greenberger MJ, Strieter RM, Kunkel SL, Danforth JM, Laichalk LL, McGillicuddy DC, Standiford TJ: Neutralization of macrophage inflammatory protein-2 attenuates neutrophil recruitment and bacterial clearance in murine Klebsiella pneumonia. *J Infect Dis* 1996, **173**(1):159-165.
- 238. Moore TA, Newstead MW, Strieter RM, Mehrad B, Beaman BL, Standiford TJ: Bacterial clearance and survival are dependent on CXC chemokine receptor-2 ligands in a murine model of pulmonary Nocardia asteroides infection. *J Immunol* 2000, **164**(2):908-915.
- 239. Trevejo-Nunez G, Chen K, Dufour JP, Bagby GJ, Horne WT, Nelson S, Kolls JK: Ethanol Impairs Mucosal Immunity against Streptococcus pneumoniae Infection by Disrupting Interleukin 17 Gene Expression. Infection and Immunity 2015, 83(5):2082-2088.
- 240. Chapman RW, Minnicozzi M, Celly CS, Phillips JE, Kung TT, Hipkin RW, Fan X, Rindgen D, Deno G, Bond R *et al*: A novel, orally active CXCR1/2 receptor antagonist, Sch527123, inhibits neutrophil recruitment, mucus production, and goblet cell hyperplasia in animal models of pulmonary inflammation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2007, **322**(2):486-493.
- 241. Buanne P, Di Carlo E, Caputi L, Brandolini L, Mosca M, Cattani F, Pellegrini L, Biordi L, Coletti G, Sorrentino C *et al*: **Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice**. *Journal of leukocyte biology* 2007, **82**(5):1239-1246.
- 242. Herbold W, Maus R, Hahn I, Ding N, Srivastava M, Christman JW, Mack M, Reutershan J, Briles DE, Paton JC *et al*: Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. *Infect Immun* 2010, **78**(6):2620-2630.
- 243. Tateda K, Moore TA, Newstead MW, Tsai WC, Zeng X, Deng JC, Chen G, Reddy R, Yamaguchi K, Standiford TJ: Chemokine-dependent neutrophil recruitment in a murine model of Legionella pneumonia: potential role of neutrophils as immunoregulatory cells. *Infect Immun* 2001, **69**(4):2017-2024.
- 244. Thatcher TH, McHugh NA, Egan RW, Chapman RW, Hey JA, Turner CK, Redonnet MR, Seweryniak KE, Sime PJ, Phipps RP: **Role of CXCR2 in cigarette smokeinduced lung inflammation**. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**(2):L322-328.
- 245. Lionakis MS, Fischer BG, Lim JK, Swamydas M, Wan W, Richard Lee C-C, Cohen JI, Scheinberg P, Gao J-L, Murphy PM: Chemokine Receptor Ccr1 Drives Neutrophil-Mediated Kidney Immunopathology and Mortality in Invasive Candidiasis. *PLoS pathogens* 2012, **8**(8):e1002865.
- 246. Pan ZZ, Parkyn L, Ray A, Ray P: Inducible lung-specific expression of RANTES: preferential recruitment of neutrophils. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, 279(4):L658-666.
- 247. Garvy BA, Harmsen AG: The importance of neutrophils in resistance to pneumococcal pneumonia in adult and neonatal mice. *Inflammation* 1996, **20**(5):499-512.
- 248. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y: **Production of proinflammatory cytokines by resident tissue macrophages after phagocytosis of apoptotic cells**. *Cellular immunology* 2001, **211**(1):1-7.
- 249. Reidy MF, Wright JR: Surfactant protein A enhances apoptotic cell uptake and TGF-beta1 release by inflammatory alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, **285**(4):L854-861.
- 250. Maus UA, Srivastava M, Paton JC, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlöndorff D, Seeger W, Lohmeyer J: **Pneumolysin-Induced Lung Injury Is Independent of Leukocyte Trafficking into the Alveolar Space**. *The Journal of Immunology* 2004, **173**(2):1307-1312.

- 251. Costers S, Lefebvre DJ, Delputte PL, Nauwynck HJ: **Porcine reproductive and** respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Archives of virology* 2008, **153**(8):1453-1465.
- 252. Yuan S, Zhang N, Xu L, Zhou L, Ge X, Guo X, Yang H: Induction of Apoptosis by the Nonstructural Protein 4 and 10 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *PloS one* 2016, **11**(6):e0156518.
- 253. Rodrigues MF, Alves CC, Figueiredo BB, Rezende AB, Wohlres-Viana S, Silva VL, Machado MA, Teixeira HC: Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent Mycobacterium bovis. *Immunology* 2013, **139**(4):503-512.
- 254. Spira A, Carroll JD, Liu G, Aziz Z, Shah V, Kornfeld H, Keane J: **Apoptosis Genes in Human Alveolar Macrophages Infected with Virulent or Attenuated Mycobacterium tuberculosis**. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2003, **29**(5):545-551.
- 255. Ali F, Lee ME, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, Read RC, Dockrell DH: Streptococcus pneumoniae-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fcgamma receptors correlates with intracellular bacterial load. *J Infect Dis* 2003, **188**(8):1119-1131.
- 256. François S, El Benna J, Dang PMC, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo M-A, Elbim C: Inhibition of Neutrophil Apoptosis by TLR Agonists in Whole Blood: Involvement of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt and NF-κB Signaling Pathways, Leading to Increased Levels of McI-1, A1, and Phosphorylated Bad. *The Journal of Immunology* 2005, 174(6):3633-3642.
- 257. Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N *et al*: **Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia**. *Critical care medicine* 2006, **34**(7):1947-1954.
- 258. Jeong D-G, Jeong E-S, Seo J-H, Heo S-H, Choi Y-K: Difference in Resistance to Streptococcus pneumoniae Infection in Mice. *Laboratory Animal Research* 2011, 27(2):91-98.
- 259. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K: Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature* 1993, **365**(6447):654-657.
- 260. Boppana NB, Devarajan A, Gopal K, Barathan M, Bakar SA, Shankar EM, Ebrahim AS, Farooq SM: Blockade of CXCR2 signalling: A potential therapeutic target for preventing neutrophil-mediated inflammatory diseases. *Experimental Biology and Medicine* 2014, **239**(5):509-518.
- 261. Hayashi S, Yatsunami J, Fukuno Y, Kawashima M, Miller EJ: Antileukinate, a hexapeptide inhibitor of CXC-chemokine receptor, suppresses bleomycininduced acute lung injury in mice. *Lung* 2002, **180**(6):339-348.
- 262. Zarbock A, Allegretti M, Ley K: Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice. *Br J Pharmacol* 2008, **155**(3):357-364.
- 263. Wu F, Zhao Y, Jiao T, Shi D, Zhu X, Zhang M, Shi M, Zhou H: **CXCR2 is essential for** cerebral endothelial activation and leukocyte recruitment during neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* 2015, **12**:98.
- 264. Medan D, Wang L, Yang X, Dokka S, Castranova V, Rojanasakul Y: Induction of neutrophil apoptosis and secondary necrosis during endotoxin-induced pulmonary inflammation in mice. *Journal of cellular physiology* 2002, **191**(3):320-326.

9 Anhang

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte	21
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Materialien	22
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Reagenzien	24
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Antikörper	25
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Enzyme	25
Tabelle 6: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Narkotika und Heparin	26
Tabelle 7: Übersicht und Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer	26
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Bakterienstämme	29
Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Zelllinien	29
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Kits	29
Tabelle 11: Übersicht der verwendeten Software	30
Tabelle 12: Versuchsgruppen Pneumokokken-Pneumonie und Ampicillin-Therapie	31
Tabelle 13: Versuchsgruppen Pneumokokken-Pneumonie in Abhändigkeit von CXCL5	32
Tabelle 14: Versuchsgruppen mechanische Beatmung in Abhängigkeit von CXCL5	und
Neutrophilen	32
Tabelle 15: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung infizierter Tiere	34
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten ELISA Kits	40

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mortalität der Pneumonie
Abbildung 2: Mortalität einer nicht antibiotisch behandelten Streptococcus pneumoniae
Pneumonie in Abhängigkeit von Alter und Nachweis der Erreger im Blut
Abbildung 3: Schematischer Aufbau der alveolokapillären Barriere
Abbildung 4: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der alveolären Oberfläche einer
humanen Lunge
Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Entwicklung von Blutzellen aus Stammzellen im
Knochenmark
Abbildung 6: Funktionen der Neutrophilen13
Abbildung 7: Einteilung der Chemokingruppen anhand von Cysteinresten und Disulfidbrücken.
Abbildung 8: Signalkaskade nach <i>toll-like</i> Rezeptor (TLR) Aktivierung
Abbildung 9: Infektion und Therapie mit Ampicilin
Abbildung 10: Gating Strategien zur Untersuchung bronchoalveolären Lavage
Abbildung 11: Späte Antibiotika-Therapie schützt S. pninfizierte Mäuse nicht vor fataler
Pneumonie
Abbildung 12: Die Kinetik der Bakterien-Eliminierung mittels Antibiotika-Therapie ist nicht
abhängig vom Therapiebeginn49
Abbildung 13: Ampicillin hat keinen Einfluss auf Leukozyten-Populationen im Alveolarraum.
51
Abbildung 14: Verminderte Zytokin-Level im Alveolarraum nach antibakterieller Therapie und
histologische Analysen53
Abbildung 15: Regulierte Konzentrationen von Chemokinen und Wachstumsfaktoren im
Alveolarraum nach antibakterieller Therapie55
Abbildung 16: Eine antibakterielle Therapie hat keinen Einfluss auf Leukozyten- und
Thrombozyten-Konzentrationen im Blut, jedoch auf den Hämatokrit57
Abbildung 17: Frühzeitige, jedoch nicht späte antibakterielle Therapie verhindert systemische
Inflammation
Abbildung 18: Frühzeitige, jedoch nicht späte antibakterielle Therapie schützt vor der
Entwicklung von Pleuritis, Steatitis und Leberschädigung61
Abbildung 19: Die frühe antibakterielle Behandlung hat einen therapeutischen Effekt auf die
Ödemausprägung63
Abbildung 20: Nur ein frühzeitiger Therapiestart erhält die Integrität der alveolokapillären
Barriere und reduziert lokale VEGF-Level65
Abbildung 21: Sekretion von CXCL1, CXCL2 und CXCL5 nach S. pnInfektion in vivo67

Abbildung 22: Sekretion der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CXCL5 nach S. pnInfektion in
<i>vitro</i>
Abbildung 23: Die epitheliale Sekretion von CXCL1 und CXCL5 geschieht in Abhängigkeit vom
<i>toll-like</i> Rezeptor 2 (TLR2)69
Abbildung 24: Verminderte Neutrophile-Rekrutierung in den Alveolarraum S. pninfizierter
Mäuse in Abwesenheit von CXCL570
Abbildung 25: Eine erhöhte bakterielle Last in Alveolarraum und Lunge hat keinen nachteiligen
Effekt auf die Mortalität S. pninfizierter Mäuse71
Abbildung 26: In S. pninfizierten Tieren sind alveoläre Makrophagen, aber nicht
inflammatorische Monozyten / Makrophagen oder dendritische Zellen, durch eine Cxcl5
Deletion beeinflusst72
Abbildung 27: Inflammatorische Mediatoren in einer S. pnInfektion werden durch eine Cxcl5
Deletion nicht beeinflusst73
Abbildung 28: Histopathologische Analysen zeigen keine Unterschiede bei der Entwicklung
einer entzündlichen Pneumonie zwischen WT und <i>Cxcl5^{-/-}</i> auf
Abbildung 29: Die Abwesenheit von CXCL5 schützt vor Barriereschädigung nach S. pn
Infektion76
Abbildung 30: Induktion der Ausschüttung von CXCL1 und CXCL5 nach hochvolumiger
mechanischer Beatmung <i>in vivo</i> 77
Abbildung 31: Mechanische Dehnung von Epithelzellen induziert die Ausschüttung von
CXCL1, CXCL5 und VEGF78
Abbildung 32: Induktion der Neutrophile-Rekrutierung in den Alveolarraum durch mechanische
Beatmung79
Abbildung 33: CXCL5 beeinflusst neben der PMN-Rekrutierung keine weiteren Immunzellen
im Alveolarraum nach mechanischer Beatmung80
Abbildung 34: Die Lungenfunktion ist in Abwesenheit von CXCL5 nach mechanischer
Beatmung verbessert
Abbildung 35: Histopathologische Auswertung der ventilierten WT und <i>Cxcl5^{-/-}</i> Tiere84
Abbildung 36: Bei einer mechanische Beatmung schützt die Abwesenheit von CXCL5 vor einer
Schädigung der alveolokapilläre Barriere

9.3 Publikationen

In der vorliegenden Arbeit enthaltene Daten wurden publiziert:

<u>Berger S</u>, Gökeri C, Gupta SK, Vera J, Dietert K, Behrendt U, Lienau J, Wienhold SM, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M, Nouailles G. **Delay in Antibiotic Therapy Results in Fatal Disease Outcome in Murine Pneumococcal Pneumonia.** *Crit Care*. 2018, **22**(1):287.

Dietert K, Nouailles G, Gutbier B, Reppe K, <u>Berger S</u>, Jiang X, Schauer AE, Hoche AC, Herold S, Slevogt H, Witzenrath M, Suttorp N, Gruber AD. **Digital Image Analyses on Whole Lung Slides in Mouse Models of Acute Pneumonia.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2018, **58**(4):440-448.

Konferenzbeiträge:

Poster: 2nd International Conference "Innate immunity of the lung – Improving pneumonia outcome".15. – 17.09.2016, Berlin. <u>Berger S</u>, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Nouailles G, Witzenrath G: *In vivo* Analysis of Murine Pneumococcal Pneumonia for Mathematical Modelling of Community Acquired Pneumonia.

Poster und Vortrag: Herbsttreffen der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose der DGP. 11. – 12.11.2016, Hannover. <u>Berger S</u>, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Nouailles G, Witzenrath G: *In vivo* Analysis of Murine Pneumococcal Pneumonia for Mathematical Modelling of Community Acquired Pneumonia.

Poster: 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). 22. – 25.03.2017, Stuttgart. <u>Berger S</u>, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Nouailles G, Witzenrath G: *In vivo* Analysis of Murine Pneumococcal Pneumonia for Mathematical Modelling of Community Acquired Pneumonia.

Poster: 58. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). 22. – 25.03.2017, Stuttgart. <u>Berger S</u>, Wienhold SM, Gökeri C, Behrendt U, Fatykhova D, Zscheppang K, Berg J, Gisch N, Dietert K, Doehn JM, Hocke AC, Witzenrath M, Nouailles G: **Spatial and temporal regulation of neutrophil-attractant CXCL5/LIX in acute streptococcal pneumonia.**

Poster: Gemeinsame Jahrestagung DGI und des DZIF 2017. 28. – 30.09.2017, Hamburg. Berger S, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Witzenrath M, Nouailles G: **Delay in**

Adequate Antibiotic Therapy Results in Fatal Disease Outcome in a Mouse Model of CAP.

Poster: Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 10. – 11.11.2017, Gießen. <u>Berger S</u>, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Witzenrath M, Nouailles G: **Delay in Adequate Antibiotic Therapy Results in Fatal Disease Outcome in a Mouse Model of CAP.**

Poster: Herbsttagung der Sektionen Zellbiologie und Infektiologie und Tuberkulose der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 10. – 11.11.2017, Gießen. <u>Berger S</u>, Wienhold SM, Gökeri C, Behrendt U, Müller-Redetzky H, Dietert K, Gruber AD, Witzenrath M, Nouailles G: **Role of neutrophil-attractant CXCL5/LIX in barrier damage in ventilator-induced lung injury and pneumococcal pneumonia.**

Poster: 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DGP). 14. – 17.03.2018, Dresden. <u>Berger S</u>, Gökeri C, Behrendt U, Lienau J, Suttorp N, Witzenrath M, Nouailles G: **Delay in Adequate Antibiotic Therapy Results in Fatal Disease Outcome in a Mouse Model of CAP.**

9.4 Danksagung

Ich möchte allen Personen danken, die mich in den letzten Jahren dabei unterstützt haben, das Projekt "Doktorarbeit" zu meistern. Einzelnen und sehr wichtigen Wegbegleitern soll an dieser Stelle separat gedankt werden:

Dr. Geraldine Nouailles-Kursar, der besten Betreuerin, die ich mir vorstellen kann. Neben der Übermittlung eines großen Anteils ihres umfangreichen immunologischen Wissensschatzes hat sie vor allem einen unglaublichen Beitrag dabei geleistet, kritisches Denken und wissenschaftliche Eigenständigkeit zu fördern. Sie hat es geschafft, gleichzeitig meine Selbstständigkeit zu unterstützen wie auch Rückhalt zu geben. Durch einfaches Zuhören oder strukturiertes Angehen von Problemen war sie stets eine riesige Stütze und ein großes Vorbild.

Prof. Dr. Martin Witzenrath, der mich mit großer Herzlichkeit in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat, mir einen umfangreichen Einblick in die Medizin ermöglichte und der trotz seiner knapp bemessenen Zeit immer Wege fand, auftretende Anliegen zu besprechen.

Prof. Dr. Roland Lauster und Prof. Dr. Bastian Opitz, welche mir als Gutachter dieser Dissertation eine unkomplizierte und reibungsfreie Promotion an der TU Berlin ermöglichten. Prof. Dr. Jens Kurreck möchte ich dafür danken, dass er die Leitung der Prüfungskommission übernommen hat.

Allen Mitgliedern der AG Witzenrath. Die unglaublich hilfsbereite, freundliche und kollegiale Atmosphäre hat einen Großteil dazu beigetragen, dass ich jeden Tag gerne zur Arbeit gekommen bin, unglaublich viel gelernt habe und daran auch große Freunde hatte. Besonders möchte ich Ulrike und Cengiz danken: Ulrike war die größte Hilfe der Welt. Die letzten Monate wären so ohne sie nicht möglich gewesen. Cengiz, I can't imagine how night preps would have been without his help and friendship! Jasmin danke ich fürs Korrektur lesen, das war eine riesige Hilfe. Sandra, die fachlich wie auch privat immer für mich da war. Danke!

Dr. Kristina Dietert aus der AG Gruber, die die histopathologischen Auswertungen durchgeführt und mir darüber hinaus immer ihr großes Fachwissen zur Verfügung gestellt hat.

Meiner Familie und Roberto. Vor allem meiner Mama möchte ich danken, bei ihr konnte ich immer darauf vertrauen, ein offenes Ohr für alle Sorgen zu finden. Meinen Schwestern Conny und Claudia, die es für mich sogar mit dieser Arbeit aufgenommen haben. Ein riesiges Dankeschön auch an Roberto, der war immer für mich da und mich unterstützt hat, wo er nur konnte. Du bist der Beste.