

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

DISSERTATION

**Die Rolle der Lymphozyten im Rahmen der primären
Abwehrreaktion bei der Pneumokokkenpneumonie**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Wricke

aus Belzig

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr.med. M. Witzernath
 2. Prof. Dr. med. T. Tschernig
 3. Prof. Dr. rer. nat. S. Hammerschmidt

Datum der Promotion: 01.02.2013

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1 EINLEITUNG	8
1.1 DIE AMBULANT ERWORBENE PNEUMONIE.....	8
1.2 WISSENSCHAFTLICHER HINTERGUND.....	9
1.2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> und Virulenzfaktoren.....	9
1.2.2 Die pulmonale Abwehr.....	10
1.2.3 Die Natürlichen Killerzellen.....	12
1.2.4 NKT- Zellen.....	14
1.3 MAUS- PNEUMOKOKKEN- PNEUMONIEMODELL.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 VERSUCHSTIERE.....	17
2.2 BAKTERIEN UND BAKTERIENKULTUR.....	17
2.3 INFektion UND PRÄPARATION.....	18
2.4 BLUTGASANALYSE UND BLUTDRUCKMESSUNG.....	19
2.5 LUNGENFUNKTIONSANALYSE.....	19
2.6 ISOLATION DER LEUKOZYTEN AUS LUNGE, LEBER UND MILZ.....	19
2.7 ANALYSE VON BLUTBILD UND DIFFERENTIALBLUTBILD.....	20
2.8 BESTIMMUNG DER ERREGERLAST IN BLUT, LUNGE, MILZ UND LEBER.....	21
2.9 DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	21
2.9.1 <i>Oberflächenfärbung</i>	21
2.9.2 <i>Intrazellulärfärbung</i>	21
2.9.3 <i>Durchflusszytometrische Analyse</i>	22
2.10 RNA ISOLATION AUS LUNGENGeweBE UND RT-PCR FÜR DIE CHEMOKINE MIP1 α , MCP1, IP10 UND MIG.....	23
2.11 QUANTIFIZIERUNG DER ZYTOKINPRODUKTION.....	24
2.12 DEPLETION DER NK- ZELLEN MIT ASIALO GM1 UND NK1.1.....	24
2.13 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	25
3 ERGEBNISSE	26
3.1 DIE PNEUMOKOKKENPNEUMONIE IN DER MAUS.....	26
3.2 DIE LEUKOZYTENSUBPOPULATIONEN IN DER LUNGE.....	32
3.3 LEUKOZYTENSUBPOPULATIONEN IN DEN EXTRAPULMONALEN KOMPARTIMENTEN BLUT, LEBER UND MILZ.....	34
3.4 AKTIVIERUNGSSTATUS DER LYMPHOZYTENPOPULATIONEN IM VERLAUF DER PNEUMOKOKKENPNEUMONIE.....	38
3.5 BEDEUTUNG DER NK- UND NKT- ZELLEN FÜR DEN VERLAUF DER INFektion.....	41

4	DISKUSSION	45
4.1	PNEUMOKOKKENPNEUMONIE DER MAUS	45
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER LEUKOZYTENKINETIK UND -AKTIVIERUNG BEI DER PNEUMOKOKKENPNEUMONIE.....	47
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER INFLAMMATORISCHEN REAKTION DER NK- UND NKT- ZELLEN IM VERLAUF DER PNEUMOKOKKENINFEKTION.....	49
4.4	FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER NK- UND NKT- ZELLEN IM VERLAUF DER PNEUMOKOKKEN- INFEKTION.....	50
4.5	DIE FUNKTION DER T- LYMPHOZYTEN BEI DER UNSPEZIFISCHEN IMMUNABWEHR	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	55
6	LITERATURVERZEICHNIS	57
7	ANHANG	66
7.1	DANKSAGUNG	66
7.2	EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	67
7.3	LEBENS LAUF	68

Abkürzungsverzeichnis

ALI	acute lung injury
APC	Allophycocyanin
ARDS	acute respiratory distress syndrome
Asialo-GM1	Asialo Ganglio-N-Tetrasylyceramid
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CAP	Community- acquired Pneumonia
CD	Cluster of differentiation
CFU	colony-forming units
FACS	luorescence activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP10	IFN-inducible protein 10
IVC	individuell belüftete Käfige
KO	Knock out
LD	Letalitätsdosis
MCP	monocyte chemoattractant protein
MHC	major histocompatibility complex
MIG	monokine induced by IFN γ
MIP	macrophage inflammatory protein
NKT-Zellen	Natürliche Killer- T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PerCp	peridinin chlorophyll protein
PMN	polymorphonuclear
RANTES	regulation upon activation normal T expressed and secreted
RNA	Ribonucleinsäure
sCAP	severe community acquired pneumonia
SCID	severe combined Immunodeficiency

TCR	T-cell-receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP, community- acquired pneumonia) stellt die häufigste Infektionskrankheit in der westlichen Welt dar [1]. Allein in Deutschland erkranken jährlich schätzungsweise 800.000 Menschen [2]. Die Inzidenz der CAP wird auf 1-11 pro 1000 Einwohner pro Jahr geschätzt. Bei den über 65-jährigen, die in Pflegeheimen leben, geht man sogar von einer Inzidenz von 68-114 pro 1000 Einwohner pro Jahr aus. [CAPNETZ] Prädisponierende Faktoren sind ferner chronisch obstruktive Lungenerkrankungen, Rauchen, sowie vorbestehende extrapulmonale chronische Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, chronische Leber- und Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus [3, 4]. Die wichtigsten Erreger einer ambulant erworbenen Pneumonie sind *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mykoplasma pneumoniae*, Legionellen und Viren [5]. *Streptococcus pneumoniae*, auch Pneumokokken genannt, verursachen ca. 40-50% der ambulant erworbenen Pneumonien und sind somit der häufigste Erreger der CAP [6]. Die Sterblichkeit der CAP liegt bei 6-8% und stellt somit die sechsthäufigste Todesursache in Deutschland dar [2]. Insbesondere kleine Kinder und ältere Menschen, chronisch Kranke und immundefiziente Patienten sind gefährdet eine schwere Pneumonie zu entwickeln [7], die assoziiert ist mit Komplikationen wie Sepsis und respiratorischer Insuffizienz und somit verbunden mit einer hohen Mortalität [5,8]. Insbesondere die schwere CAP (sCAP) wird am häufigsten von *S. pneumoniae* verursacht [9].

Trotz der Verfügbarkeit von Antibiotika und der verbesserten intensivmedizinischen Betreuung konnte in den letzten Jahrzehnten die Letalität in der Frühphase der Pneumokokkenpneumonie nicht wesentlich gesenkt werden. Außerdem zeigen sich auch zunehmende Erregerresistenzen gegen verfügbare Antibiotika [6]. Andererseits ist auf Grund der veränderten Bevölkerungsdemographie mit Steigerung der Lebenserwartung und durch die verbesserte Therapie chronischer Erkrankungen zukünftig mit steigenden Inzidenzraten zu rechnen [10].

Obwohl die Pneumokokkenpneumonie mit einer hohen Inzidenz und Mortalität assoziiert ist, sind die pathophysiologischen Mechanismen und die Immunreaktion des Wirtes noch nicht vollständig verstanden. Umso wichtiger ist es, die Erreger-Wirt-

Interaktion und die durch sie hervorgerufene Abwehrreaktion für den Krankheitsprozess der Pneumokokkenpneumonie zu verstehen. Durch die Erforschung der pulmonalen Abwehrreaktion können sich neue Perspektiven in der Behandlung von Pneumonien ergeben.

1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund

1.2.1 *Streptococcus pneumoniae* und Virulenzfaktoren

Streptococcus pneumoniae, der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, ist ein grampositives typischerweise als Diplococcus vorliegendes Bakterium. Die pathogenen Stämme sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben. Auf Grund des unterschiedlichen Aufbaus der Kapsel lassen sich mehr als 90 verschiedene Serotypen unterscheiden, wobei sich diese erheblich in ihrer Virulenz unterscheiden. 23 dieser Serotypen verursachen ca. 90% der Pneumokokkenpneumonien. Diese Selektivität ist bedingt durch die unterschiedliche Fähigkeit der einzelnen Serotypen, den Wirt zu besiedeln und zu infizieren [11]. Insbesondere der Serotyp 3, der in dieser Arbeit verwendet wurde, zeichnet sich durch eine hohe Virulenz aus und ist für besonders invasive Verläufe der Pneumokokkenpneumonie bekannt [12,13,14].

Die Polysaccharidkapsel stellt den wichtigsten Virulenzfaktor dar. Die Kapsel schützt vor Phagozytose [13] und verhindert eine Opsonierung und somit Aktivierung der alternativen Komplementkaskade [15].

Einen weiteren Virulenzfaktor stellt die Zellwand mit den zellwandassoziierten Oberflächenproteinen (Teichonsäure, Phosphorylcholin, Peptidoglykan) dar. Die Komponenten der Zellwand induzieren eine inflammatorische Reaktion mit Granulozyteninflux, sowie eine Induktion der Zytokinproduktion und Aktivierung der Komplementkaskade [10, 13]. Zusätzlich produzieren Pneumokokken zahlreiche weitere Proteine, wie beispielsweise das intrazelluläre Pneumolysin und Pneumococcal surface protein A (PspA) als Pathogenitätsfaktoren. Pneumolysin, der am besten untersuchte Virulenzfaktor, ist ein intrazelluläres Toxin, welches nach Freisetzung die Bildung von Poren in Zellmembranen anderer Zellen verursacht. Zudem kann Pneumolysin die zytolytische Aktivität anderer Zellen hemmen. Ebenso inhibiert Pneumolysin die Zilienaktivität und die Funktion der neutrophilen Granulozyten und induziert die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen [13, 10, 16].

S. pneumoniae, der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, kolonisiert den Oropharynxbereich auch bei gesunden Erwachsenen. Eine Ausbreitung der Bakterien in den unteren Respirationstrakt wird durch eine Schwächung der systemischen und lokalen Abwehrmechanismen wie Hustenreflex, Mukusproduktion und Zilientätigkeit begünstigt. Ebenso ist die bakterielle Ausbreitung von der Virulenz des Erregers (Serotyp) abhängig.

Sobald sich die Bakterien im unteren Respirationstrakt befinden, sind diese in der Lage eine Reihe von inflammatorischen Reaktionen im Wirt auszulösen, wie Zytokinproduktion und Komplementaktivierung, was mit einem vermehrten Influx der Granulozyten einhergeht. Jedoch verhindert die Kapsel der Pneumokokken eine Phagozytose durch die Granulozyten/ Makrophagen und es kommt zu einer Vermehrung der Bakterien. Durch die ausgelöste Entzündungsreaktion und durch die Freisetzung von Pneumolysin kommt es zu einer Schädigung des Lungengewebes [13, 10, 17].

1.2.2 Die pulmonale Abwehr

Die Lunge stellt die größte epitheliale Oberfläche in unserem Körper dar und ist im ständigen Kontakt mit einer großen Vielfalt von Mikroorganismen. Wenn die mechanischen Abwehrmechanismen wie Hustenreflex, Mukusproduktion und mukoziliäre Clearance den invadierenden Erreger nicht eliminieren können, muss unser Immunsystem aktiv werden [18].

Das Immunsystem lässt sich in eine unspezifische, angeborene und eine spezifische, erworbene Abwehr unterteilen. Die angeborene, unspezifische Immunabwehr, die sogenannte „innate immunity“, ist primär verantwortlich für eine möglichst schnelle Eliminierung der bakteriellen Erreger. In der Lunge geschieht dies zunächst mittels Phagozytose durch die ortständigen Alveolarmakrophagen. Diese Makrophagen können durch die Bildung einer Vielfalt von Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin (IL-) 1β und IL- 6, sowie Chemokinen neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blut in die Lunge rekrutieren und diese aktivieren [20,18,21].

Neben den Phagozyten stellen auch die NK- (natürliche Killerzellen), NKT- Zellen und $\gamma\delta$ T- Lymphozyten ein weiteres, wichtiges Element der unspezifischen Abwehr dar. Insbesondere ist im Zusammenhang mit Infektionen durch Viren und intrazelluläre Bakterien bekannt, dass diese Zellen durch Produktion von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen entscheidend zur Induktion der zellvermittelten

Immunität und zur Entwicklung von T_H1 - und T_H2 - Antworten der spezifischen Immunität beitragen [22, 23, 24, 25]. Sie stellen somit ein wichtiges Bindeglied zwischen der unspezifischen und der spezifischen Abwehr dar.

Die spezifische, erworbene Immunantwort, auch als „adaptive immunity“ bezeichnet, wird durch die B- und T- Lymphozyten vermittelt. Es dauert jedoch einige Tage, bis durch klonale Expansion und Differenzierung aus naiven Lymphozyten Effektorzellen werden und eine effektive Antikörperproduktion entsteht. Verantwortlich für die Antikörperproduktion sind die B- Lymphozyten [29].

Die T- Lymphozyten teilen sich auf in die zytokinproduzierenden $CD4^+$ -T- Helferzell-Lymphozyten und die $CD8^+$ - T- Lymphozyten, welche hauptsächlich zytotoxische Funktionen haben. Bei den $CD4^+$ - T- Lymphozyten unterscheidet man noch zwei weitere große Gruppen. Die T_H1 - Effektorzellen, welche IL-2, Interferon- γ ($IFN\gamma$) und $TNF\alpha$ sezernieren und dadurch die zellvermittelte Immunität durch Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen Lymphozyten induzieren. Die zweite Gruppe sind die T_H2 - Effektorzellen, die durch Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 die Bildung der Antikörperproduktion unterstützen. Durch die Produktion von IL-4 und IL-10 übernehmen die T_H2 - Zellen zusätzlich eine immunregulatorische Funktion, indem sie die proinflammatorische Funktion der T_H1 - Zellen limitieren [28, 27, 29].

Die Lymphozyten haben aber nicht nur bei der spezifischen Abwehr eine Bedeutung, sondern scheinen auch an der frühen, unspezifischen Immunabwehr von bakteriellen Infektionen beteiligt zu sein. Jedoch ist diese Funktion noch weitgehend ungeklärt. Kadioglu et al. konnten beobachten, dass es bei der Pneumokokkeninfektion zu einer frühen Akkumulation von Lymphozyten in der Lunge im Bereich der Infiltrate kommt [31]. Ein weiterer Hinweis für eine funktionelle Bedeutung von Lymphozyten im Rahmen der innate immunity ist die erhöhte Empfindlichkeit von HIV- Patienten und splenektomierten Patienten gegenüber einer Pneumokokkeninfektion [7,30].

Insbesondere für die Lymphozytensubpopulationen der NK- und NKT- Zellen konnte gezeigt werden, dass sie bei der unspezifischen Abwehr von Bakterien vermutlich eine entscheidende Rolle spielen, die bisher nur unzureichend charakterisiert ist.

Hocke et al. konnten zeigen, dass es im Verlauf einer Pneumokokken- Pneumonie zu einer vermehrten Expression von IL-15 in der Lunge kommt [32]. IL-15 wird von aktivierten Monozyten/ Makrophagen und Epithelzellen gebildet und ist verantwortlich für die Reifung und Proliferation der NK-und NKT- Zellen [33, 26]. Außerdem ist IL-15

mitverantwortlich für die Induktion der Zytotoxizität und der Produktion von IFN- γ , TNF- α und GM-CSF, sowie von MIP-1 α [34,35,36,37]. Die vermehrte Expression von IL-15 lässt eine mögliche Funktion der NK- und NKT- Zellen im Rahmen der pulmonalen Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae* vermuten.

1.2.3 Die Natürlichen Killerzellen

Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr und stellen eine wichtige Komponente in der Abwehr von Infektionen, aber auch in der Bekämpfung von Tumorzellen dar [22]. Die NK- Zellen wurden in den 1970er Jahren als dritte eigenständige Lymphozytenpopulation neben B- und T-Zellen erkannt [38] Sie exprimieren weder B- noch T- Zellmarker. Stattdessen findet man auf der Oberfläche humaner NK- Zellen CD56, während murine NK- Zellen Dx5 und NK1.1 exprimieren [24].

Beim Menschen machen die NK- Zellen ca. 10-15% der peripher zirkulierenden Lymphozyten aus. Neben dem Vorkommen der NK- Zellen in der Blutzirkulation findet man diese auch in verschiedenen Geweben wie Knochenmark, Milz, Leber, Lunge, Darm und Plazenta [22].

Die NK- Zellen wurden von Kiesling et al. als natürliche Killerzellen bezeichnet, weil sie im Gegensatz zu den zytotoxischen Lymphozyten in der Lage sind, auch ohne vorausgegangene Aktivierung durch Antigenpräsentation Zellen zu lysieren [39]. Die Zytotoxizität der NK- Zellen wird zum einen vermittelt durch die Produktion von Perforin und GranzymeA und zum anderen über apoptoseinduzierende Rezeptoren, wie Fas-Rezeptor CD95 [40,41,42]. Des Weiteren können NK- Zellen durch das Binden an den Fc γ - Rezeptor- Komplex opsonierte Zellen lysieren [43].

Ogleich sie auf Grund ihrer zytolytischen Aktivität entdeckt und definiert wurden, ist die Produktion von Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF eine weitere sehr wichtige Funktion der NK- Zellen [22].

Es konnte gezeigt werden, dass die NK- Zellen im Rahmen von Infektionen mit *Legionella pneumophila* [44] und Listerien [45] wichtige Produzenten von IFN- γ sind. IFN- γ führt zur Aktivierung von Makrophagen und trägt somit entscheidend zur bakteriellen Clearance bei [44,46]. Es ist aber auch mit verantwortlich für die Induktion der T_H1- Antwort. Rubins et al. konnten zeigen, dass das Fehlen von IFN- γ bei einer pulmonalen Infektion der Maus mit *S. pneumoniae* mit einer höheren Mortalität

einhergeht [47]. Andererseits ist bekannt, dass IFN- γ bei systemischen Infektionen mit *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* auf den Verlauf einen nachteiligen Einfluss hat [48, 50, 51].

TNF- α , ein ebenfalls von den NK- Zellen produziertes Zytokin, induziert die weitere Produktion anderer inflammatorischer Mediatoren wie z.B. Chemokinen. Es ist somit auch für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten verantwortlich und verbessert somit ebenfalls die bakterielle Clearance [52, 53,21].

GM-CSF wird ebenfalls von NK- Zellen produziert und führt zu einer direkten Aktivierung von Leukozyten am Ort der Infektion und zu einer Aktivierung von Vorläuferzellen. [94]

NK-Zellen produzieren ferner auch selbst Chemokine, vor allem MIP-1 α , MIP-1 β (macrophage inflammatory protein), Mig (monokine induced by IFN γ) und RANTES (Regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted). Diese Chemokine führen zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Entzündungszellen, die zur Abwehr der Infektion beitragen [22, 38].

Zudem ist bekannt, dass insbesondere bei systemischen Infektion mit *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* und *Yersinia pestis* die NK- Zellen auch vermehrt IL-10 produzieren und somit offenbar auch eine immunregulatorische Funktion haben [19].

Aus vielen früheren Arbeiten ist bekannt, dass NK- Zellen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Infektionen mit Viren [22] und intrazellulären Bakterien [54, 55] spielen. Bezüglich des Einflusses der NK- Zellen auf den Verlauf von bakteriellen Infektionen durch extrazelluläre Erreger gibt es jedoch nur wenige, differierende Ergebnisse. Bei einer Infektion mit *Bordetella pertussis* verursachte die Depletion der NK- Zellen eine disseminiert-verlaufende, letale Infektion [56]. Im Verlauf einer septischen Peritonitis dagegen führte die Depletion der NK- Zellen zu einer deutlich reduzierten Zytokinproduktion und gleichzeitig zu einer geringeren Letalität [57, 58]. Über die Funktion der NK-Zellen bei der Abwehr von *Streptococcus pneumoniae* ist sehr wenig bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Zytokine, die unter anderem auch von den NK- Zellen produziert werden, einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie haben [47, 52].

1.2.4 NKT- Zellen

Die NKT- Zellen, eine weitere Subpopulation der Lymphozyten, exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl NK- Zellmarker als auch den T-Zellrezeptor (TCR)/CD3- Komplex [59, 60].

Bei den NKT- Zellen werden zwei Subpopulationen unterschieden, die sogenannten invarianten NKT-Zellen, zu denen ein Großteil der NKT-Zellen gehört und die varianten NKT-Zellen. Der T-Zell-Rezeptor der invarianten NKT-Zellen verfügt über eine invariante $V\alpha$ - Kette bestehend aus $V\alpha 14$ und $J\alpha 281$ Gensegmenten und eine β -Kette (meist $V\beta 8.2$). Die weitaus kleinere Subpopulation der varianten NKT-Zellen verfügt über eine Variabilität im TCR-Komplex. Beide Subpopulationen können sehr schnell über die nicht- polymorphen MHC-Klasse-I (CD1d)-Moleküle auf Makrophagen und dendritischen Zellen aktiviert werden. Die T- Lymphozyten können im Gegensatz dazu nur Peptide erkennen, die von klassischen MHC-I oder MHC-II präsentiert werden [59, 60, 61, 62, 63, 23].

Die NKT- Zellen kommen in größerer Anzahl in der Leber, im Thymus und im Knochenmark und in kleinerer Anzahl in Milz und Lunge vor. Sie machen ca. 4% der zirkulierenden Lymphozyten beim Menschen aus [60].

Ähnlich wie die NK- Zellen können die NKT- Zellen nach Aktivierung sehr schnell größere Mengen an Zytokinen sezernieren, insbesondere $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und IL-4. Sie nehmen dadurch Einfluss auf die Differenzierung sowohl der T_H1 - als auch der T_H2 - Antwort [60,62]. Neben der Zytokinproduktion haben die NKT- Zellen ähnlich wie die NK- Zellen auch zytotoxische Funktionen [59].

Aufgrund der Fähigkeit der NKT- Zellen sowohl die T_H1 - als auch die T_H2 - Antwort zu induzieren, haben sie eine wichtige immunregulatorische Funktion.

Hinsichtlich des Einflusses der NKT- Zellen bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen existieren bereits verschiedene Arbeiten mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Zum einen führte die Depletion der NKT- Zellen bei der Tuberkulose [64] und bei der Infektion mit *Salmonella choleraesuis* [65] zu keiner wesentlichen Veränderung im Verlauf der Infektion. Zum anderen konnte bei der Infektion mit *Listeria monocytogenes* [66] gezeigt werden, dass durch Suppression der NKT- Zellen der Verlauf günstig beeinflusst werden kann. Des Weiteren zeigten einige Arbeiten auch, dass in Abwesenheit von NKT- Zellen Mäuse anfälliger für Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* [67] sind. Die funktionelle Bedeutung der NKT- Zellen im Rahmen der innate

immunity gegenüber bakteriellen Erregern könnte somit von der Art des Mikroorganismus abhängig sein. Die Bedeutung der NKT-Zellen im Rahmen einer Pneumokokkeninfektion ist unklar.

1.3 Maus- Pneumokokken- Pneumoniemodell

Die unspezifische, pulmonale Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae*, dem häufigsten Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, ist charakterisiert durch eine starke inflammatorische Reaktion, anfänglich ausgelöst durch residente Alveolarmakrophagen, gefolgt von einer massiven Infiltration neutrophiler Granulozyten in die infizierte Lunge [69]. Jedoch ist nur sehr wenig über die funktionelle Bedeutung der Lymphozyten, insbesondere der NK- und NKT- Zellen, im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr gegenüber *Streptococcus pneumoniae* bekannt.

Eine wichtige Funktion der NK- und NKT-Zellen stellt die Bildung von zentralen inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α bei der Pneumokokkenpneumonie dar [47, 52]. Ebenso konnten Hocke et al. zeigen, dass die pulmonale Expression von IL-15 im Verlauf einer Pneumokokken- Pneumonie gesteigert wird [32]. IL-15 wird von aktivierten Monozyten/ Makrophagen und Epithelzellen gebildet und ist verantwortlich für die Reifung und Proliferation der NK- und NKT- Zellen [33, 26]. Daher wird eine mögliche Funktion der NK- und NKT- Zellen im Rahmen der angeborenen pulmonalen Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae* vermutet

Um die Rolle der Lymphozyten, insbesondere der NK- und NKT-Zellen zu analysieren, musste zunächst ein Maus- Pneumokokken- Pneumoniemodell etabliert werden. Dieses Modell sollte den Verlauf einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie (sCAP) mit respiratorischer Insuffizienz und nachfolgender Bakteriämie und Sepsis imitieren, um so die Rolle der Lymphozyten bei der innate immunity zu untersuchen. Zur Etablierung dieses Modells mussten wir zunächst einen *S. pneumoniae*- Stamm sowie die Dosis finden, der bei den Mäusen auch zu einer schweren invasiv verlaufenden Pneumonie führte. Dazu wurde in diesem Modell ein virulenter *S. pneumoniae*- Stamm vom Serotyp 3, Pn36, verwendet, der auch beim Menschen für eine Vielzahl schwerer, invasiver Verläufe der Pneumonie verantwortlich ist [12,13,14].

Es wurde der klinische Verlauf der Pneumonie beobachtet, der Gewichtsverlauf dokumentiert und die Erregerlast in den einzelnen Kompartimenten untersucht. Mittels

Lungenfunktions- und Blutgasanalyse wurde das Ausmaß der pulmonalen und systemischen Beteiligung erfasst.

Zunächst wurde eine Methode etabliert, um die Leukozyten zu isolieren und mittels Durchflusszytometrie die Lymphozytensubpopulation zu differenzieren. Die Lymphozytensubpopulationen in der Lunge und im peripheren Blut wurden im Verlauf der Infektion differenziert und quantifiziert, und zudem erfolgte die funktionelle Charakterisierung der verschiedenen Subpopulationen. Zusätzlich wurden auch die spezifischen Chemokine der NK- und NKT- Zellen untersucht. Ziel dieser Analysen war es herauszufinden, ob während einer Pneumokokkenpneumonie ein Einstrom und eine Aktivierung der NK- und NKT-Zellen in der Lunge erfolgt.

Zur gezielten Elimination von Subpopulationen wurde der Einsatz von Antikörpern erprobt. Durch die Elimination der NK- und NKT- Zellen wurde versucht, den Einfluss dieser Lymphozytensubpopulationen auf den klinischen Verlauf einer Infektion mit *S. pneumoniae* zu analysieren.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Lymphozytensubpopulationen bei der Pneumokokkeninfektion im Rahmen der unspezifischen, angeborenen Immunantwort besser zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden weibliche, 10 Wochen alte C57BL/6- Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Mäuse hatten ein Gewicht zwischen 18 und 21 g und wurden in Käfigen mit IVC- System (individuell belüftete Käfige) artgerecht gehalten. Licht- und Raumklima wurden auf die Bedürfnisse der Tiere angepasst (Raumtemperatur 20-24°C, relative Luftfeuchte 45-65%, Lichtrhythmus 12 Stunden hell/ 12 Stunden dunkel). Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

Die Tierversuche wurden nach den „Principles Set Four“ aus dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (Institute of Animals Resources, National Research Council, Department for Health, Education und Welfare, National Institute of Health, 78-23) geplant und durchgeführt. Die Tierversuche wurden durch das LAGetSi (Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit) Berlin genehmigt. (Tierversuchsantrag: G 0114/01)

2.2 Bakterien und Bakterienkultur

Für die Versuche wurde ein bekapselter *Streptococcus pneumoniae*- Stamm, PN36, Serotyp 3 (NCTC 7978) verwendet. Die Arbeitsstöcke wurden bei -80°C in einem Medium bestehend aus 80% Todd- Hewitt- Bouillon (BD, # 249240) mit 0,5% Hefeextrakt (BD, # 288620) und 20% Glycerol (Sigma, # G6279) gelagert.

Für die Infektion wurden Pneumokokken des Arbeitsstockes 12h vor Beginn des Versuches auf einer Schafsblutagarplatte (Columbia, BD, # 254005) ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die zur Bakterienanzucht verwendete sterile Nährbouillon bestand aus Todd-Hewitt-Bouillon mit 0,5% Hefeextrakt und enthielt zusätzlich 10 % hitzeinaktiviertes, steril filtriertes FCS (fetal calf serum, PAA, #A15-649). In diese wurden 5-10 Kolonien überführt, sodass bei der photometrischen Messung (600 nm) eine optische Dichte (OD) von 0,03-0,04 erreicht wurde. Nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD von 0,4 wurden die Bakterien mit 1900 x g, 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Nach

Abpipettieren des Überstandes konnten die Pneumokokken in steriles PBS (Dulbecco's, # 210406) resuspendiert werden, so dass die Infektionsdosis erreicht wurde. Die Kontrolle der Dosis erfolgte durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Agarplatte.

2.3 Infektion und Präparation

Zur Infektion wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von 40 µl eines 5:2 Gemisches aus Ketanest (50 mg/ml) und Rompun (20 mg/ml) anästhesiert und anschließend gewogen. Während der Infektion befanden sie sich in einer vertikalen Position und pro Nasenloch wurden 10 µl der Bakteriensuspension langsam appliziert. Bis zum Erwachen standen die Tiere unter Beobachtung, wurden danach wieder in den Käfig gesetzt und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Im weiteren Verlauf wurden die Tiere permanent auf klinische Zeichen einer Erkrankung überwacht. Die infizierten Tiere wurden zu den Zeitpunkten 6h, 12h, 24h, 48h und 60h in voneinander unabhängigen Versuchen präpariert (n=5). Mittels score-sheet wurde das Ausmaß des Leidens der Tiere quantifiziert und im Falle des Überschreitens einer prädefinierten Grenze wurden die Tiere euthanasiert.

Als Kontrollgruppe wurden zum einen unbehandelte Mäuse verwendet und zum anderen Mäuse, denen steriles PBS transnasal appliziert wurde, um den Einfluss von Narkose und Instillation von Flüssigkeit auf die Ergebnisse zu überprüfen. Zwischen beiden Kontrollgruppen ergaben sich keine messbaren Unterschiede.

Vor der Präparation wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion von 200 µl eines 4:1:7 Gemisches bestehend aus Ketanest (50 mg/ml), Rompun (20 mg/ml) und Kochsalzlösung (0,9%) in tiefe Narkose versetzt und nochmals gewogen. Nach Freilegung der Trachea folgte die Intubation mit anschließender Beatmung durch einen Respirator (Mini Vent Type 845; Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten), mit einer Atemfrequenz von 150/min und einem Atemzugvolumen von 120 µl. Nach medianer Laparotomie und Thorakotomie erfolgte durch finale Blutentnahme mittels Punktion der rechten Herzkammer die Tötung des Tieres. Anschließend konnte die Milz nach Anlegen einer Ligatur entfernt werden. In die Arteria pulmonalis wurde ein Katheter luftblasenfrei eingelegt und ligiert, und die Herzspitze abgeschnitten, um den pulmonalvenösen Abfluss zu gewährleisten. Über den Katheter wurde die Lunge für 3 Minuten

mit 0,9% Kochsalzlösung gespült. Anschließend folgte die Entnahme von Lunge und Leber.

2.4 Blutgasanalyse und Blutdruckmessung

Zur Blutdruckmessung wurde während der Präparation ein Katheter in die linke Arteria carotis eingelegt und über einen Druckaufnehmer der Blutdruck über 10 Minuten gemessen.

Aus der Arterie wurde auch eine Blutprobe entnommen und mittels Blutgasanalysegerät (ABL 700 Series, Radiometer-Copenhagen, Willich, Deutschland) untersucht. So konnten pO_2 , pCO_2 und Laktat ermittelt werden. Da die Mäuse mit 100% O_2 beatmet wurden, entspricht der arterielle pO_2 dem Oxygenierungsindex (paO_2/FiO_2).

2.5 Lungenfunktionsanalyse

Die Lunge wurde, wie bereits oben beschrieben, nach Tötung der Tiere präpariert und über den Katheter in der Arteria pulmonalis mit 0,9 % Kochsalzlösung ohne Rezirkulation perfundiert (1 ml/min). Der pulmonalarterielle Druck (PAP) wurde dabei kontinuierlich gemessen. Im weiteren Verlauf erfolgte die Beatmung wie vorbeschrieben [77] in einer geschlossenen Kammer mit negativem Druck von $-4,5$ bis $-9,0$ cmH_2O und mit 90 Atemzügen pro Minute. Der Kammerdruck und die Strömungsgeschwindigkeit der Luft wurden mittels Pneumotachograph und Differenzialdruckaufnehmer gemessen. Amplifizierung und Analyse aller Daten erfolgte mittels Pulmodyn[®] Software. Die Daten für die Lungenmechanik wurden analysiert wie bereits vorbeschrieben (Held HD JAP 2000 "basal lung mechanics). Die Hardware und Software war von HSE Harvard Apparatus (March-Hugstetten, Deutschland) käuflich erworben.

2.6 Isolation der Leukozyten aus Lunge, Leber und Milz

Aus den entnommenen Organen wurden die Leukozyten isoliert. Die Herstellung von Einzelzellsuspensionen erfolgte nach bereits vorbeschriebener Methode. [1,4] Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Lunge in 5 ml RPMI mit 10% hitzeinaktiviertes, steriles FCS, 0,3 mg/ml DNase (Roche, #104159) und 0,14 mg/ml

(308 U/mg) Kollagenase (Worthington Biochemical Corporation, #4177) aufgenommen, mit einer Schere zerkleinert und für 60 Minuten im 37°C warmen Wasserrüttelbad inkubiert.

Die Leber und Milz wurden ebenfalls in RPMI aufgenommen und mit der Schere zerkleinert. Auf die Inkubation mit Kollagenase im Wasserbad konnte bei Leber und Milz verzichtet werden. Leber und Milz wurden gleich und Lunge nach der Inkubation im Wasserrüttelbad vorsichtig mit einem Spritzenstempel und reichlich RPMI mit 10% hitzeinaktiviertes, steriles FCS, 0,3 mg/ml DNase durch ein 100 µm Sieb (BD Falcon, #352360) in ein Falcon- Röhrchen (BD, #2098) gedrückt.

Nach Zentrifugation mit 300 x g für 10 min und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl wurde die Zellsuspension mit Methylviolett im Verhältnis 1:1 versetzt und in einer Zählkammer nach Neubauer unter dem Mikroskop gezählt.

Zur weiteren Differenzierung der Leukozyten wurden Zytospins angefertigt. Dazu erfolgte die Resuspendierung der Zellen in PBS, sodass eine Konzentration von 100.000 Zellen in 100 µl erreicht wurde. Dann konnten 100 µl dieser Zellsuspension auf einen Zytospin- Objektträger gegeben und mit 800 rpm für 5 Minuten in der Zytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon) zentrifugiert werden. Anschließend erfolgte die Färbung mit May-Grünwald (Merck, # 209678) und Giemsa (Merck, # 208395). Zur Differenzierung der Leukozyten wurden bei 500- facher Vergrößerung mindestens 200 Zellen ausgezählt und die Absolutzellzahlen der Leukozytensubpopulationen berechnet.

2.7 Analyse von Blutbild und Differentialblutbild

Zur Bestimmung der Absolutzellzahl und zur Differenzierung der Leukozyten im Blut wurden TruCOUNT Röhrchen (BD, #340334) verwendet. In diese wurden 50 µl des unverdünnten Blutes gegeben und für 20 Minuten mit folgenden Antikörpern gefärbt: NK1.1 Fitc, CD19 PE, CD45PerCP, CD3 APC. (Tab.1) Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurden 450 µl Facs Lysing Solution (BD, # 349202) hinzugefügt. Im Anschluss an eine weitere Inkubation von 15 Minuten erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Durch die vorher bekannte Menge an Beads im Röhrchen konnten mittels Verhältnisleichung die Absolutzahlen berechnet werden.

2.8 Bestimmung der Erregerlast in Blut, Lunge, Milz und Leber

Zur Bestimmung der Erregerlast im Blut und in den Einzelzellsuspensionen der Lunge, Leber und Milz wurden unterschiedliche Verdünnungen auf Schafsblutagarplatten ausgestrichen. Nach 12 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Kolonien ausgezählt und auf die Gesamtmenge pro Organ oder pro ml Blut bezogen.

2.9 Durchflusszytometrie

2.9.1 Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung erfolgte eine Vorinkubation mit Fcγ-Block (2μl/1*10⁶ Zellen), um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach dem Protokoll von Becton Dickinson wurden zunächst ca. 500.000 Zellen pro Ansatz mit den in Tabelle 1 aufgeführten Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit FACS-Lysing-Solution lysiert. Die Analyse der Zellen am Durchflusszytometer erfolgte nach mehreren Waschschritten.

Zusätzlich wurden bei jeder Färbung Isotypkontrollen mitgeführt, um eine unspezifische Bindung ausschließen zu können.

Antikörper	Firma	Klone	Bestellnummer
CD 4 Fitc	BD- Pharmingen	RM4-5	553047
NK1.1 Fitc	BD- Pharmingen	PK136	553164
CD19 PE	BD- Pharmingen	1D3	553786
TCRγδ PE	BD- Pharmingen	GL3	553178
CD 69 PE	BD- Pharmingen	H1.2F3	553237
CD3 PerCp	BD- Pharmingen	145-2C11	553067
CD 45 PerCp	BD- Pharmingen	30-F11	557235
CD 3 APC	BD- Pharmingen	RM4-5	553066
CD 8 APC	BD- Pharmingen	53-6.7	553035
Hamster IgG Isotyp PE	BD- Pharmingen	G235-2356	554711

Tabelle 1: Antikörper für Oberflächenfärbung

2.9.2 Intrazellulärfärbung

Für die Analyse von IFNγ und TNFα wurden die Zellen vor der Färbung mit einer Konzentration von 1*10⁶ Zellen/ml in RPMI mit 10% FCS resuspendiert und für 4

Stunden mit 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma, # B-7651) bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Intrazellulärfärbung nach dem Protokoll von Pharmingen durchgeführt. Nach Lysierung mit Ammoniumchlorid– Lyse (8,26g/l NH₄Cl, 1g/l KHCO₂, Titriplex III 0,042g/l in Aqua dest. gelöst) wurden die Zellen mit Staining Buffer (PBS mit 1% FCS und 0,09% Na- Azid) gewaschen. Im Anschluß erfolgte eine Vorinkubation mit Fcγ- Block für 10 Minuten (2µl/1*10⁶ Zellen). Danach wurden die Zellen mit den Oberflächenantikörpern (CD45, CD3, CD4, CD8, NK1.1; Tab. 1) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend mit Cytofix/Cytoperm (Pharmingen, #554722) für 20 Minuten bei 4°C fixiert und permabilisiert. Nach erneuter Inkubation mit Fcγ- Block für 10 Minuten (4µl/1*10⁶Zellen) wurden die intrazellulären Antikörper (Tab. 2) hinzugefügt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit Perm Wash (Pharmingen, #554723) konnten die gefärbten Proben ebenfalls am Durchflusszytometer analysiert werden.

Antikörper	Firma	Klone	Bestellnummer
TNFα	BD- Pharmingen	MP6-XT22	554419
IFNγ	BD- Pharmingen	XMG1.2	554412
Rat IgG Isotyp PE	BD- Pharmingen	R3-34	553925

Tabelle 2: Antikörper für Intrazellulärfärbung

Auch hier wurden Isotypkontrollen durchgeführt, um unspezifische Bindungen durch die monoklonalen Antikörper an den Zellen ausschließen zu können.

2.9.3 Durchflusszytometrische Analyse

Die Untersuchungen wurden am Vierfarben- FACSCaliburTM der Firma Becton Dickinson durchgeführt und die Messdaten mit der CellQuestProTM-Software (Becton Dickinson) analysiert und graphisch dargestellt.

Bei der Messung wurden CD45 (Panleukozytenmarker)- positive Lymphozyten über ein „Gate“ eingegrenzt und somit von den übrigen Zellen bei der Analyse getrennt. Mindestens 5000 der erwünschten Zellen wurden analysiert.

In Abhängigkeit von der Art des Parameters wurde entweder die Expressionsdichte durch die Höhe der mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) ermittelt oder der Prozentsatz an positiven Zellen mittels Dot Plot Diagramm dargestellt.

2.10 RNA Isolation aus Lungengewebe und RT-PCR für die Chemokine MIP1 α , MCP1, IP10 und MIG

Für die RT-PCR wurde die Lunge sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert. Die Zerkleinerung des gefrorenen Lungengewebes erfolgte mittels in flüssigem Stickstoff gekühltem Aluminiummörser. Die RNA wurde aus dem gefrorenen Gewebe mit Hilfe des RNeasy- Mini- Isolation- Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Hersteller- Protokoll isoliert. Danach wurde das RNA- Isolat mittels Photometer quantifiziert und anschließend bei -80°C gelagert.

Die cDNA wurde nach dem Herstellerprotokoll durch reverse Transkription aus RNA (2 μ g) unter Verwendung von ProStar First Strand RT-PCR Kit (Stratagene Europa, Amsterdam, Niederlande) und von spezifischen Oligo- (dT)- Primer für MIP1 α , MCP1, IP10 und MIG gewonnen.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tabelle 3 dargestellt.

	sense	antisense
G3PDH (496 BP)	TGA TGG GTG TGA ACC ACG AG	TCA GTG TAG CCC AAG ATG CC
MIP-1 α (268 BP)	ATG AAG GTC TCC ACC ACT G	GCA TTC AGT TCC AGG TCA
MCP-1 (411 BP)	ATG CAG GTC CCT GTC ATG	GCT TAG GGT GGT TGT GGA
IP10 (355 BP)	ATG AAC CCA AGT GCT GCC GTC	TGG AGA GAC AGG CTC TCT GCT
MIG (380 BP)	TGA AGT CCG CTG TTC TTT TCC T	TTA TGT AGT CTT CCT TGA ACG ACG

Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Primer.

Die PCR mit G3PDH (Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde zur Verifizierung der relativen Menge an cDNA bei jeder Amplifikation mitgeführt.

Im Anschluß erfolgte die Auftrennung der Proben auf einem 1,2% Agarose- Gel, welches Ethidiumbromid enthält. Danach konnten die Banden mittels UV-Transluminatation sichtbar gemacht und photographiert werden.

2.11 Quantifizierung der Zytokinproduktion

Die quantitative Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen in der Lunge und im Plasma erfolgte mit dem Multiplex- Bead- Kit von Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) nach dem Hersteller- Protokoll. Für jedes Zytokin wurde eine Standardkurve generiert unter Verwendung der Referenz- Zytokinkonzentrationen des Herstellers. Mittels Bioplex- Manager SoftwareTM 3.0 wurden die Zytokinkonzentrationen quantifiziert. So konnten TNF α , IFN γ , IL-6, IL-10, G-CSF, IL-1 β in der Lunge und im Plasma quantifiziert werden.

2.12 Depletion der NK- Zellen mit Asialo GM1 und NK1.1

Zur Depletion der NK- Zellen wurde den C57Bl/6- Mäusen ein polyklonaler Antikörper (rabbit anti- asiolo GM1; Wako Bioproducts, Neuss Deutschland) appliziert, der zu einem selektiven Verlust der NK-Zellen führt, während NKT-Zellen weiterhin vorhanden sind. Des Weiteren wurde ein anti-NK1.1 Antikörper (PK 136, BD Pharmingen, Deutschland) verwendet, der zum Verlust von NK- und NKT -Zellen führt. Sowohl der Asialo-GM1- Antikörper als auch der NK1.1- Antikörper wurden jeweils 48 und 24 Stunden vor Infektionsbeginn, zum Zeitpunkt der Infektion und 24 Stunden nach der Infektion intraperitoneal injiziert. Für jede Applikation wurden 50 μ l Asialo-GM1- Antikörper und 35 μ l (100 μ g) NK1.1- Antikörper verwendet.

Die Wirksamkeit der Depletion wurde an Kontrolltieren 24 Stunden nach der zweiten Injektion des Antikörpers nachgewiesen. Die derart depletierten Tiere wurden dann mit einer LD50- Dosis ($1 \cdot 10^5$ CFU) Pneumokokken infiziert.

Als Kontrollgruppe wurden zum einen Tiere verwendet, denen zu den obengenannten Zeitpunkten steriles PBS injiziert wurde. Als weitere Kontrollgruppe wurden Tiere verwendet, denen Kaninchenserum (Dako, Hamburg, Deutschland) zu den entsprechenden Zeitpunkten injiziert wurde. Nach der Infektion wurden der Verlauf der Infektion und die Überlebensrate beobachtet.

2.13 Statistische Auswertung

Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurden pro Zeitpunkt mindestens 5 unabhängige Individuen untersucht. Die Daten wurden als Mittelwert +/- SEM von n unabhängigen Versuchen angegeben. Für alle Parameter erfolgte der Vergleich aller Gruppen durch einen Test für mehrere unabhängige Stichproben (Kruskal-Wallis-Test). Außerdem wurde im Anschluss ein Vergleich zwischen den einzelnen Infektionszeitpunkten und der Kontrollgruppe mittels eines Tests für zwei unabhängige Stichproben (Mann-Whitney-Test) durchgeführt.

Die Analyse der Überlebensraten erfolgte mit Log- Rank- Test. Dabei wurden p-Werte $<0,05$ (*), $<0,01$ (**) und $<0,001$ (***) als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der software Graphpad Prism 4 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die statistischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

3 Ergebnisse

3.1 Die Pneumokokkenpneumonie in der Maus

Um den Ablauf einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie (SCAP; severe community acquired pneumonia) in der Maus abzubilden wurde ein sehr virulenter, bekapselter Pneumokokken- Stamm vom Serotyp 3, Pn36, verwendet, der auch beim Menschen für besonders schwere, invasive Verläufe der Pneumonie verantwortlich ist. Die Infektionsdosis wurde so gewählt, dass sie bei allen Tieren zu einer schweren, letal verlaufenden Infektion führte.

Die C57Bl/6- Mäuse wurden transnasal mit einer Dosis von $5 \cdot 10^6$ CFU *S. pneumoniae* infiziert. Durch die transnasale Applikation konnte der Infektionsweg des Menschen über den Nasen- Rachenraum imitiert werden. Die Tiere erholten sich sehr schnell von der Anästhesie und dem Infektionsvorgang und wiesen in den ersten 12 Stunden keine klinischen Zeichen einer Infektion auf. Nach 24 Stunden Infektionsdauer zeigten sich deutliche Krankheitszeichen, wie zunehmende Bewegungsarmut, erschwerte Atmung und eine Piloerektion. Nach 48 Stunden waren alle Tiere schwer krank und nach 60 Stunden moribund, sodass sie getötet werden mussten. Neben der klinischen Verschlechterung wiesen die Tiere gleichzeitig auch einen Gewichtsverlust von bis zu 20% des Ausgangsgewichts nach 48 bzw. 60 Stunden auf (Abb1).

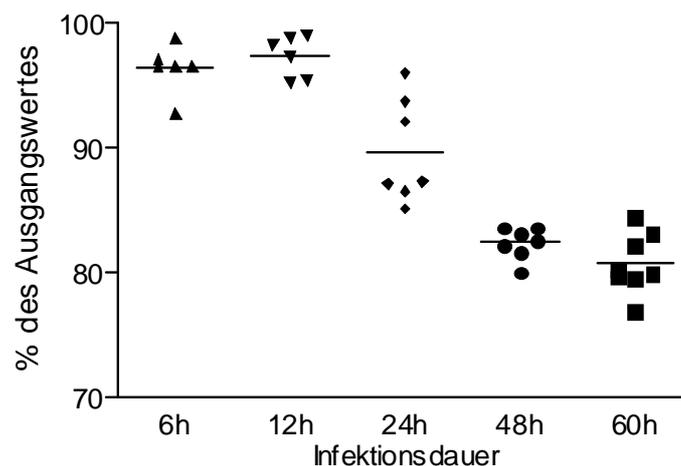


Abb. 1: Gewichtsreduktion in % des Ausgangswertes nach einer Infektion mit $5 \cdot 10^6$ CFU.

Bereits in den ersten Stunden nach der Infektion zeigte sich eine Zunahme der Erregerlast in der Lunge auf mehr als das 10-fache der Infektionsdosis. Bei ungefähr

der Hälfte der Mäuse ließen sich 24 Stunden nach Infektion Bakterien im Blut nachweisen und zu den späteren Zeitpunkten zeigten alle Mäuse eine schwere Bakteriämie. Zeitgleich mit dem Auftreten der Bakteriämie konnten auch aus Leber und Milz Bakterien isoliert werden, und auch hier war im Verlauf eine zunehmende Erregerlast nachweisbar (Abb. 2).

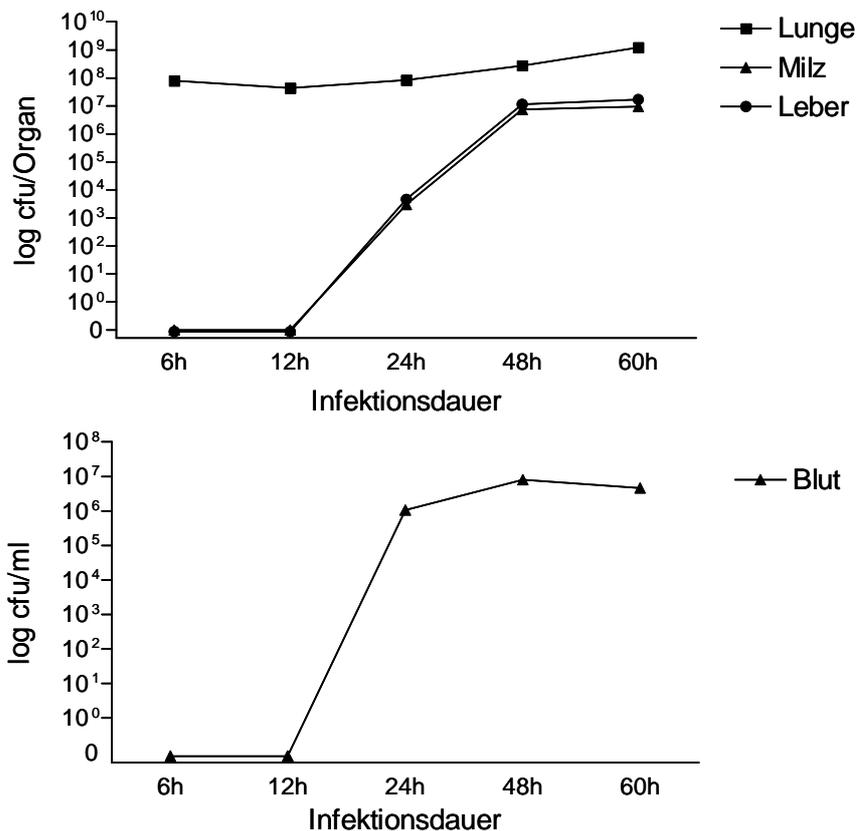


Abb. 2: Erregerlast in Lunge, Leber und Milz (obere Abbildung), angegeben in CFU (koloniebildende Einheiten) pro Organ und im Blut (untere Abbildung) angegeben in CFU pro ml Vollblut nach einer Infektion mit $5 \cdot 10^6$ CFU.

Neben den klinischen Zeichen einer schweren Infektion und der zunehmenden Erregerlast in der Lunge zeigte sich auch eine kontinuierliche, signifikante Zunahme der Leukozyten in der Lunge. Die Leukozytose war insbesondere durch den Einstrom der neutrophilen Granulozyten und die signifikante Zunahme der Monozyten und Makrophagen bedingt (Abb.3).

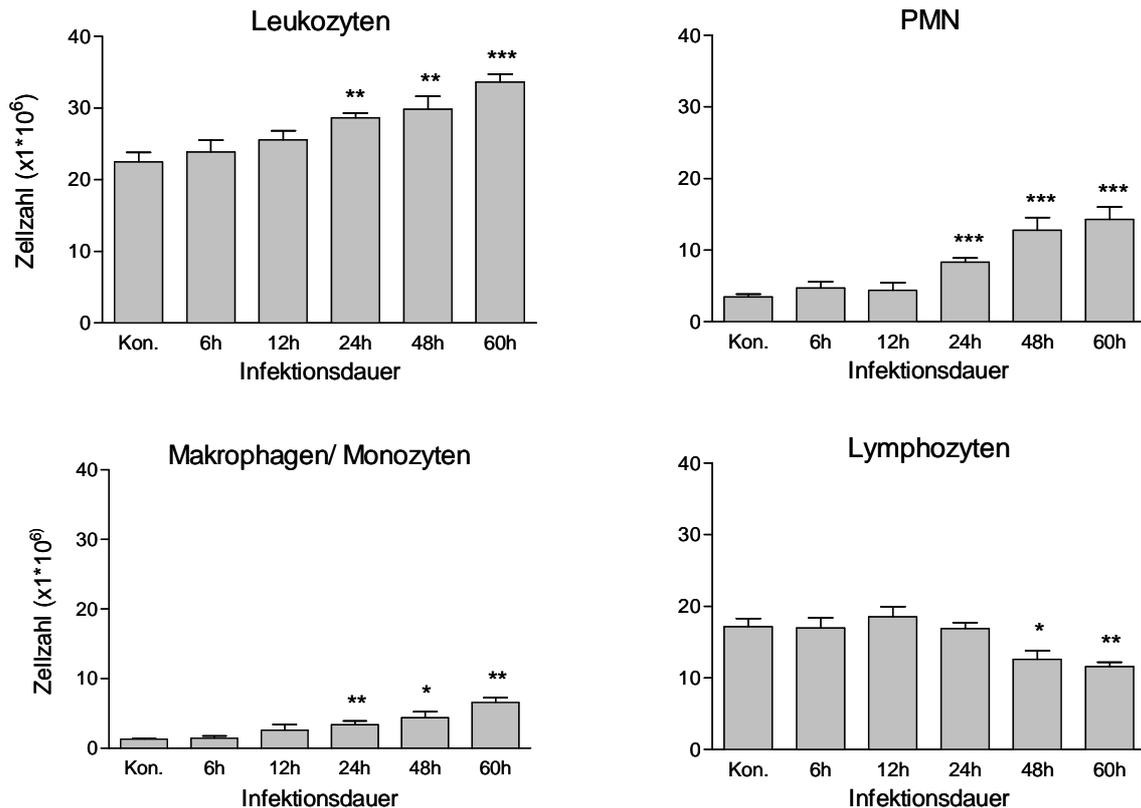


Abb. 3: Absolutzellzahl der Leukozyten, PMN (polymorphnukleäre Granulozyten), Makrophagen/ Monozyten und Lymphozyten in der Lunge im Verlauf der Infektion.

Parallel zu den klinischen Zeichen der Infektion und dem Leukozyteneinstrom ließen sich auch histologisch zunehmend Infiltrate nachweisen, die vor allem peribronchial und perivaskulär lokalisiert waren (Abb. 4). Neben den ausgedehnten Infiltraten entwickelten die Tiere nach 48 Stunden eine respiratorische Insuffizienz mit einem signifikanten Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (p_aO_2). Damit verbunden war auch eine signifikante Reduktion des Oxygenierungsindex (p_aO_2/F_iO_2) auf 311 mmHg (Abb. 5A). Zudem zeigten die Tiere einen signifikanten Abfall der dynamischen Compliance um etwa 25% (Abb. 5B), was als Folge der Infiltration und eines Lungenödems zu werten ist.

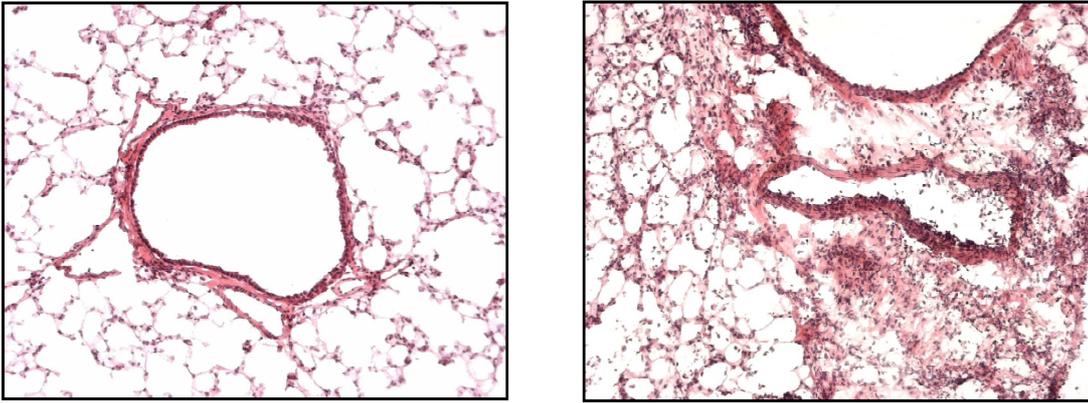


Abb. 4: HE- Färbung der Lunge; starke perivaskuläre, peribronchiale und intraalveoläre Leukozytenansammlung nach 48h Infektionsdauer (Bild rechts); Im Vergleich dazu die Kontrolle (Bild links).

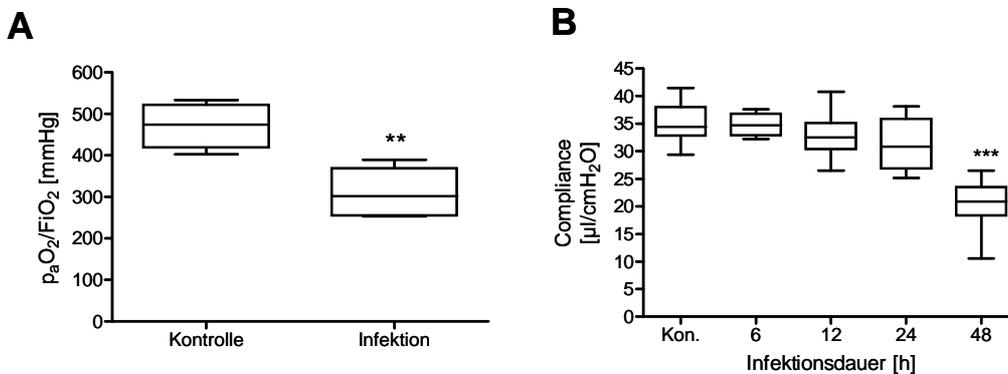


Abb. 5: Oxygenierungsindex (p_{aO_2}/F_{iO_2}) im arteriellen Blut (A) nach 48 Stunden Infektionsdauer. Lungenfunktionsuntersuchung. Messung der Compliance in $\mu\text{l}/\text{cmH}_2\text{O}$ (B) der Lunge nach 6/12/24/48h Infektion mit *S. pneumoniae*.

Neben dem Leukozyteneinstrom in die Lunge ließ sich im pulmonalen Kompartiment mittels Bioplex- Assay auch ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine nachweisen. Bereits 6 Stunden nach der Infektion zeigte sich in der Lunge ein deutlicher Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und G-CSF, der im Verlauf noch weiter zunahm. Auch TNF α und IFN γ nahmen im Verlauf der Pneumonie kontinuierlich zu und waren nach 48 Stunden signifikant erhöht. Als Gegenregulation zu dieser starken inflammatorischen Reaktion wurden auch vermehrt antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 exprimiert. In der Lunge zeigte sich bereits nach 24 Stunden ein signifikanter Anstieg der Produktion von IL-10 (Abb. 6).

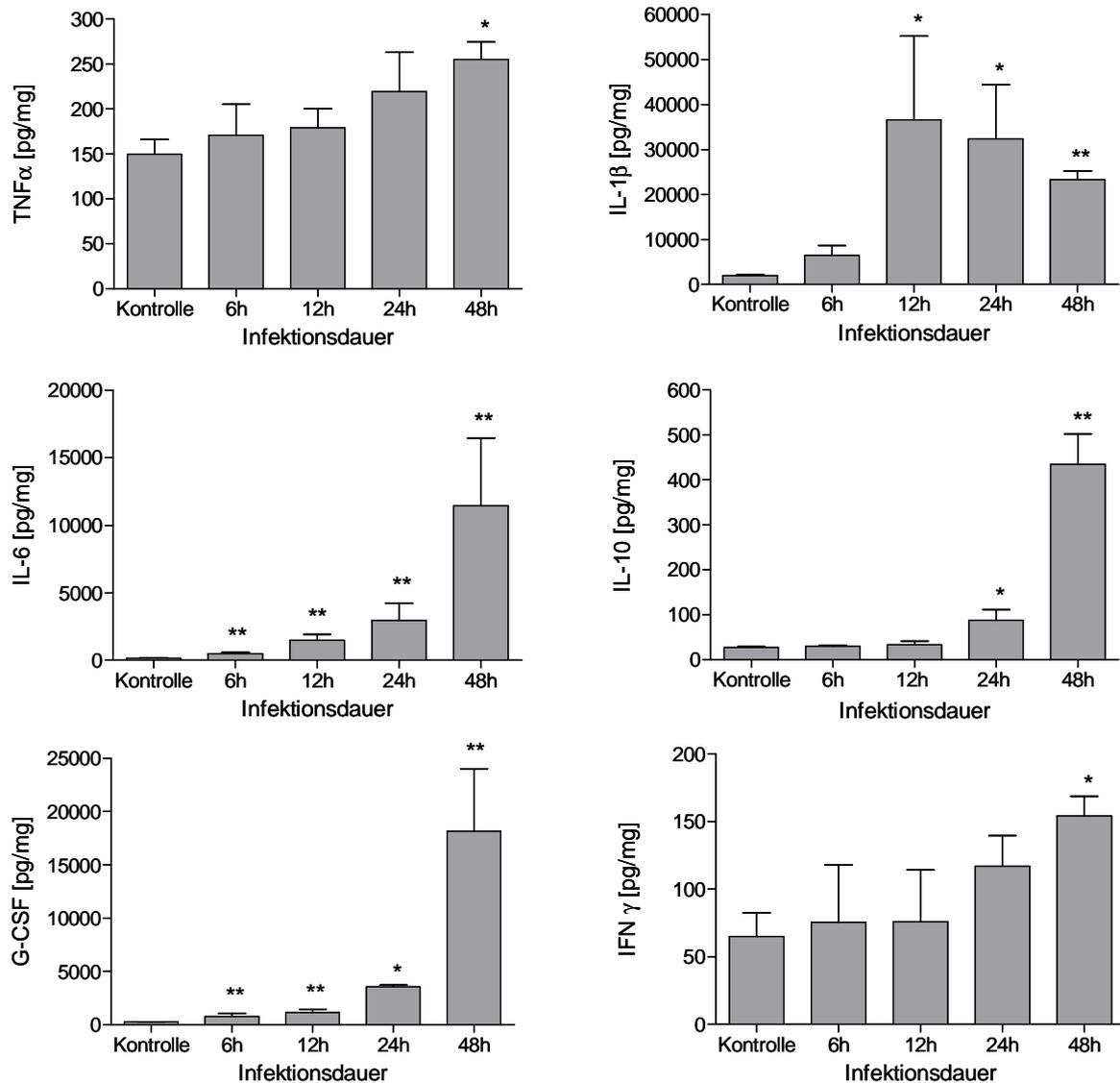


Abb. 6: Quantitative Zytokinanalyse in der Lunge mittels Bioplex- Assay

Auch im Blut kam es zu einem deutlichen Anstieg der proinflammatorischen Zytokine. Zeitgleich mit dem Auftreten der Bakteriämie ließ sich auch eine ausgeprägte systemische Zytokinproduktion nachweisen. Proinflammatorische Zytokine einschließlich IL-6 und G-CSF, aber auch IL-10 wiesen nach 48 Stunden eine signifikante Zunahme auf. Serumspiegel von TNF α und IFN γ waren bereits 24 h nach Infektion signifikant erhöht und stiegen während der folgenden 24 h weiter an (Abb. 7).

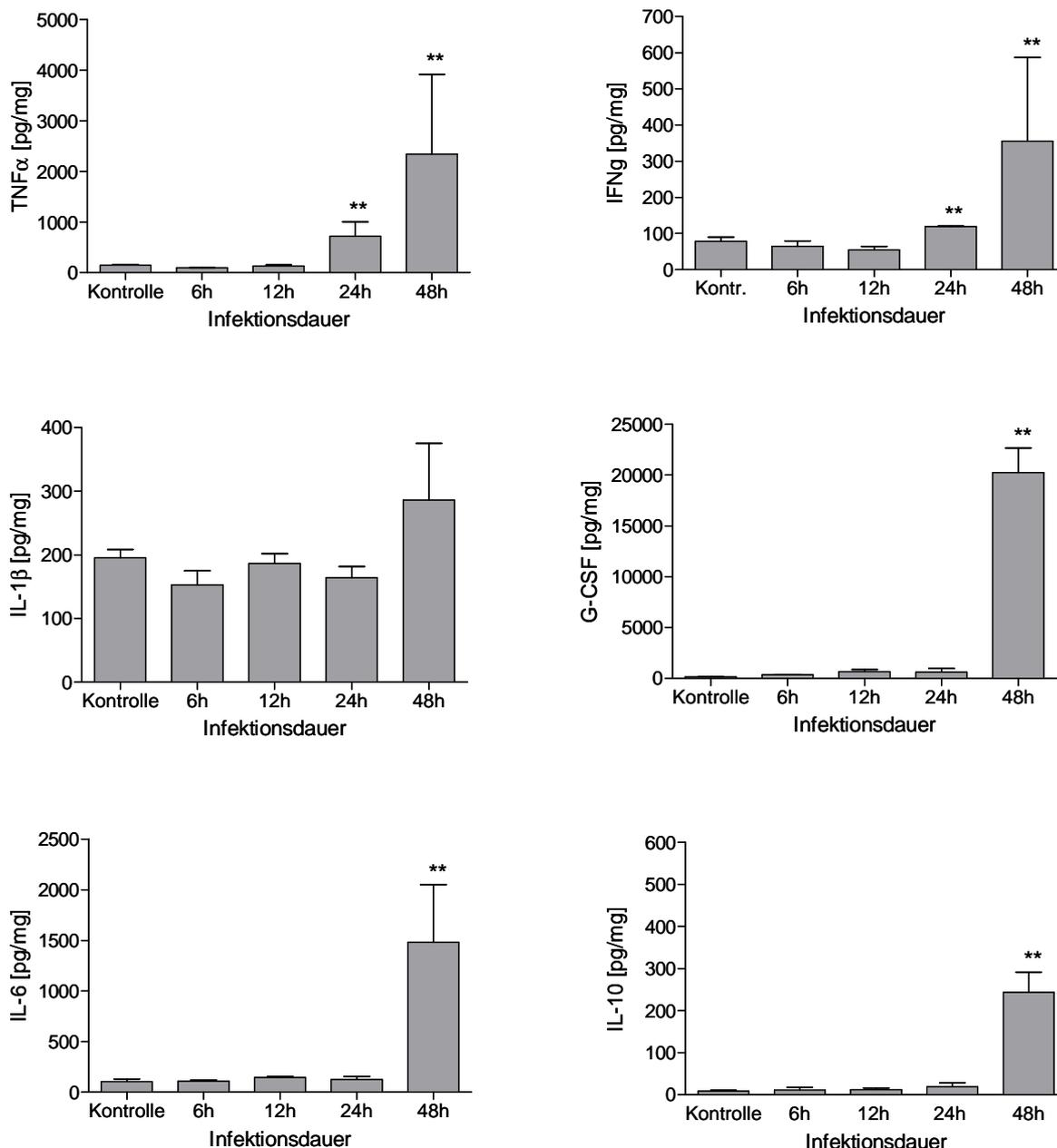


Abb. 7: Quantitative Zytokinanalyse im Serum mittels Bioplex- Assay.

Die Bakteriämie und ausgeprägte systemische Inflammation sprechen für einen septischen Verlauf der Erkrankung. Durch die Analyse des Blutdrucks und Laktats sollten die systemischen Auswirkungen der Infektion weiter charakterisiert werden. Es kam zu einem signifikanten Anstieg des Laktatspiegel ausgehend von 1,33 mmol/l auf 2,18 mmol/l und einem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks um mehr als 30% (Abb. 8).

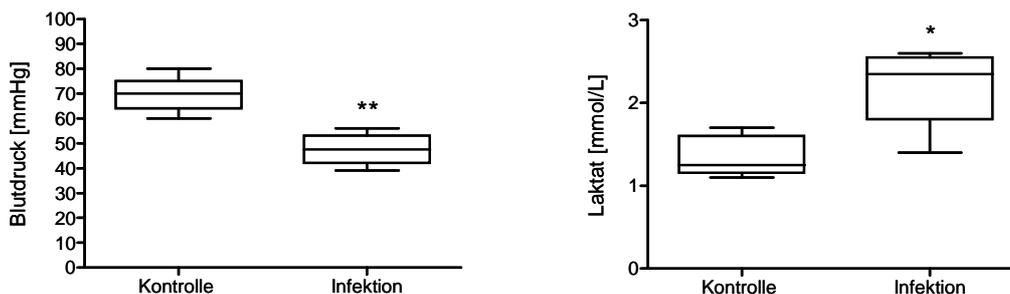


Abb. 8: Mittlerer arterieller Blutdruck und Laktat nach 48 Stunden Infektionsdauer und im Vergleich dazu die Kontrollgruppe.

3.2 Die Leukozytensubpopulationen in der Lunge

Im Verlauf der Pneumonie zeigte sich eine kontinuierliche, signifikante Zunahme der Leukozyten in der Lunge und nach 60 Stunden war die Gesamtleukozytenzahl um fast 50% angestiegen (Abb. 3A). Diese Erhöhung der Leukozytenzahl war hauptsächlich durch den Einstrom der neutrophilen Granulozyten in die Lunge bedingt, deren Zahl sich nach 60 Stunden vervierfacht hatte (Abb. 3B). Zudem ließ sich im Verlauf der Infektion ein signifikanter Anstieg der Monozyten und Makrophagen nachweisen (Abb. 3C). Interessanterweise kam es mit Beginn der deutlichen klinischen Verschlechterung zu einer Reduktion der Lymphozytenzahlen um bis zu 25% des Ausgangswertes (Abb.3D).

Eine nähere Phänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen zeigte insbesondere eine signifikante Reduktion der B- Zellen im Verlauf der Infektion. Trotz anfänglicher Konstanz der Zahl der B- Lymphozyten kam es mit Beginn des septischen Verlaufs zu einer massiven Reduktion um fast 75% nach 60 Stunden (Abb. 9 A). Die Zahl der T- Lymphozyten der Lunge dagegen blieb im Verlauf der Infektion zunächst relativ konstant. Mit Beginn der Sepsis kam es jedoch zu einer leichten Reduktion der T- Lymphozyten (Abb. 9 B). Diese war vor allem bedingt durch die signifikante Abnahme der CD4⁺-T- Lymphozyten um fast 50% (Abb. 9F). Die Zahlen der CD8⁺-T- Lymphozyten und der $\gamma\delta$ T- Lymphozyten blieben hingegen im Verlauf der Infektion konstant (Abb. 9 E/G). Die NK- Zellen wiesen im Verlauf der Infektion sogar eine leichte Zunahme um 33% im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die NKT- Zellen der Lunge nahmen im Infektionsverlauf sogar signifikant auf das 3-fache des Ausgangswertes zu (Abb.9 C/D). Im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie kam es also zu einer Zunahme der NK- und NKT- Zellen und parallel dazu zeigte sich ein selektiver Verlust der B- und CD4⁺-T- Lymphozyten.

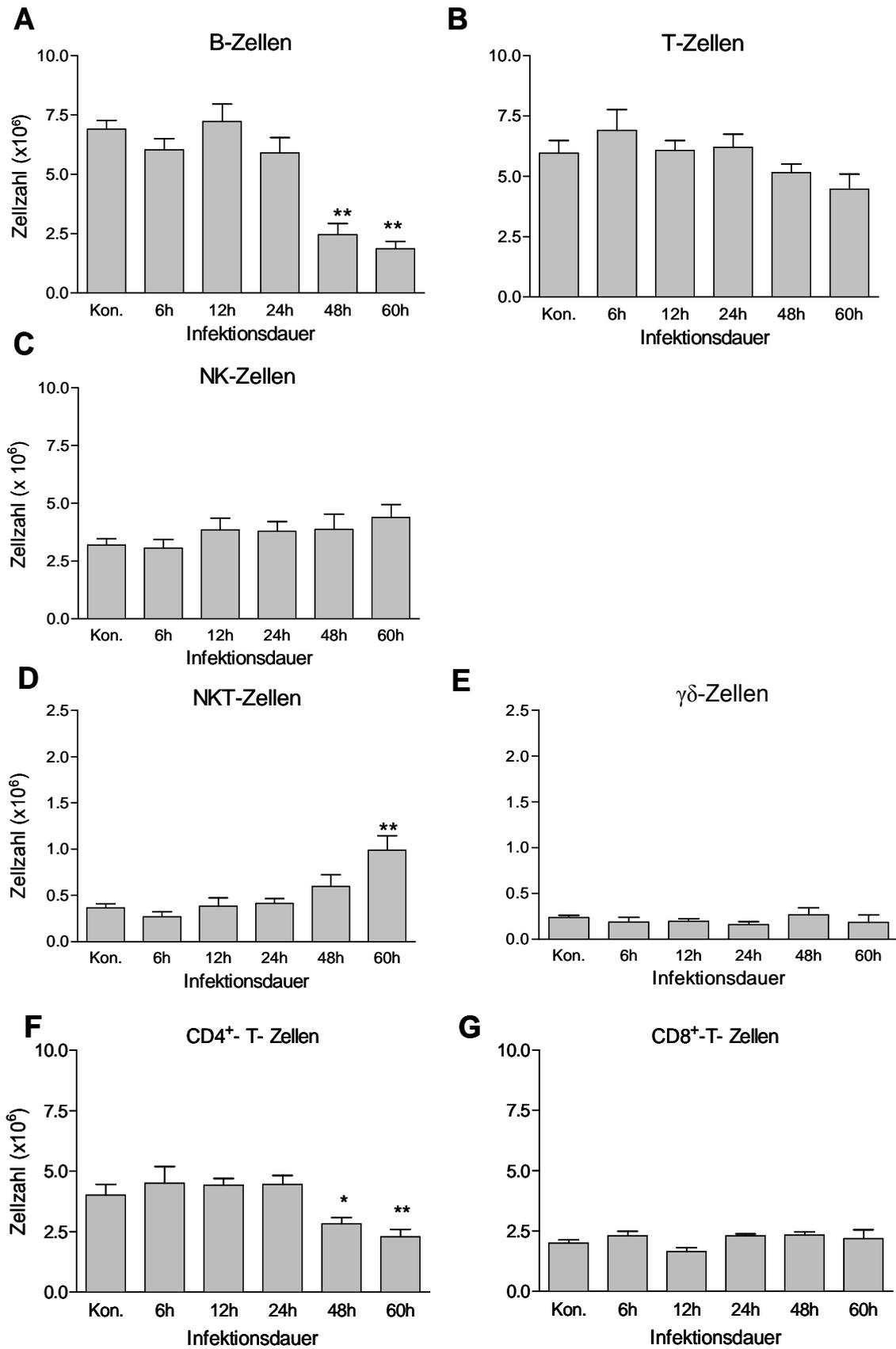


Abb. 9: Absolutzellzahlen der Lymphozytensubpopulationen in der Lunge.

Passend zu der Zunahme von NK- und NKT- Zellen zeigte sich auch eine vermehrte Expression der für die NK- und NKT- Zellen spezifischen Chemokine. Mittels RT-PCR wurden die für NK-/NKT- Zellen spezifischen Chemokine wie MCP-1, IP-10, MIG und MIP-1 α in den Lungengewebshomogenaten analysiert. Bereits nach 12 Stunden zeigte sich eine beginnende Zunahme der Chemokinsynthese auf mRNA- Ebene. Insbesondere MIP-1 α wurde bereits nach 12 h deutlich hochreguliert (Abb.10). Die Zunahme der NK- und NKT- Zellen und die vermehrte Expression von spezifischen Chemokinen sprechen für eine Rekrutierung dieser Zellen in die Lunge.

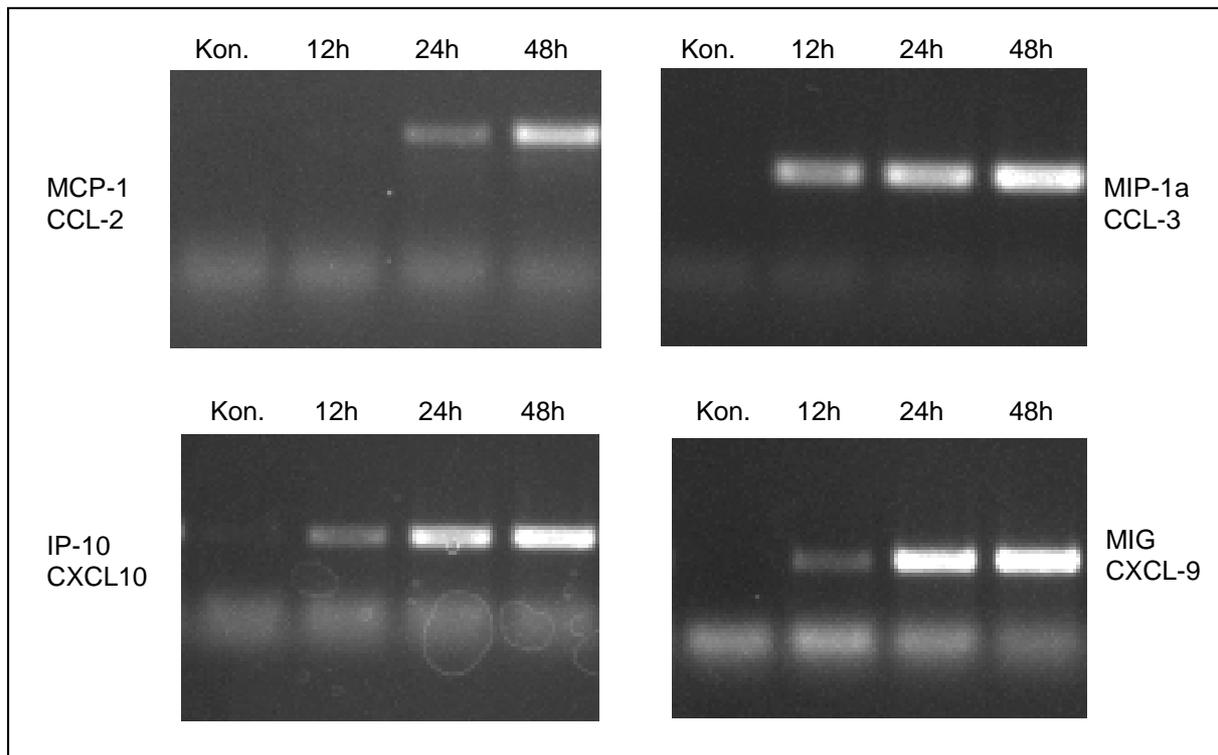


Abb. 10: RT-PCR der Lunge. Isolation der m-RNA der Lunge und RT-PCR für spezifische Chemokine nach 12, 24, 48 Stunden Infektion im Vergleich zur Kontrolle.

3.3 Leukozytensubpopulationen in den extrapulmonalen Kompartimenten Blut, Leber und Milz

Ähnlich wie in der Lunge fand sich auch im Blut eine anfängliche Zunahme der Gesamtleukozytenzahl hauptsächlich bedingt durch die Granulozytose (Abb.11). Jedoch zeigte sich nach 24 Stunden einhergehend mit der deutlichen klinischen Verschlechterung und dem septischen Verlauf eine zunehmende Reduktion der

Leukozytenzahlen (Abb. 11). Diese Leukozytopenie im Blut war hauptsächlich verursacht durch den massiven Verlust an Lymphozyten (Abb. 11).

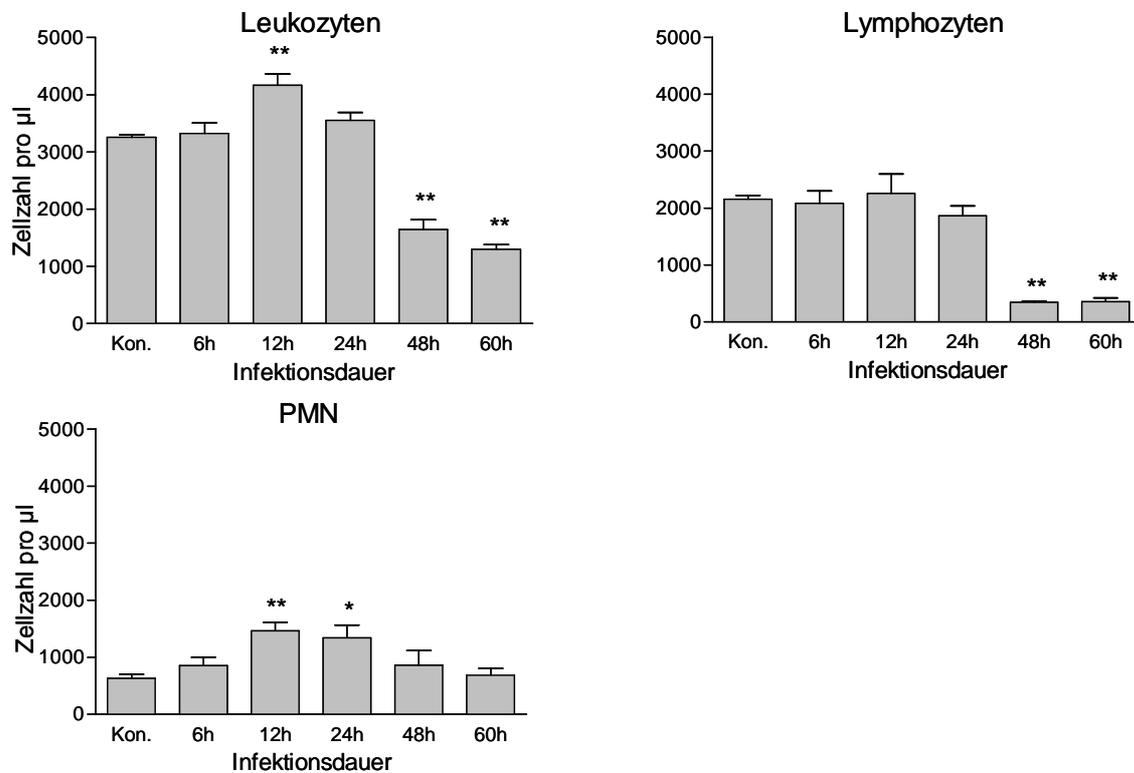


Abb. 11: Absolutzellzahl der Leukozyten, Lymphozyten und PMN (polymorphnukleäre Granulozyten) und im Blut im Verlauf der Infektion, dargestellt in Zellzahl pro µl Vollblut.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch in den anderen Kompartimenten. In der Leber kam es nach 48 Stunden bedingt durch die zunehmende Lymphozytopenie zu einer Reduktion der Leukozyten (Abb.12). Ebenso war in der Milz eine schwere Lymphozytopenie nachweisbar (Abb.12). Wie in der Lunge zeigte sich auch in Leber und Milz eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten (Abb. 12).

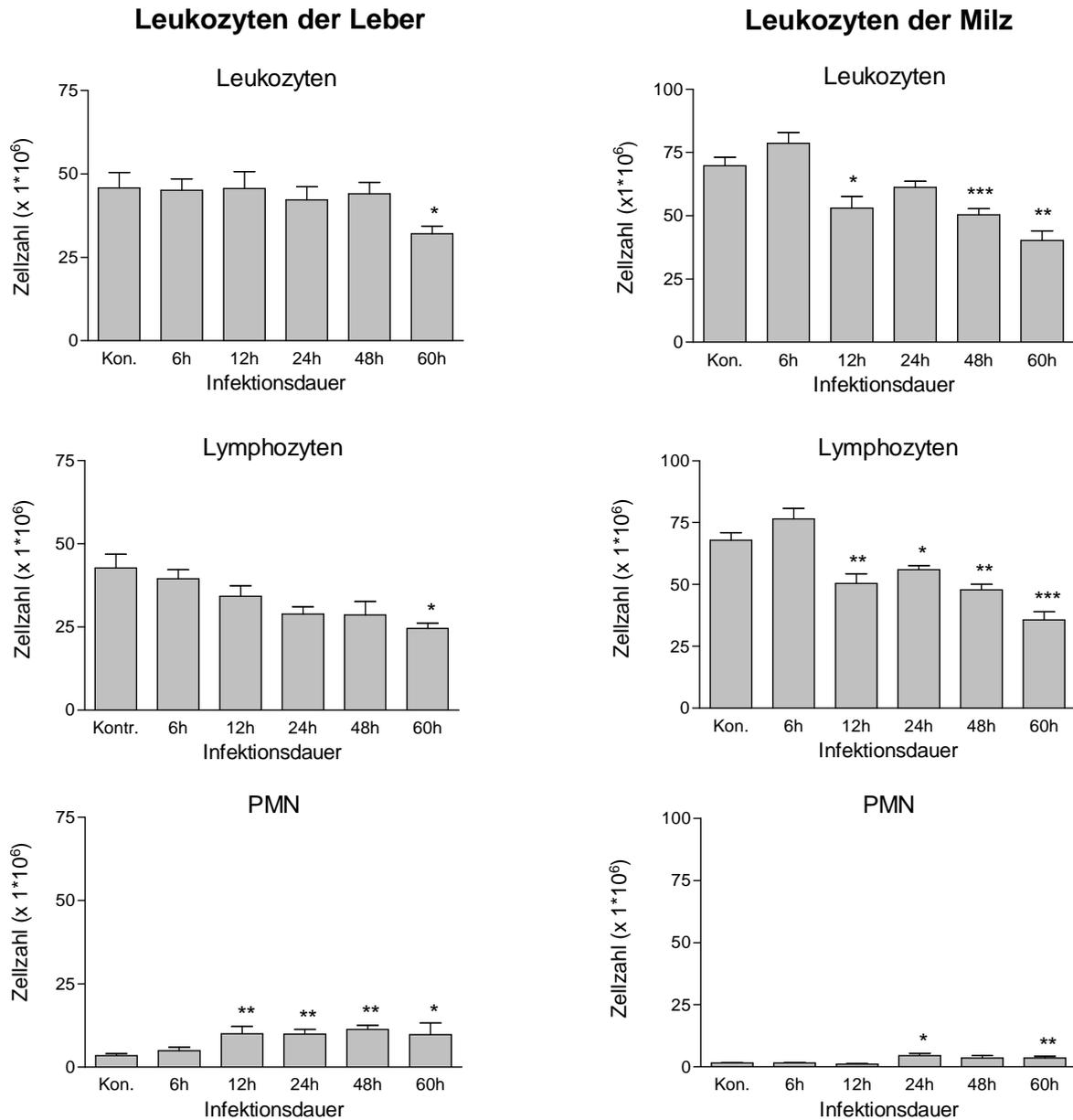


Abb. 12: Absolutzellzahl der Leukozyten, Lymphozyten und Granulozyten (PMN) in der Leber und in der Milz im Verlauf der Infektion.

Die schwere Lymphopenie im Blut war ähnlich wie in der Lunge durch den selektiven Verlust der B- Zellen bedingt. Bereits nach 48 Stunden ließ sich eine Reduktion der B- Zellen um mehr als 90% nachweisen (Abb. 13A). Zudem kam es im Blut auch zu einer deutlichen Reduktion aller anderen Lymphozytensubpopulationen. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der T- Lymphozyten um fast 80% (Abb. 13D). Dieser Abfall war zum einen ähnlich wie in der Lunge durch den Abfall der $CD4^+$ -T- Lymphozyten bedingt, und zum anderen durch den deutlichen Verlust an $CD8^+$ -T- Lymphozyten (Abb. 13E/F).

Auch die Zahl der NK- und NKT- Zellen fiel im Blut im Verlauf der Infektion deutlich ab (Abb. 13B/C).

Lymphozyten- Subpopulationen im Blut

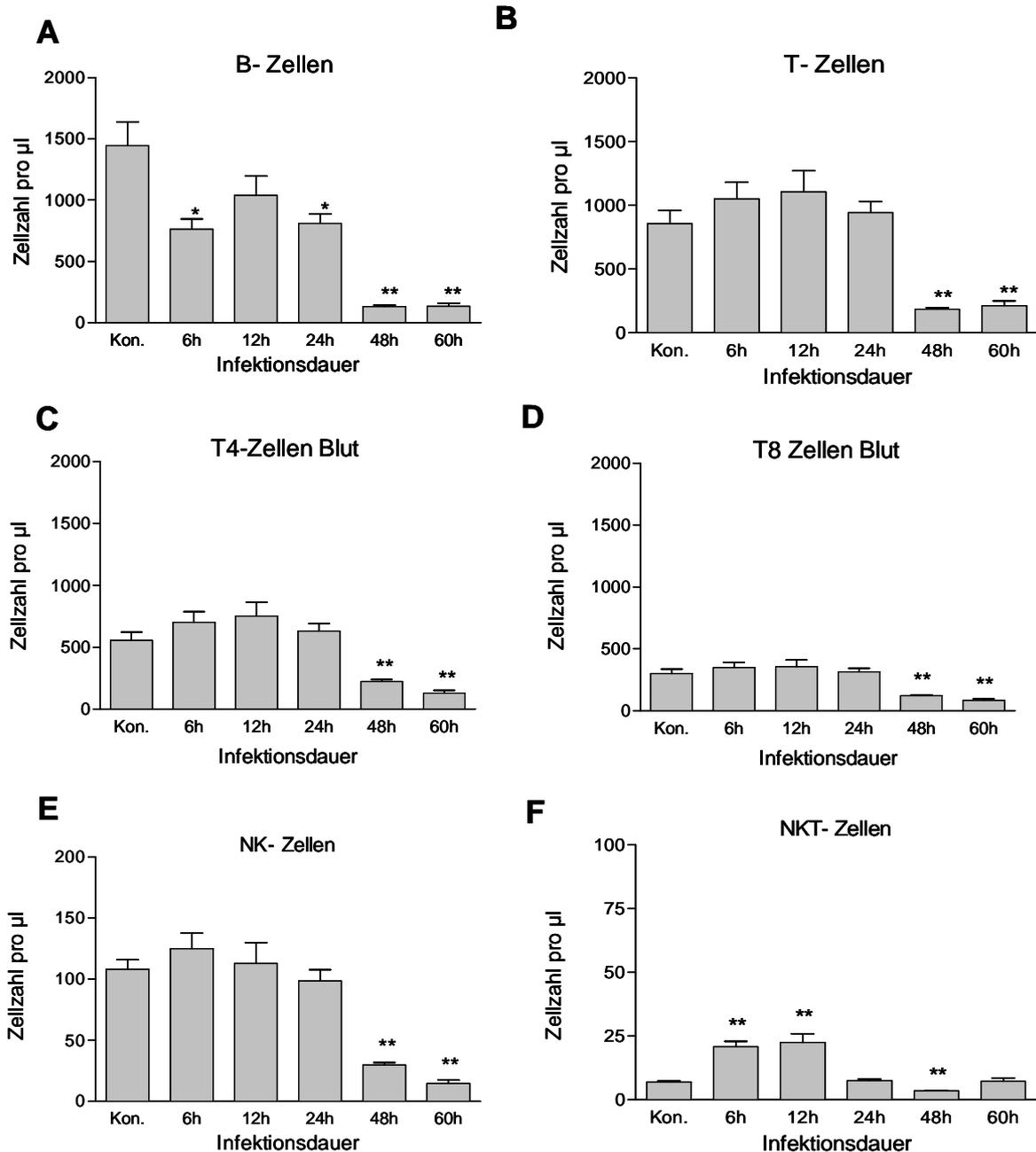


Abb. 13: Lymphozyten- Subpopulation im Blut, dargestellt als Zellzahl pro μl

Dieser selektive Verlust von B- und CD4^+ -T- Lymphozyten war auch in der Leber und Milz zu beobachten. In der Milz zeigte sich ähnlich wie im Blut eine Abnahme der NK- und NKT- Zellen. In der Leber hingegen blieb die Anzahl der NK- Zellen im Verlauf

konstant und die Zahl der NKT- Zellen nahm ähnlich wie in der Lunge signifikant zu (Tab. 4).

	Kontrolle	6h	12h	24h	48h	60h
Leber						
B- Lymphozyten	13,9 ±1,69	13,7 ±1,66	11,6 ±1,43	8,3 ±1,02*	3,1 ±0,76**	2,9 ±1,21**
T- Lymphozyten	13,3 ±1,64	13,2 ±0,59	9,2 ±1,09	7,5 ±0,44**	5,7 ±0,76**	7,3 ±1,18*
CD4 ⁺ -Lymphozyten	8,3 ±0,94	8,6 ±0,44	5,8 ±0,56*	4,8 ±0,32**	3,0 ±0,40**	3,9 ±0,76*
CD8 ⁺ -Lymphozyten	6,7 ±0,42	4,6 ±0,62*	3,4 ±0,61**	3,3 ±0,58**	2,7 ±0,39**	3,3 ±0,70*
NK- Zellen	4,9 ±0,68	5,1 ±0,71	4,1 ±0,64	4,1 ±0,15	4,7 ±0,52	3,8 ±0,53
NKT- Zellen	6,9 ±0,79	7,4 ±1,43	8,7 ±1,06	9,8 ±2,03	13,3 ±1,99*	9,9 ±1,10
Milz						
B- Lymphozyten	32,8 ±2,58	39,8 ±3,14	25,1 ±2,99	28,7 ±2,01	25,3 ±2,04*	18,6 ±2,99*
T- Lymphozyten	28,8 ±1,82	30,7 ±2,51	20,8 ±5,57*	22,4 ±2,14*	19,2 ±1,79**	17,6 ±1,71**
CD4 ⁺ -Lymphozyten	25,1 ±1,81	22,3 ±1,48	15,9 ±2,33*	16,5 ±1,70**	13,2 ±1,29***	10,1 ±1,95**
CD8 ⁺ -Lymphozyten	8,4 ±1,17	8,4 ±1,60	5,9 ±0,74	5,6 ±0,49	6,0 ±0,69	7,5 ±1,13
NK- Zellen	5,3 ±1,03	4,2 ±0,36	4,1 ±0,52	4,1 ±0,48	2,8 ±0,20	1,9 ±0,41
NKT- Zellen	1,6 ±0,30	1,1 ±0,27	1,1 ±0,31	1,0 ±0,19	0,9 ±0,12	0,8 ±0,16

Tab. 4: Absolutzellzahl [$\cdot 10^6$] der Lymphozytensubpopulationen in der Leber und Milz. Angegeben ist der Mean \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3.4 Aktivierungsstatus der Lymphozytenpopulationen im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie

Die NK- und NKT-Zellen wurden nicht nur in die Lunge rekrutiert, sondern auch aktiviert. Ein früher Marker für die Aktivierung von Zellen ist CD69, dessen Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert wurde. Die NK- Zellen wiesen bereits nach 24 Stunden eine signifikante Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von CD69 auf (Abb. 14 A). Die NKT- Zellen zeigten im Vergleich zu den NK- Zellen eine noch schnellere Aktivierung. Bereits nach 6 Stunden ließ sich eine signifikante Zunahme der mittleren Fluoreszenzintensität feststellen, die auch im weiteren Verlauf kontinuierlich zunahm (Abb. 14B). Auch die CD4⁺- und CD8⁺-T- Lymphozyten wiesen eine signifikante Aktivierung auf, die bereits nach 24 Stunden begann (Abb. 14 C, D).

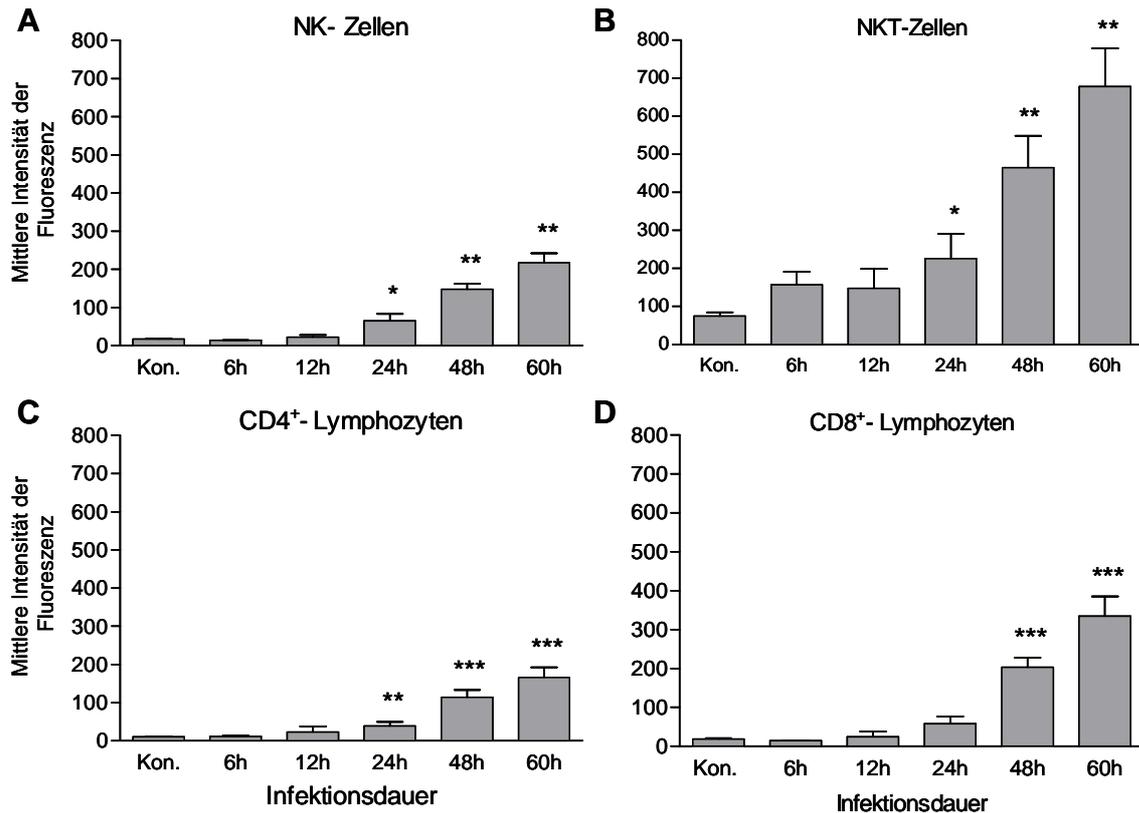


Abb. 14: Expression von CD69 auf den NK- und NKT- Zellen sowie auf den CD4⁺ und CD8⁺-T- Lymphozyten in der Lunge; dargestellt ist CD69 als mittlere Intensität der Fluoreszenz zu den einzelnen Zeitpunkten der Infektion im Vergleich zur Kontrolle ohne Infektion (Kon.).

Neben der massiven Aktivierung der T- Lymphozyten, der NK- und NKT- Zellen steigerten diese Lymphozytensubpopulationen auch signifikant ihre Produktion an TNF α und IFN γ . In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass die NK- und NKT- Zellen bereits nach 6 Stunden ihre TNF α - Produktion steigerten. Im Verlauf steigerten sowohl NK- und NKT- Zellen kontinuierlich ihre Produktion an TNF α , und nach 60 Stunden hatten die NK- Zellen diese im Vergleich zum Basalwert vervierfacht und die NKT- Zellen verdreifacht (Abb. 15). Die CD4⁺- und CD8⁺-T- Lymphozyten in der Lunge wiesen ebenfalls eine Zunahme der TNF α - Produktion auf, die nach 48 Stunden bei den CD8⁺-T- Lymphozyten und nach 60 Stunden auch bei den CD4⁺-T- Lymphozyten signifikant war (Abb. 15). Auch die IFN γ - Produktion nahm im Verlauf der Infektion zu. Es zeigte sich eine basale IFN γ - Produktion durch die NK- und die NKT- Zellen. Im Verlauf der Infektion fand sich bei den NK- Zellen der Lunge eine deutliche Zunahme der IFN γ - Produktion, die sich 48 Stunden nach Infektion verdreifacht hatte. Die NKT- Zellen der Lunge vervierfachten die IFN γ - Produktion innerhalb von 48 Stunden nach der transnasalen Infektion. Auch bei den CD4⁺-T- Lymphozyten kam es zu einer

leichten, 60 Stunden nach Infektion signifikanten Zunahme der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion. Die CD8^+ -T-Lymphozyten erhöhten ihre Produktion nicht signifikant im Verlauf der Infektion (Abb. 15).

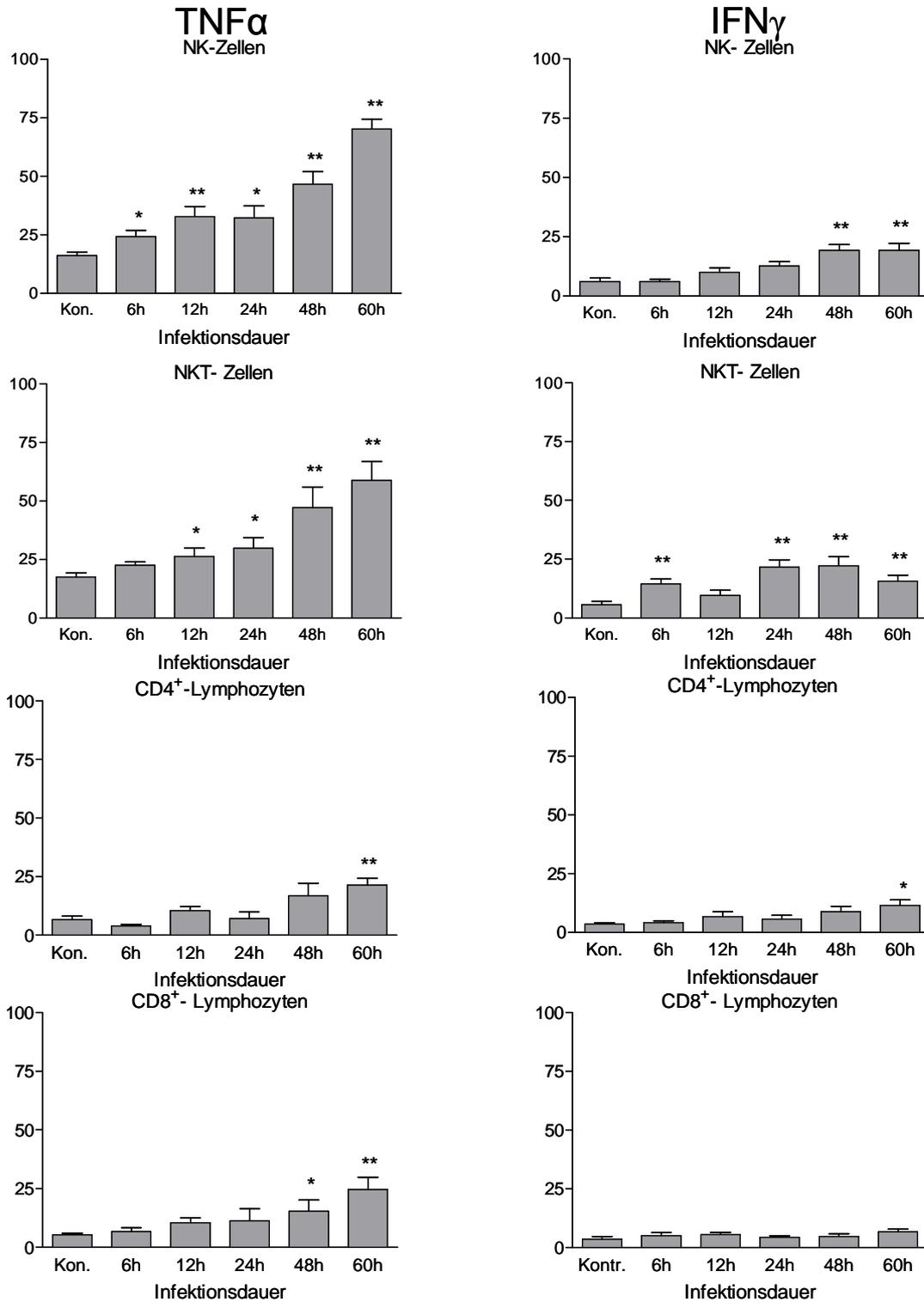


Abb. 15: Anteil der $\text{TNF}\alpha$ -produzierenden (linke Spalte) und Anteil der $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden (rechte Spalte) NK- und NKT-Zellen und der CD4^+ und CD8^+ -T-Zellen in der Lunge.

Neben der zunehmenden Aktivierung und Zytokinproduktion der pulmonalen Lymphozyten ließ sich mit dem Beginn der Bakteriämie ebenfalls im Blut eine deutliche Aktivitätssteigerung der Lymphozyten nachweisen. Nach 48 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Expression von CD69 auf den NK- Zellen (Abb. 16). Auch in der Leber ließ sich zeitgleich mit dem Auftreten der Bakteriämie nach 48 Stunden eine signifikante Zunahme der Expression von CD69 auf den NK- /NKT- Zellen nachweisen (Abb. 17).

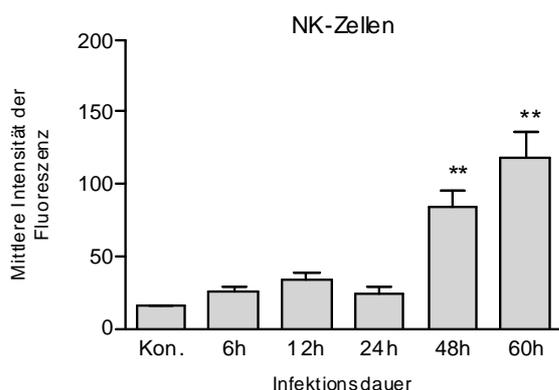


Abb. 16: Expression von CD69 auf den NK- Zellen im Blut; dargestellt ist die mittlere Intensität der Fluoreszenz.

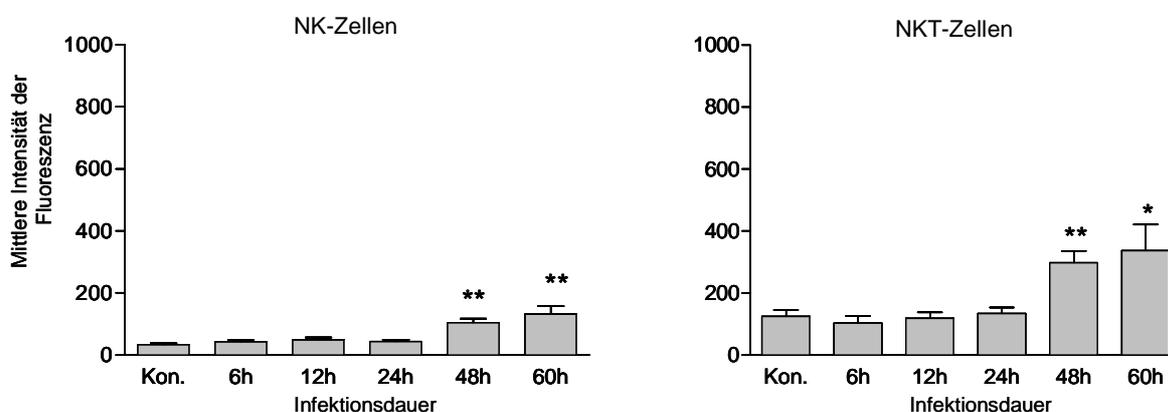


Abb. 17: Expression von CD69 auf den NK- und NKT- Zellen in der Leber; dargestellt ist die mittlere Intensität der Fluoreszenz.

3.5 Bedeutung der NK- und NKT- Zellen für den Verlauf der Infektion

Im Verlauf der Pneumonie wurden sowohl die NK- als auch die NKT- Zellen in die Lunge rekrutiert. Die vorangehenden Ergebnisse zeigten zudem, dass NK- und NKT- Zellen bereits im frühen Verlauf aktiviert waren und zudem signifikant ihre Produktion an proinflammatorischen Zytokinen steigerten. Mit Auftreten der Bakteriämie wiesen auch

die NK- und NKT- Zellen in Blut, Leber und Milz eine starke Aktivierung auf. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Beteiligung der NK- und NKT- Zellen an der frühen unspezifischen Abwehr gegenüber Pneumokokken hin. Im Folgenden sollte der Einfluss der NK- und NKT- Zellen auf den Verlauf der Pneumonie mit pneumogener Sepsis untersucht werden.

Dazu wurden zunächst Tiere mit polyklonalem Asialo- GM- Antikörper behandelt. Wie in Abb. 18 dargestellt ist, führte eine zweimalige Injektion des Antikörpers im 24-stündigen Abstand zum Verlust der NK- Zellen, nicht jedoch der NKT- Zellen. Einer Kontrollgruppe wurde steriles PBS und einer weiteren Kontrollgruppe wurde polyklonales Kaninchenserum injiziert. Sowohl die depletierten Tiere, als auch die beiden Kontrollgruppen wurden gleichzeitig mit einer Dosis von $1 \cdot 10^5$ CFU infiziert, die in etwa der LD50- Infektionsdosis entspricht.

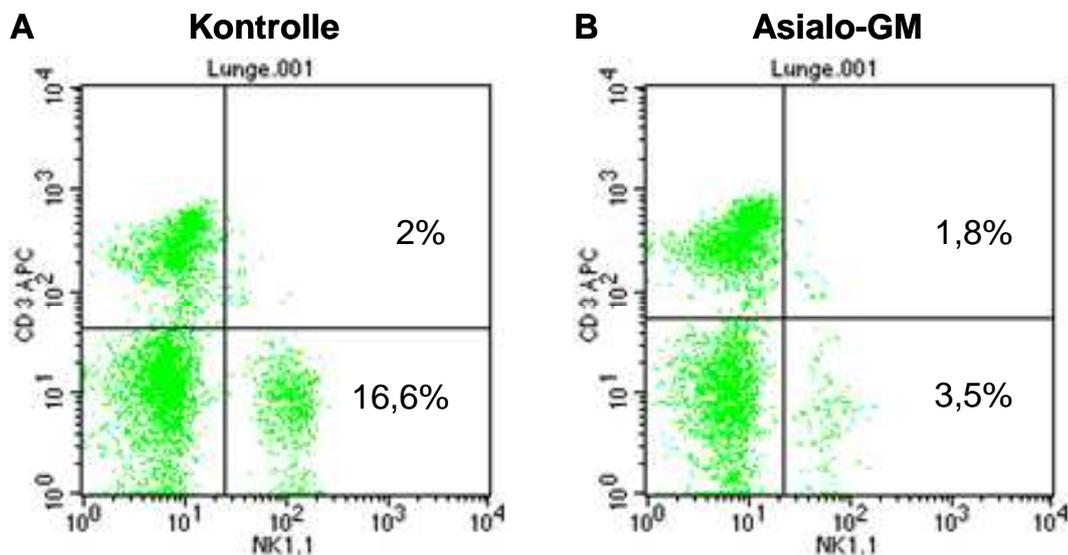


Abb. 18: Dargestellt sind die Lymphozyten der Lunge vom Kontrolltier (A) und im Vergleich dazu das mit Asialo-GM depletierte Tier (B), Dot-plot- Diagramme zeigen im rechten, oberen Quadranten den prozentualen Anteil der CD3+NK1.1+ NKT-Zellen und im rechten, unteren Quadranten die CD3-NK1.1+ NK-Zellen.

In der PBS- Kontrollgruppe wurden die Tiere schwer krank und nach 96 Stunden waren bereits mehr als 80% der Tiere verstorben. Die NK-Zelldepletion mit Asialo-GM- Antikörper führte zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität. Jedoch führte das Kaninchenserum in der Kontrollgruppe zu einer ähnlichen, wenngleich nicht signifikanten ($p=0,052$) Reduktion der Mortalität (Abb 19).

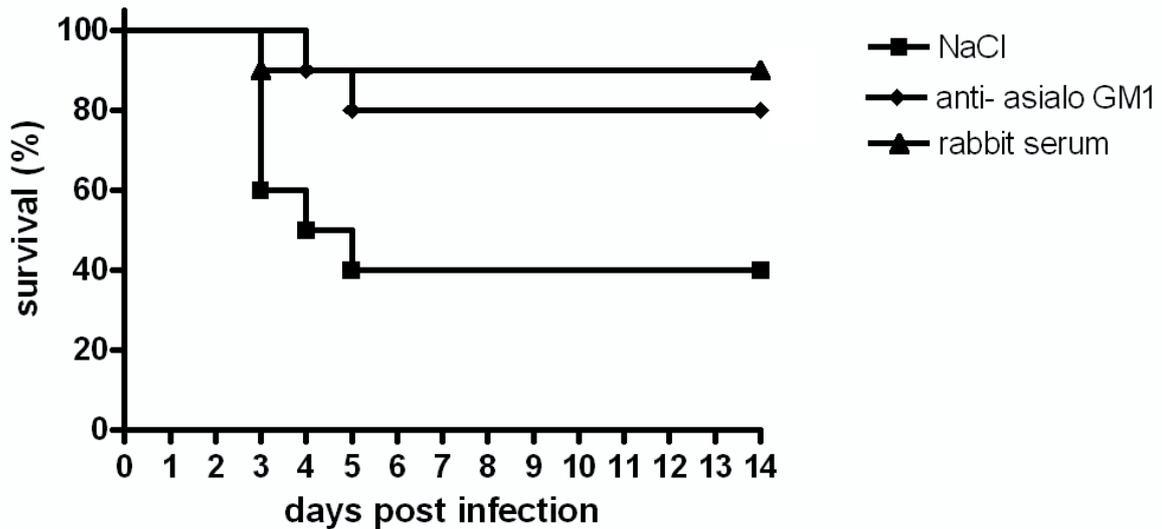


Abb. 19: Überlebensrate nach Infektion mit $1,5 \times 10^5$ CFU *S. pneumoniae* und Behandlung mit Asialo-GM1- AK, NaCl oder Kaninchenserum. 10 Tiere pro Gruppe. Behandlung mit Asialo- GM1-AK im Vergleich zu NaCl-Gruppe $p=0,052$; Behandlung mit Kaninchenserum im Vergleich zu NaCl-Gruppe $p=0,023$. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank- Test verglichen.

Zum anderen wurde ein Anti- NK1.1- Antikörper verwendet, der nach zweimaliger Injektion im Abstand von 24 Stunden zu einem fast vollständigen Verlust sowohl der NK- als auch der NKT- Zellen führte (Abb. 20). Diese Tiere wurden ebenso mit 1×10^5 CFU *S. pneumoniae* infiziert, die in etwa der LD50- Dosis entspricht. Jedoch zeigte sich in den Überlebensraten kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur PBS- Kontrollgruppe.

Im Verlauf der schweren Pneumonie wurden sowohl die NK-, als auch NKT- Zellen aktiviert und steigerten signifikant die Produktion von proinflammatorische Zytokinen, so dass sie vermutlich im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr von Bedeutung sind. Die differenzielle Depletion einzelner oder mehrerer Populationen dieser Zellen mittels unterschiedlicher neutralisierender Antikörper führte jedoch zu inkonsistenten Ergebnissen hinsichtlich des Infektionsverlaufs.

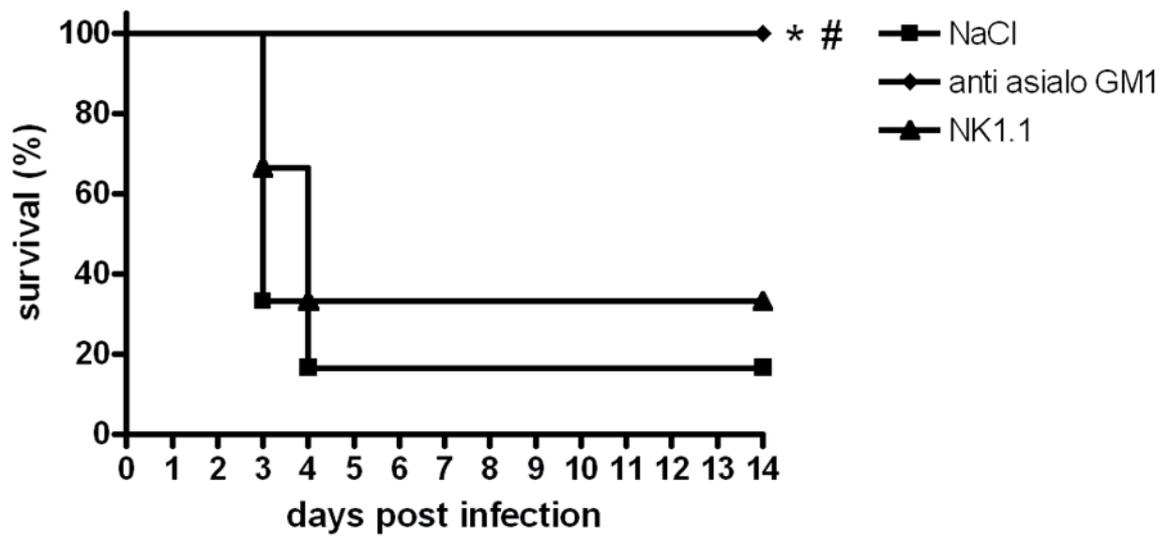


Abb. 20: Überlebensrate nach Infektion mit 1×10^5 CFU *S. pneumoniae* und Behandlung mit Asialo-GM1-AK, Anti-NK1.1-AK oder NaCl. 6 Tiere pro Gruppe. * $p=0,004$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. # $p=0,019$ im Vergleich zu der mit Anti-NK1.1- behandelten Gruppe. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rank- Test verglichen.

4 Diskussion

4.1 Pneumokokkenpneumonie der Maus

Die ambulant erworbene Pneumonie ist die häufigste Infektionskrankheit, und der häufigste Erreger ist *S. pneumoniae*. Insbesondere die bakteriämisch verlaufende schwere Pneumonie kann mit respiratorischer Insuffizienz, Sepsis und Multiorganversagen assoziiert sein und ist mit einer hohen Letalität verbunden [8]. *S. pneumoniae* ist für 2/3 aller bakteriämisch verlaufenden Pneumonien verantwortlich [5,6].

Für die vorliegende Arbeit wurden Mäuse mit einem sehr virulenten *S. pneumoniae*-Stamm vom Serotyp 3 (Pn36) infiziert, der beim Menschen für einen Großteil der schweren, invasiven Verläufe der Pneumonie verantwortlich ist [12,13,14]. Auch bei der C57Bl/6- Maus führte dieser Pneumokokkenstamm zu einer schweren Pneumonie. Bereits nach 24 Stunden wiesen die Tiere deutliche klinische Symptome auf, einschließlich Gewichtsverlust, Bewegungsarmut, Piloerektion und Dyspnoe. Gleichzeitig war eine zunehmende Erregerlast in der Lunge nachweisbar. Zudem zeigte sich nach transnasaler Pneumokokkeninfektion als ein charakteristisches Merkmal für eine Pneumonie ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen in die Lunge. Diese Beobachtungen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen bei der Untersuchung von Pneumokokken- Pneumoniemodellen der Maus gemacht [31, 47,70]. Verbunden mit dem Einstrom von neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen in die Lunge ließen sich in diesem Mausmodell ähnlich wie bei der humanen Pneumonie histologisch massive Infiltrate in der Lunge nachweisen. Wie in anderen Arbeiten [31, 70] vorbeschrieben, zeigten sich auch in diesem Pneumokokken- Pneumoniemodell die Leukozytenansammlungen vor allem peribronchial und perivaskulär.

Ausgeprägte Infiltrate sind beim Menschen assoziiert mit einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Abfall der dynamischen Compliance und des Oxygenierungsindex im Verlauf der Pneumonie [71]. Die Mäuse wiesen einen Abfall des Oxygenierungsindex auf im Mittel 311 mmHg bei Beatmung mit 100% Sauerstoff auf. Es erfüllten 2 von 6 Mäusen die

Kriterien des humanen akuten Lungenversagens (ALI; Acute Lung Injury) mit einer p_aO_2/FiO_2 -Ratio von < 300 .

Ferner wiesen die Tiere eine nach 24 Stunden beginnende Bakteriämie auf. Von einer Sepsis spricht man, wenn neben einer Infektion auch eine systemische Entzündungsantwort (SIRS) nachweisbar ist. Beim Menschen zählen zu den Kriterien des SIRS: Körpertemperatur höher als $38^\circ C$ oder niedriger als $36^\circ C$, Herzfrequenz über 90/min, Atemfrequenz größer als 20/min oder pCO_2 niedriger als 32mmHg, Leukozytenzahl größer als 12.000/ μl oder niedriger als 4000/ μl [72]. Mindestens zwei der genannten Kriterien müssen erfüllt sein. Zwar existiert keine Definition für die murine Sepsis, aber die Tiere wiesen einen deutlichen Blutdruckabfall als Zeichen der hämodynamischen Veränderung, eine schwere Leukozytopenie, und mit dem Anstieg des Laktatspiegels auch Zeichen einer peripheren Minderperfusion auf. Diese Veränderungen und die nachgewiesene Bakteriämie sprechen dafür, dass die Pneumokokkenpneumonie zur schweren Sepsis führte.

Zusammengefasst führte die Infektion der Mäuse zu ausgeprägten pulmonalen Infiltraten, respiratorischer Insuffizienz, Bakteriämie und Sepsis mit beginnendem Kreislaufversagen. Das für die vorliegende Arbeit etablierte Maus- Pneumokokken-Pneumoniemodell spiegelte somit hinsichtlich wesentlicher Charakteristika den Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie des Menschen mit Sepsis wieder.

Neben den klinischen Zeichen der schweren Pneumonie ließ sich auch eine starke inflammatorische Reaktion nachweisen. Für eine schnelle Eradikation der invadierenden Erreger ist eine effektive Induktion der Immunabwehr notwendig. Hierfür entscheidend ist das Zusammenspiel von aktivierenden und chemotaktischen Zytokinen, welches zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen führt. Insbesondere Zytokine wie $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, G-CSF, IL-10, IL-6 und IL-1 β spielen eine wichtige Rolle in der unspezifischen Immunabwehr [21, 73]. In dieser Arbeit zeigte sich parallel zu den klinischen Zeichen der Pneumonie eine starke inflammatorische Abwehrreaktion in der Lunge. Insbesondere G-CSF und IL-6 waren bereits 6 Stunden nach der Infektion erhöht. Im weiteren Verlauf wurden auch IL-1 β , $TNF-\alpha$ und $IFN-\gamma$ signifikant vermehrt in der Lunge exprimiert. Auch Bergeron et al. konnten bei Mäusen im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie eine vermehrte Produktion von $TNF-\alpha$, IL-1 β und IL-6 in der Lunge und in der BAL beobachten [70]. Beim Menschen ließ sich

ebenfalls in der BAL im Rahmen einer Pneumonie eine vermehrte Expression von TNF- α , IL-6 und IL-1 β nachweisen [74].

Zeitgleich mit dem Auftreten der klinischen Zeichen einer Sepsis war ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokinen im Serum nachweisbar. Insbesondere die Serumkonzentrationen von TNF- α , IFN- γ , G-CSF und IL-6 waren nach 48 Stunden um ein Vielfaches im Vergleich zum Ausgangswert angestiegen. Im Serum war somit eine massive systemische inflammatorische Reaktion im Sinne eines SIRS nachweisbar. Diese massive systemische Zytokinproduktion im Rahmen einer Sepsis charakterisiert die hyperinflammatorische Phase, die häufig mit einer antiinflammatorischen Gegenregulation verbunden und von einer kompensatorischen antiinflammatorischen Antwort (Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome, 'CARS') gefolgt ist. Auch in dieser Arbeit zeigte sich sowohl in der Lunge als auch systemisch eine vermehrte Expression von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin.

In einigen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Serumkonzentrationen von IL-6, G-CSF und IL-10 mit dem Schweregrad der Pneumonie korrelierten [75, 76]. In diesem Mausmodell wiesen insbesondere diese Zytokine eine exponentielle Zunahme nach 48 Stunden im Vergleich zum 24-Stunden-Wert auf. Sowohl im Serum, als auch in der Lunge korrelierten diese Zytokine somit zeitlich mit dem Auftreten der schweren Sepsis.

4.2 Charakterisierung der Leukozytenkinetik und -aktivierung bei der Pneumokokkenpneumonie

Entsprechend den Infiltraten in der histologischen Analyse und der starken Zytokinproduktion kam es im Verlauf der Pneumonie zu einem Einstrom von Leukozyten in die Lunge. Eine zentrale Rolle bei der Eradikation der Bakterien spielen die phagozytierenden Zellen, wie die in der Lunge residenten Makrophagen und die im Verlauf der Infektion in die Lunge einströmenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten [18]. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie eine signifikante Zunahme der neutrophilen Granulozyten und mononukleären Zellen. Diese Veränderungen sind auch in anderen Pneumokokken-Pneumoniemodellen beobachtet worden [31, 70], und auch beim Menschen zeigte sich in der BAL (bronchoalveoläre Lavage) ein Einstrom von PMN und monozytären Zellen bei gleichbleibender Lymphozytenzahl [74].

Kadioglu et al. konnten jedoch zeigen, dass es bei der Pneumokokkenpneumonie trotz gleichbleibender Lymphozytenzahl in der frühen Phase der Infektion zu einer Ansammlung der T- Lymphozyten in den peribronchialen und perivaskulären Infiltrationen kommt [31]. Diese Ansammlung von Lymphozyten in den Infiltrationen spricht für eine Beteiligung der Lymphozyten an der unspezifischen Immunabwehr. Daher sollte in dieser Arbeit vor allem die Rolle der Lymphozyten im Rahmen der unspezifischen Abwehr näher untersucht werden.

Die Gesamtlymphozytenzahl blieb zunächst im Verlauf der Infektion konstant, und 48 Stunden nach Infektion zeigte sich eine Abnahme der Lymphozyten. Diese war vorrangig bedingt durch den Verlust an B- und CD4⁺-T- Lymphozyten. Die Zahl der CD8⁺-T- Lymphozyten und der $\gamma\delta$ -T- Zellen hingegen blieb konstant. Die NK- Zellen nahmen im Verlauf der Infektion tendenziell zu, während die Zunahme der NKT- Zellen signifikant war. Zeitgleich zu dieser Arbeit beschrieben Kawakami et al., dass während einer Pneumokokkenpneumonie NK- und NKT- Zellen in die Lunge rekrutiert werden [78]. Die Zunahme der NK- und NKT- Zellen spricht für eine Beteiligung dieser beiden Lymphozytensubpopulationen an der unspezifischen Immunabwehr gegenüber Pneumokokken. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nicht nur in der Lunge, sondern auch in der Leber während der systemischen Infektion zum Einstrom von NKT- Zellen kommt. Speziell die NKT- Zellen könnten folglich an der unspezifischen Abwehr beteiligt sein. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Funktion der NK- und NKT- Zellen im Rahmen der unspezifischen Abwehr bei Pneumokokkenpneumonie näher zu betrachten.

Hocke et al. konnten im selben Modell der Pneumokokkenpneumonie zeigen, dass es im Verlauf der Pneumonie zu einer vermehrten Expression von IL-15 in der Lunge kommt [32]. Insbesondere IL-15 ist verantwortlich für die Reifung und Proliferation, sowie die Induktion der Zytokinproduktion der NK- und NKT- Zellen [33, 26]. Der Einstrom der NK- und NKT- Zellen in die Lunge könnte assoziiert sein mit der vermehrten Expression von IL-15. Es konnte gezeigt werden, dass IL15- KO-Mäuse und IL15-R α -KO-Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl von NK- und NKT- Zellen besitzen [33].

Die Migration der NK- und NKT- Zellen wird auch durch eine Vielzahl von Chemokinen reguliert, zu denen die in der aktuellen Arbeit im Verlauf der Pneumonie vermehrt exprimierte Chemokine MCP-1, MIP-1 α , IP-10 und Mig gehören [78, 79, 80, 81, 82].

4.3 Charakterisierung der inflammatorischen Reaktion der NK- und NKT- Zellen im Verlauf der Pneumokokkeninfektion

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die NK- Zellen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von Viren und intrazellulären Bakterien spielen [22, 54, 55]. Hinsichtlich der Abwehr extrazellulärer Bakterien ist lediglich bekannt, dass die NK- Zellen bei der Abwehr von *Bordetella pertussis* [56] eine wichtige Funktion haben. Godshall et al. konnten zeigen, dass im Rahmen einer septischen Peritonitis das Fehlen der NK- Zellen mit einer deutlich verminderten bakteriellen Clearance assoziiert war [57].

Hinsichtlich der Bedeutung der NKT- Zellen bei der Abwehr von Bakterien wurden widersprüchliche Beobachtungen gemacht. Es zeigte sich, dass die NKT- Zellen bei der Abwehr von *Mycobacterium tuberculosis* [64], *Salmonella choleraesuis* [65] und *Listeria monocytogenes* [66] keinen oder einen negativen Einfluss auf den Verlauf haben. Nieuwenhuis et al. zeigten hingegen die protektive Funktion der NKT- Zellen im Rahmen einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*. Unter Verwendung von CD1d-Knockout- Mäusen, die keine NKT- Zellen besaßen, beobachteten sie eine deutliche Behinderung der bakteriellen Clearance bei der Pseudomonas- Infektion [67].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einstrom von NK- und NKT- Zellen in die Lunge im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie beobachtet. Die NK-Zellen und NKT- Zellen wurden nicht nur in die Lunge rekrutiert, sondern sie waren auch bereits 24 Stunden nach Infektion signifikant aktiviert. Zudem steigerten sowohl NK-, als auch NKT-Zellen signifikant die Synthese von IFN- γ und TNF- α im Verlauf der Infektion.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass TNF- α zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das pulmonale Kompartiment beiträgt [52,53]. Die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten ist entscheidend für eine schnelle und effiziente Eradikation der Bakterien.

Kawakami et al. konnten zeigen, dass die NKT- Zellen wichtige Produzenten von TNF- α bei der Pneumokokkenpneumonie sind und die Abwesenheit der NKT- Zellen ging mit einem verminderten Einstrom der neutrophilen Granulozyten einher [78]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die NKT- sondern auch die NK- Zellen bereits in der frühen Phase signifikant zur gesteigerten TNF- α - Produktion beitragen.

Auch IFN- γ führt zu einer Aktivierung der Makrophagen und zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und verbessert somit ebenfalls die bakterielle Clearance [44,46]. Es trägt ferner zur Induktion der T_H1- Antwort bei. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass auch im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie die NK- und NKT- Zellen ihre IFN γ - Produktion im pulmonalen Kompartiment signifikant steigerten. Auch bei Legionellen- Pneumonie konnte gezeigt werden, dass NK- und NKT- Zellen besonders wichtige Produzenten von IFN- γ sind [44, 68]. Verschiedene Arbeiten deuten darauf hin, dass die durch IFN γ bedingte Induktion der T_H1- Immunantwort für die effektive Abwehr einer Pneumokokkeninfektion von besonderer Wichtigkeit ist. So zeigten Haraguchi et al., dass IL-12- defiziente Patienten besonders schwere Verläufe der Pneumokokkeninfektion aufweisen, bedingt durch die verminderte Produktion von IFN γ und die damit verbundene verminderte Induktion der T_H1- Antwort [83]. Ferner konnten Rubins et al zeigen, dass das Fehlen von IFN γ bei einer pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* mit einer höheren Mortalität einhergeht [47].

4.4 Funktionelle Bedeutung der NK- und NKT- Zellen im Verlauf der Pneumokokken- Infektion

Über die Rekrutierung und Aktivierung der NK- und NKT-Zellen hinaus ist insbesondere ihre funktionelle Bedeutung bei Pneumokokken- Pneumonie unbekannt. Zur Analyse der Funktion der NK- Zellen wurde mittels eines polyklonalen Asialo- GM- Antikörpers versucht, diese Subpopulation zu eliminieren. Das Fehlen der NK- Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität im Vergleich zur Kontrollgruppe, die mit PBS behandelt wurde. Da es sich bei Asialo-GM- Antikörper um einen polyklonalen Antikörper handelt, wurde eine weitere Kontrollgruppe mit einem polyklonalen Immunglobulin vom Kaninchen behandelt. Die Mortalität in der mit unspezifischem Immunglobulin behandelten Gruppe sank ebenfalls deutlich. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Mortalitätsverbesserung nach Applikation des Asialo-GM- Antikörpers nicht Ausdruck der spezifischen NK-Zell-Depletion war, sondern eher unspezifischer oder unbekannter anderer Ursache. Die Mortalität könnte im vorliegenden Fall beispielsweise durch Transfusion von IgM positiv beeinflusst worden sein. Fabrizio et al. konnten zeigen, dass durch die Gabe von IgM die Mortalität bei einer

Pneumokokkeninfektion deutlich gesenkt wird [84]. In den Arbeiten von Carsetti et al. [85,86,87] konnte ferner die Bedeutung von IgM-Memory-Zellen im Rahmen der Immunabwehr gegenüber Pneumokokken gezeigt werden. IgM-Memory-Zellen sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung eines IgM- Serumspiegels, der zur Abwehr von bekapselten Bakterien unabdingbar ist.

Zeitgleich mit der Anfertigung dieser Arbeit konnten Kerr et al. in einem Maus-Pneumokokken- Pneumoniemodell (Pneumokokken vom Serotyp 2 und BALB/c-Mäuse) zeigen, dass die Depletion der NK-Zellen bei SCID-Mäusen (Severe combined Immunodeficiency) mit einer deutlich reduzierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und einer geringeren Bakteriämie einherging [88]. Zur Depletion wurde ebenso wie in der vorliegenden Arbeit der polyklonale Asialo-GM- Antikörper verwendet. Als Kontrolle haben Kerr et al. jedoch rabbit-IgG verwendet. Allerdings enthält der polyklonale Asialo-GM- Antikörper neben IgG auch IgA und IgM.

Zusammengefasst scheint die NK-Zelldepletion mit Asialo-GM ein ungeeignetes Verfahren zu sein, um die Rolle von NK-Zellen im Rahmen der Pneumokokkeninfektion exakt zu analysieren. Hierfür sind weiterführende Untersuchungen mit beispielsweise NK-defizienten transgenen Mäusen erforderlich. Bisher ist es nicht gelungen, eine NK-defiziente transgene Maus zu entwickeln, die nicht noch einen zusätzlichen Immundefekt aufwies [49]. Aufgrund der zusätzlichen Immundefekte ist die Verwendung dieser Tiere für Infektionsmodelle problematisch. Daher konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine abschließende Klärung der funktionellen Bedeutung der NK-Zellen für die unspezifische pulmonale Abwehr erfolgen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit ein Anti-NK1.1- Antikörper verwendet, der sowohl die NK- als auch die NKT-Zellen depletiert. Die Funktionalität des Antikörpers konnte auch in früheren Arbeiten belegt werden [89, 90]. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Depletion der NK- und NKT-Zellen die durch *Pseudomonas aeruginosa*-Exotoxin A induzierte Hepatotoxizität deutlich gesenkt wurde [90]. Bei der Pneumokokkenpneumonie führte die Depletion dieser beiden Lymphozytensubpopulationen zu keinem signifikanten Unterschied in der Mortalität. Etogo et al. konnten ebenso zeigen, dass die Depletion mit Anti-NK1.1- Antikörpern bei Mäusen im Rahmen eines septischen Schocks durch Zökumligatur und Punktion (CLP) zu keinem Unterschied in der Mortalität geführt hat. Jedoch zeigte sich eine Reduktion der Mortalität nach Depletion der NK- und NKT- Zellen, wenn zeitgleich eine

Antibiotikatherapie mit Imipenem erfolgte, [28]. Möglicherweise würde sich auch bei der Pneumokokkenpneumonie unter Antibiotikatherapie ein Unterschied zeigen. Zudem werden durch die Depletion mit Anti-NK1.1- Antikörper sowohl NK-Zellen als auch variante und invariante NKT-Zellen depletiert. Möglicherweise gibt es zwischen den einzelnen Subpopulationen funktionelle Unterschiede.

Bei Abschluss dieser Arbeit konnten Kawakami et al. zeigen, dass die $V\alpha 14^+$ - NKT-Zellen im Rahmen der Pneumokokkenpneumonie eine protektive Funktion haben [78]. Es wurden $J\alpha 281$ -KO- Tieren verwendet, denen die größte Subpopulation der NKT-Zellen fehlt, die invarianten $V\alpha 14^+$ - NKT- Zellen. Das Fehlen der $V\alpha 14^+$ - NKT- Zellen ging mit einer deutlich erhöhten Mortalität einher. Zudem ließ sich ein deutlich reduzierter Neutrophileninflux in die Lunge nachweisen. Offenbar haben die invarianten NKT-Zellen einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie.

Der T-Zell-Rezeptor dieser sogenannten invarianten NKT-Zellen verfügt über eine invariante $V\alpha$ - Kette bestehend aus $V\alpha 14$ und $J\alpha 281$ Gensegmenten und einer β -Kette (meist $V\beta 8.2$). Die kleinere Subpopulation der varianten NKT-Zellen verfügt über eine höhere Variabilität im T-Zell-Rezeptor-Komplex. Beide Subpopulationen können sehr schnell über die nicht- polymorphen MHC-Klasse-I (CD1d)- Moleküle aktiviert werden. Die T- Lymphozyten können im Gegensatz dazu nur Peptide erkennen, die von klassischen MHC-I oder MHC-II präsentiert werden [23, 59, 60- 63].

In der Arbeit von Kawakami wurde nur die Funktion der invarianten NKT-Zellen untersucht. Das Fehlen dieser Subpopulation ging mit einer erhöhten Mortalität bei der Pneumokokkenpneumonie einher [78]. Zur Analyse der varianten NKT-Zellen müssen CD1d- KO-Tiere untersucht werden. Ronet et al. konnten zeigen, dass eine differenzierte Betrachtungsweise der NKT-Zell-Subpopulationen erforderlich ist. Insbesondere das Fehlen der $V\alpha 14^+$ - NKT- Zellen bei der Infektion mit *Toxoplasma gondii* war mit einer höheren Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe verbunden. Wenn jedoch alle NKT- Zellen (CD1d- KO-Tiere) fehlten, zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Mortalität [91].

Möglicherweise unterscheiden sich die NKT-Zell-Subpopulationen in ihrer Zytokinexpression. Die NKT- Zellen können durch die Produktion von $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und IL-4 sowohl die T_H1 - Antwort, als auch die T_H2 - Antwort induzieren [59, 60, 61]. Auf Grund dieser Fähigkeit haben sie eine immunregulatorische Funktion. Kawakami et al. konnten zeigen, dass bei der Infektion mit *Cryptococcus neoformans* das Fehlen der

V α 14⁺- NKT- Zellen zu einer reduzierten Produktion von IFN γ bei gleich bleibender Produktion von IL-4 führt. Dies lässt vermuten, dass die V α 14⁺- NKT- Zellen die T_H1-Antwort induzieren [82]. Andererseits konnte gezeigt werden, dass V α 14-transgene Mäuse erhöhte IgE- und IL-4- Serumspiegel aufwiesen [92]. Ob diese unterschiedlichen Subpopulationen bei der unspezifischen Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae* eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung haben, muss Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein. Zusammenfassend zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der NK- und eine signifikante Zunahme der NKT-Zellen in der Lunge. Die Rekrutierung war von erhöhter Expression NK- und NKT-Zell-chemotaktischer Zytokine begleitet. Zudem wiesen die NK- und NKT-Zellen eine schnelle Aktivierung auf und steigerten signifikant die Produktion inflammatorischer Zytokine. Daher ist eine wichtige Rolle der NK- und NKT-Zellen bei der unspezifischen pulmonalen Abwehr gegen Pneumokokken naheliegend. Jedoch bedarf es weiterer differenzierter experimenteller Untersuchungen der einzelnen NKT-Zell-Subpopulationen (variante und invariante NKT-Zellen) und von NK- bzw. NKT-Zell-defizienten Mausstämmen in der Pneumokokkenpneumonie.

4.5 Die Funktion der T- Lymphozyten bei der unspezifischen Immunabwehr

Über die Rolle der T- Lymphozyten im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr ist wenig bekannt. Im Rahmen einer Infektion mit *Legionella pneumophila* konnte gezeigt werden, dass die CD4⁺- und CD8⁺-T- Zellen auch an der frühen bakteriellen Clearance beteiligt sind [93]. Zudem konnte auch für $\gamma\delta$ -T- Zellen gezeigt werden, dass sie durch die frühe Zytokinproduktion den Verlauf einer *Klebsiella pneumoniae*- Pneumonie entscheidend beeinflussten, obwohl deren Anzahl konstant blieb [94]. Auch im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie änderte sich die Anzahl der $\gamma\delta$ -T- Zellen nicht wesentlich. Ebenso konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Gesamtzahl der T- Lymphozyten in der Lunge im Verlauf nicht signifikant änderte. Dennoch konnte histologisch eine Ansammlung von CD3⁺- Lymphozyten in den inflammatorischen Arealen der Lunge nach 48 Stunden nachgewiesen werden [31].

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die CD4⁺- und CD8⁺- T- Lymphozyten bereits nach 24 Stunden eine zunehmende Aktivierung aufwiesen. Die frühe Aktivierung der Zellen spricht für deren funktionelle Bedeutung im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr gegenüber *S. pneumoniae*.

Für eine wichtige Rolle der T- Lymphozyten spricht auch, dass splenektomierte Patienten und HIV- Patienten ein hohes Risiko haben, eine schwere Pneumokokkenpneumonie zu entwickeln [7, 30]. Zudem konnten Kadioglu et al. zeigen, dass das Fehlen von CD4⁺-T- Zellen bei Mäusen mit einer reduzierten bakteriellen Clearance und einer höheren Mortalität bei einer Pneumokokkenpneumonie verbunden war [95]. Insbesondere die CD4⁺-T- Lymphozyten sind offenbar für die Abwehr einer Pneumokokkeninfektion von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4⁺-T- Lymphozyten, ähnlich wie die NK- und NKT- Zellen, bereits nach 24 Stunden signifikant aktiviert waren und im späteren Verlauf auch signifikant die eigene Produktion von TNF α und IFN γ steigerten.

Jedoch konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass es im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu einem ausgeprägten Verlust der CD4⁺-T- Lymphozyten kommt, und zwar nicht nur in der Lunge, sondern auch in allen anderen Kompartimenten. Zudem zeigte sich ebenso in allen Kompartimenten ein massiver Verlust der B- Lymphozyten. Die Zahl der CD8⁺-T- Lymphozyten und $\gamma\delta$ -T- Zellen in der Lunge blieb im Verlauf der Infektion jedoch konstant. Im Blut beschränkte sich diese Lymphozytopenie nicht nur auf die CD4⁺-T- und B- Lymphozyten, sondern auch die anderen Lymphozytensubpopulationen waren betroffen. Dieser Verlust der B- und CD4⁺-T- Lymphozyten zeigte sich nach 48 Stunden, also mit dem Beginn der Sepsis, sowohl im Blut, als auch in Lunge, Leber und Milz.

Vergleichbar mit diesen Ergebnissen konnten Kemp et al. zeigen, dass es auch beim Menschen im Blut im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu einer Lymphozytopenie mit Verlust von insbesondere aktivierten T- Lymphozyten, sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T- Lymphozyten, und NK- Zellen aus der Zirkulation kommt [96]. Jedoch beobachteten Kemp et al. keine Veränderung in der Population der B- Lymphozyten [96]. Beim Menschen, wie auch bei der Maus wurde im Rahmen einer Sepsis ein Verlust der B- und CD4⁺- Lymphozyten bedingt durch Apoptose beobachtet [97, 98]. Mögliche Ursachen für die beobachtete Lymphozytopenie könnten somit sowohl eine Umverteilung der Lymphozyten in andere Gewebe, als auch eine verstärkte Apoptoseinduktion im Rahmen der Sepsis sein.

5 Zusammenfassung

Die Pneumonie ist die häufigste Infektionskrankheit, und *S. pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr in der Lunge sind unzureichend verstanden. Insbesondere ist die Rolle der NK-, NKT- und T-Lymphozyten für die unspezifische Immunantwort bislang unklar. Zur Untersuchung der NK-, NKT- und T-Lymphozyten bei Pneumokokken-Pneumonie wurde ein Modell der schweren Pneumonie mit nachfolgender Sepsis durch transnasale Pneumokokken-Infektion der Maus etabliert. Wie beim Menschen zeigten sich ausgedehnte Infiltrate, die zu einer respiratorischen Insuffizienz führten. Es traten systemische Mikrozirkulationsstörungen und Hypotonie auf. Zusätzlich zu diesen klinischen Zeichen der Pneumonie und Sepsis wurde eine massive inflammatorische Abwehrreaktion zunächst in der Lunge und nachfolgend auch systemisch beobachtet. Neutrophile Granulozyten und mononukleäre Zellen wurden in die Lunge rekrutiert. Die Gesamtlymphozytenzahl blieb zunächst im Verlauf der Infektion konstant, und nach 48 Stunden zeigte sich eine Abnahme der Lymphozyten. Diese war maßgeblich durch den Verlust an B- und CD4⁺-T- Lymphozyten bedingt. Die Zahl der CD8⁺-T- Lymphozyten und der $\gamma\delta$ -T- Zellen hingegen blieb konstant. Die NK-Zellen nahmen im Verlauf der Infektion tendenziell, die NKT-Zellen signifikant zu. Ferner konnte gezeigt werden, dass NK- und NKT-chemotaktische Zytokine in der Lunge vermehrt exprimiert werden. Die pulmonal rekrutierten NK- und NKT- Zellen wurden zudem rasch aktiviert und steigerten signifikant die Produktion an IFN γ und TNF α . Auch systemisch wurden die NK-Zellen aktiviert und steigerten ihre Zytokinproduktion.

Zur weiteren Analyse der funktionellen Bedeutung der NK- und NKT- Zellen auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie wurden diese Lymphozytensubpopulationen depletiert. Die Depletion der NK-Zellen mit Asialo-GM-Antikörper führte zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität, jedoch senkte das in der Kontrollgruppe verwendete polyklonale Immunglobulin die Mortalität in vergleichbarem Maße. Möglicherweise könnten unspezifische protektive Effekte transfundierter IgM hierfür ursächlich sein. Die Depletion der NK- und NKT-Zellen mit anti-NK1.1-Antikörper führte zu keiner signifikanten Senkung der Mortalität.

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse eine wichtige Funktion der NK- und NKT-Zellen bei Pneumokokkenpneumonie vermuten. Jedoch bedarf es weiterer

experimenteller Untersuchungen, beispielsweise unter Verwendung geeigneter transgener Mäuse mit differenzieller Defizienz einzelner Lymphozytensubpopulationen, um die funktionelle Rolle der NK-, NKT- und T-Zell-Subpopulationen bei der Pneumokokkenpneumonie exakt zu analysieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Lopez AD, Murray CC: The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4:1241-1243.
2. Welte T, Marre R, and Suttorp N. 2003. CAPNetz - Kompetenznetzwerk ambulant erworbene Pneumonie: Strukturen und Ziele [CAPNet--network of competence for community acquired pneumonia: structures and aims]. *Pneumologie* 57[1], 34-41.
3. Almirall J, Bolibar I, Balanzo X, and Gonzalez CA: Risk factors for community-acquired pneumonia in adults: a population-based case-control study. *Eur Respir J* 1999, 13: 349-355
4. Marrie TJ: Pneumococcal pneumonia: epidemiology and clinical features. *Semin Respir Infect* 1999, 14: 227-236
5. File TM: Community-acquired pneumonia. *Lancet* 2003; 362:1991-2001.
6. Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y *et al*: Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 Suppl S1:25-37.
7. Torres JM, Cardenas O, Vasquez A *et al*: *Streptococcus pneumoniae* bacteremia in a community hospital. *Chest* 1998; 113:387-390.
8. Angus DC, Marrie TJ, Obrosky DS *et al*: 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; 166:717-723.
9. Fine MJ, Smith MA, Carson CA *et al*: Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* 1996; 275:134-141.
10. Catterall JR: *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 1999, 54: 929-937
11. Mohler J, Azoulay-Dupuis E, Amory-Rivier C, Mazoit JX, Bedos JP, Rieux V, and Moine P: *Streptococcus pneumoniae* strain-dependent lung inflammatory responses in a murine model of pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 2003, 29: 808-816

12. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR *et al*: Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30:100-121.
13. Martens P, Worm SW, Lundgren B *et al*: Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis* 2004; 4:21.
14. Henriques B, Kalin M, Ortqvist A *et al*: Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis* 2000; 182:833-839.
15. Pneumococcal type-associated in alternate complement pathway activation. Fine DP. *Infect Immun*. 1975 Oct;12(4):772-8.
16. Sarah J. Tilley, Elena V. Orlova, Robert J.C. Gilbert, Peter W. Andrew, Helen R. Saibil: Structural Basis of Pore Formation by the Bacterial Toxin Pneumolysin. *Cell* 2005, 121: 247-256.
17. AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, and Snippe H: *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 1995, 59: 591-603
18. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ *et al*: Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 2000; 173:39-51.
19. G. Perona-Wright, K. Mohrs, F. M. Szaba *et al*.: Systemic but not local infections elicit immunosuppressive IL-10 production by natural killer cells; *Cell Host and Microbe* 2010, 6, 503–512.
20. Twigg HL, III: Pulmonary host defenses. *J Thorac Imaging* 1998; 13:221-233.
21. Monton C, Torres A: Lung inflammatory response in pneumonia. *Monaldi Arch Chest Dis* 1998; 53:56-63.
22. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC *et al*: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220.
23. Taniguchi M, Harada M, Kojo S *et al*: The regulatory role of V α 14 NKT cells in innate and acquired immune response. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:483-513.

24. Biron CA, Brossay L: NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr Opin Immunol* 2001; 13:458-464.
25. Taniguchi M, Seino K, Nakayama T: The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2003; 4:1164-1165.
26. Yoshikai Y, Nishimura H: The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2000; 2:381-389.
27. Delves PJ, Roitt IM: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:37-49.
28. A. O. Etogo, J. Nunez, C. Y. Lin, T. E. Toliver-Kinsky, and E. R. Sherwood, NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis, *Journal of Immunology*, 2008; 9: 6334–6345.
29. Moore BB, Moore TA, Toews GB: Role of T- and B-lymphocytes in pulmonary host defences. *Eur Respir J* 2001; 18:846-856.
30. Ejstrup P, Kristensen B, Hansen JB *et al*: Risk and patterns of bacteraemia after splenectomy: a population-based study. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:521-525.
31. Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K *et al*: Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* 2000; 68:492-501.
32. Hocke AC, Lampe MP, Witzernath M, Mollenkopf H, Zerrahn J, Schmeck B, Kessler U, Krull M, Hammerschmidt S, Hippenstiel S, Schutte H, Suttorp N, and Rosseau S: Cell-specific interleukin-15 and interleukin-15 receptor subunit expression and regulation in pneumococcal pneumonia--comparison to chlamydial lung infection. *Cytokine* 2007, 38: 61-73
33. Lodolce J, Burkett P, Koka R *et al*: Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol* 2002; 39:537-544.
34. Fehniger TA, Carson WE, Caligiuri MA: Costimulation of human natural killer cells is required for interferon gamma production. *Transplant Proc* 1999; 31:1476-1478.
35. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ *et al*: Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in

- combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 1999; 162:4511-4520.
36. Carson WE, Caligiuri MA: Interleukin 15: a potential player during the innate immune response to infection. *Exp Parasitol* 1996; 84:291-294.
37. Fehniger TA, Caligiuri MA: Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood* 2001; 97:14-32.
38. Yokoyama WM, Kim S, French AR: The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:405-429.
39. Kiessling R, Klein E, Pross H *et al*: "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-121.
40. Chen L, Woo M, Hakem R *et al*: Perforin-dependent activation-induced cell death acts through caspase 3 but not through caspases 8 or 9. *Eur J Immunol* 2003; 33:769-778.
41. Matute-Bello G, Frevert CW, Liles WC *et al*: Fas/Fas ligand system mediates epithelial injury, but not pulmonary host defenses, in response to inhaled bacteria. *Infect Immun* 2001; 69:5768-5776.
42. Rensing-Ehl A, Hess S, Ziegler-Heitbrock HW *et al*: Fas/Apo-1 activates nuclear factor kappa B and induces interleukin-6 production. *J Inflamm* 1995; 45:161-174.
43. Ahmad A, Menezes J: Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J* 1996; 10:258-266.
44. Deng JC, Tateda K, Zeng X *et al*: Transient transgenic expression of gamma interferon promotes Legionella pneumophila clearance in immunocompetent hosts. *Infect Immun* 2001; 69:6382-6390.
45. Dunn PL, North RJ: Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* 1991; 59:2892-2900.
46. Rijneveld AW, Lauw FN, Schultz MJ *et al*: The role of interferon-gamma in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2002; 185:91-97.

47. Rubins JB, Pomeroy C: Role of gamma interferon in the pathogenesis of bacteremic pneumococcal pneumonia. *Infect Immun* 1997; 65:2975-2977.
48. Moore TA, Perry ML, Getsoian AG *et al*: Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infection and Immunity* 2002; 70:6310-6318.
49. Chiche L, Forel JM, Thomas G, Farnarier C, Vely F, *et al*. The role of natural killer cells in sepsis. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:986491.
50. Kohler J, Heumann D, Garotta G *et al*: IFN-gamma involvement in the severity of gram-negative infections in mice. *J Immunol* 1993; 151:916-921.
51. Sasaki S, Nishikawa S, Miura T *et al*: Interleukin-4 and interleukin-10 are involved in host resistance to *Staphylococcus aureus* infection through regulation of gamma interferon. *Infect Immun* 2000; 68:2424-2430.
52. Takashima K, Tateda K, Matsumoto T *et al*: Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect Immun* 1997; 65:257-260.
53. Ferrante A, Martin AJ, Bates EJ *et al*: Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor-alpha-activated neutrophils. The role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst, and degranulation. *J Immunol* 1993; 151:4821-4828.
54. Tseng CT, Rank RG: Role of NK cells in early host response to chlamydial genital infection. *Infect Immun* 1998; 66:5867-5875.
55. Unanue ER: Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:35-43.
56. Byrne P, McGuirk P, Todryk S *et al*: Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with *Bordetella pertussis* associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2004; 34:2579-2588.
57. Godshall CJ, Scott MJ, Burch PT *et al*: Natural killer cells participate in bacterial clearance during septic peritonitis through interactions with macrophages. *Shock* 2003; 19:144-149.

58. Badgwell B, Parihar R, Magro C *et al*: Natural killer cells contribute to the lethality of a murine model of Escherichia coli infection. *Surgery* 2002; 132:205-212.
59. Taniguchi M, Nakayama T: Recognition and function of Valpha14 NKT cells. *Semin Immunol* 2000; 12:543-550.
60. Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD *et al*: NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000; 21:573-583.
61. Kronenberg M, Gapin L: The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:557-568.
62. Unutmaz D: NKT cells and HIV infection. *Microbes Infect* 2003; 5:1041-1047.
63. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, and Van Kaer L: NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004, 4: 231-237
64. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ *et al*: Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 1999; 189:1973-1980.
65. Ishigami M, Nishimura H, Naiki Y *et al*: The roles of intrahepatic Valpha14(+) NK1.1(+) T cells for liver injury induced by Salmonella infection in mice. *Hepatology* 1999; 29:1799-1808.
66. Szalay G, Ladel CH, Blum C *et al*: Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-beta 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice. *J Immunol* 1999; 162:6955-6958.
67. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M *et al*: CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of Pseudomonas aeruginosa from lung. *Nat Med* 2002; 8:588-593.
68. Sporri R, Joller N, Albers U, Hilbi H, Oxenius A. MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of Legionella pneumophila infection. *J Immunol* 2006; 176:6162–71.
69. Kadioglu A, Andrew PW: The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immunology* 2004; 25:143-149.

70. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM *et al*: Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66:912-922.
71. Hasleton PS, Roberts TE: Adult respiratory distress syndrome - an update. *Histopathology* 1999; 34:285-294.
72. Levy MM, Fink MP, Marshall JC *et al*: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-1256.
73. Standiford TJ, Huffnagle GB: Cytokines in host defense against pneumonia. *J Investig Med* 1997; 45:335-345.
74. Monton C, Torres A, El Ebiary M *et al*: Cytokine expression in severe pneumonia: a bronchoalveolar lavage study. *Crit Care Med* 1999; 27:1745-1753.
75. Kragstbjerg P, Jones I, Vikerfors T *et al*: Diagnostic value of blood cytokine concentrations in acute pneumonia. *Thorax* 1995; 50:1253-1257.
76. Glynn P, Coakley R, Kilgallen I *et al*: Circulating interleukin 6 and interleukin 10 in community acquired pneumonia. *Thorax* 1999; 54:51-55.
77. von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R *et al*: Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:263-272.
78. Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y *et al*: Critical role of V alpha 14(+) natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. *European Journal of Immunology* 2003; 33:3322-333
- 79.. Loetscher P, Seitz M, ClarkLewis I *et al*: Activation of NK cells by CC chemokines - Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *Journal of Immunology* 1996; 156:322-327.
80. Maghazachi AA, Skalhegg BS, Rolstad B *et al*: Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. *FASEB J* 1997; 11:765-774.
81. Taub DD, Sayers TJ, Carter CR *et al*: Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155:3877-3888.

82. Kawakami K, Kinjo Y, Uezu K *et al*: Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *Journal of Immunology* 2001; 167:6525-6532.
83. Haraguchi S, Day NK, Nelson RP, Jr. *et al*: Interleukin 12 deficiency associated with recurrent infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:13125-13129.
84. Fabrizio K, Groner A, Boes M, and Pirofski LA: A human monoclonal immunoglobulin M reduces bacteremia and inflammation in a mouse model of systemic pneumococcal infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007, 14: 382-390
85. Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, and Carsetti R: Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med* 2003, 197: 939-945
86. Carsetti R, Rosado MM, and Wardmann H: Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004, 197: 179-191
87. Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, and Quinti I: The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2005, 115: 412-417
88. Kerr AR, Kirkham LA, Kadioglu A *et al*: Identification of a detrimental role for NK cells in pneumococcal pneumonia and sepsis in immunocompromised hosts. *Microbes Infect* 2005; 7:845-852.
89. Fernandes DM, Benson R, and Baldwin CL: Lack of a role for natural killer cells in early control of *Brucella abortus* 2308 infections in mice. *Infect Immun* 1995, 63: 4029-4033
90. Muhlen KA, Schumann J, Wittke F, Stenger S, Van Rooijen N, Van Kaer L, and Tiegs G: NK cells, but not NKT cells, are involved in *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunol* 2004, 172: 3034-3041

91. Ronet C, Darche S, Leite dM, Miyake S, Yamamura T, Louis JA, Kasper LH, and Buzoni-Gatel D: NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 2005, 175: 899-908
92. Bendelac A, Hunziker RD, and Lantz O: Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells. *J Exp Med* 1996, 184: 1285-1293
93. Susa M, Ticac B, Rukavina T *et al*: Legionella pneumophila infection in intratracheally inoculated T cell-depleted or -nondepleted A/J mice. *J Immunol* 1998; 160:316-321.
94. Moore TA, Moore BB, Newstead MW *et al*: gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine Klebsiella pneumonia. *Journal of Immunology* 2000; 165:2643-2650.
95. Kadioglu A, Coward W, Colston MJ *et al*: CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun* 2004; 72:2689-2697.
96. Kemp K, Bruunsgaard H, Skinhoj P *et al*: Pneumococcal infections in humans are associated with increased apoptosis and trafficking of type 1 cytokine-producing T cells. *Infect Immun* 2002; 70:5019-5025.
97. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE *et al*: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001; 166:6952-6963.
98. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A *et al*: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002; 18:487-494.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Norbert Suttorp, Frau Dr. med. Simone Rosseau und Herrn PD Dr. Martin Witzenrath für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Bei den Mitarbeitern der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bedanken:

Mein Dank geht auch an Frau Stephanie Preising für die Hilfe bei den PCR-Untersuchungen sowie die großartige Unterstützung bei allen Laborarbeiten. Bei dem Institut für Biometrie der Charité möchte ich mich für die Beratung und Unterstützung zur statistischen Auswertung bedanken.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden, allen voran Matthias Lampe für die gute Zusammenarbeit und die aufmunternden Worte.

Meinen Eltern und meinem Freund Sven möchte ich einen ganz besonderen Dank für ihre fortwährende Unterstützung aussprechen.

7.2 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katrin Wricke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle der Lymphozyten im Rahmen der primären Abwehrreaktion bei der Pneumokokkenpneumonie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

10.07.2012

Katrin Wricke

7.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.