

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie

der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Tierpathologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

**Untersuchung einer potenziell
immunmodulatorischen Wirkung
von Moxifloxacin in der schweren murinen
Pneumokokkenpneumonie**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sandra-Maria Wienhold

Tierärztin

aus Wernigerode

Berlin 2014

Journal-Nr.: 3765

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D. (Cornell Univ.)
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Martin Witzernath
Dritter Gutachter: PD Dr. Melanie Hamann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, bacterial pneumonia, Streptococcus pneumoniae,
immuno-modulation, immunomodulatory properties, inflammation, acute
respiratory distress syndrome, lungs, antibiotics

Tag der Promotion: 18.05.2015

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-623-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Mama und Martin

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	Die Atmungsorgane.....	3
2.1.1	Aufbau der Atmungsorgane.....	3
2.1.1.1	Anatomischer Aufbau der Lunge	3
2.1.2	Abwehrmechanismen der Atmungsorgane.....	4
2.1.2.1	Physikalische Abwehrmechanismen	4
2.1.2.2	Mukoziliäre Clearance.....	5
2.1.2.3	Physikochemische Barrieren.....	5
2.1.2.4	Erkennung von Pathogenen.....	6
2.1.2.5	Zelluläre Immunität des angeborenen Immunsystems	7
2.1.2.6	Komplementsystem.....	8
2.1.2.7	Zelluläre Immunität des erworbenen Immunsystems.....	8
2.1.2.8	Zytokine (Interleukin-1 beta, Interleukin-6 und <i>das keratinocyte-derived chemokine</i>).....	10
2.2	Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen.....	11
2.2.1	Definition	11
2.2.2	Epidemiologie und Einteilung	12
2.2.3	Erreger und Therapie	13
2.2.4	Acute Respiratory Distress Syndrome	14
2.2.5	Sepsis	15
2.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16
2.3.1	Virulenzfaktoren	17
2.3.1.1	Kapsel.....	17
2.3.1.2	Pneumolysin	18
2.3.1.3	Cholinbindungsproteine	19
2.3.2	Resistenzsituation	19
2.3.3	Impfung	20
2.4	Antibiotika und Immunmodulation.....	21
2.4.1	Fluorchinolone.....	22
2.4.1.1	Moxifloxacin	23

2.5	Arbeitshypothese, Ziele und experimentelle Strategien der Dissertationsarbeit.....	26
3	Material und Methoden.....	28
3.1	<i>Ex-vivo</i> Experimente an humanem Lungengewebe.....	28
3.1.1	Vorbereitung des humanen Lungengewebes	28
3.1.2	Stimulation der Lungenproben mit TNF- α	29
3.2	Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
3.2.1	Ansetzen der Nährlösung.....	30
3.2.2	Bakterien.....	31
3.2.3	Test der minimalen Hemmkonzentration	31
3.2.4	Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
3.3	Infektion von humanem Lungengewebe mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
3.3.1	Bestimmung der Bakterienlast im humanen Lungengewebe	33
3.4	Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Überständen des humanen Lungengewebes.....	34
3.5	Tierexperimentelle Untersuchungen.....	34
3.5.1	Versuchstiere	34
3.5.2	Tierhaltung	34
3.6	Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie.....	35
3.6.1	Versuchsgruppen.....	35
3.7	Handhabung der Antibiotika	35
3.7.1	Verabreichung von Ampicillin	35
3.7.2	Verabreichung von Moxifloxacin.....	36
3.8	Infektion der Mäuse mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	36
3.9	Behandlung mit Antibiotika	37
3.10	Endpunkte.....	37
3.11	Untersuchung des klinischen Verlaufs der Pneumokokkenpneumonie	38
3.12	Präparation der Tiere und Probenentnahme	39
3.12.1	Präparation der Mäuse.....	39
3.12.2	Durchführung der bronchoalveolären Lavage.....	40
3.12.3	Durchführung der Organentnahme.....	40
3.13	Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut.....	41
3.13.1	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	41
3.13.2	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung im Blut.....	43

3.14	Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut.....	45
3.15	Genexpression der Zytokine in der Lunge	45
3.15.1	Isolierung der RNA aus Mauslungen	45
3.15.2	Durchführung der reversen Transkription	46
3.15.3	Durchführung der quantitativen <i>Real-Time</i> -PCR	48
3.16	Bestimmung der Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, im Blut und in der Milz.....	50
3.16.1	Bakterienlast der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	50
3.16.2	Bakterienlast der Milz	50
3.16.3	Bakterienlast des Blutes.....	50
3.17	Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität.....	51
3.18	Histologische Untersuchungen der entnommenen Organe.....	51
3.19	<i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i>	53
3.19.1	Versuchsaufbau <i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i>	53
3.19.2	Stimulation von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen mit Antibiotika und Thrombin.....	54
3.20	Wachstum von <i>Streptococcus pneumoniae</i> unter Zugabe von Antibiotika.....	54
3.21	Statistische Datenanalyse	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Moxifloxacin hemmt im Gegensatz zu Ampicillin die Produktion von Entzündungsmediatoren im isolierten humanen Lungengewebe nach TNF- α Stimulation	56
4.2	Moxifloxacin und Ampicillin reduzieren die bakterielle Last im isolierten humanen Lungengewebe nach Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	57
4.3	Moxifloxacin hat ähnlich wie Ampicillin keinen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen im isolierten humanen Lungengewebe nach <i>Streptococcus pneumoniae</i> Infektion	58
4.4	Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf den klinischen Verlauf der Pneumonie.....	59
4.5	Moxifloxacin reduziert die Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut effektiver als Ampicillin	61
4.6	Im Gegensatz zu der Behandlung mit Moxifloxacin weisen Mäuse unter Ampicillin-Therapie eine gesteigerte pulmonalvaskuläre Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie auf	64
4.7	Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die Expression oder Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und KC.....	66
4.8	Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die lokale und systemische zelluläre Entzündungsantwort	71

4.9	Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die Ausprägung der histologischen Veränderungen im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie	75
4.10	Moxifloxacin hat genauso wie Ampicillin keinen Einfluss auf den transzellulären elektrischen Widerstand humaner umbilikalvenöser Endothelzellmonolayer <i>in vitro</i>	77
4.11	Ampicillin verlangsamt das Wachstum von <i>Streptococcus pneumoniae in vitro</i> effektiver als Moxifloxacin.....	79
5	Diskussion.....	82
6	Zusammenfassung.....	90
7	Summary.....	92
8	Literaturverzeichnis	94
9	Anhang.....	105
9.1	Versuchsdesign.....	105
9.2	Materialien	106
9.3	Tabellenverzeichnis.....	112
9.4	Abbildungsverzeichnis.....	113
10	Förderung / Interessenkonflikt	115
11	Publikationen.....	116
12	Danksagung	118
13	Selbständigkeitserklärung	120

I Abkürzungsverzeichnis

APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BALT	<i>Bronchial Associated Lymphoid Tissue</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie (<i>Community-Acquired Pneumonia</i>)
CbpA	<i>Choline-binding Protein A</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
ECIS	<i>Electric Cell-Substrate Impedance Sensing</i>
ELF	<i>Epithelial Lining Fluid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
engl.	Englisch/ aus dem Englischen
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HAP	<i>Hospital-Acquired Pneumonia</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMGB1	<i>Mobility Group Box 1 Protein</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>

HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
I.E.	Internationale Einheit
<i>i.p.</i>	<i>intraperitoneal</i>
<i>i.v.</i>	<i>intravenös</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
I κ B	<i>Inhibitor of kappaB</i>
KbE	Koloniebildende Einheit
KC	<i>Keratinocyte-derived Chemokine</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
mean	Mittelwert
MHK	minimale Hemmkonzentration
MIP-1 (2)	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1 (2)</i>
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
MSA	<i>Murine Serum Albumin</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
n	Gruppengröße
n.d.	nicht detektierbar
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
Nf- κ B	<i>Nuclear factor kappaB</i>
NLR	<i>Nucleotide Oligomerization Domain– like Rezeptor</i>
NLRP3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
NOD	<i>Nucleotide Oligomerization Domain</i>
OD	Optische Dichte
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PsaA	<i>Pneumococcal Surface Adhesin A</i>

PspA	<i>Pneumococcal Surface Protein A</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Reverse Transkription
<i>S. pneumoniae (S. pn)</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SP-A (-D)	Surfactantprotein A (D)
SSC	<i>Sideward Scatter</i>
TER	Transzellulärer Elektrischer Widerstand
THY	Todd Hewitt-Bouillon
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
™	Warenzeichen (Trademark)
TMB	<i>Tetramethylbenzidine Liquid</i> Substrat
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
VAP	<i>Ventilator Associated Pneumonia</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	<i>versus</i>

1 Einleitung

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia*, CAP) ist eine der häufigsten tödlich verlaufenden Infektionskrankheiten in den westlichen Industrieländern (Woodhead 2002). Global gesehen steht sie an dritter Stelle der Todesursachen weltweit (WHO 2013). Laut Angaben des statistischen Bundesamts führt die ambulant erworbene Pneumonie jährlich zu mehr stationären Krankenhausaufenthalten als beispielsweise Myokardinfarkt oder Schlaganfall (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2013a). *Streptococcus pneumoniae* ist der mit Abstand bedeutendste Erreger für CAP weltweit (File 2004; Walden et al. 2014).

Darüber hinaus nimmt die Bedeutung der Pneumonie aufgrund des demographischen Wandels, der steigenden Anzahl immunsupprimierter Patienten und steigender Häufigkeiten antibiotikaresistenter Erreger zu (Bauer 2006).

Trotz adäquater Antibiotikatherapien und optimalen Behandlungsbedingungen kommt es bei bis zu 23 % der Patienten, die aufgrund einer CAP auf Intensivstationen versorgt werden müssen, zu einem tödlichen Verlauf der Erkrankung (Rodriguez et al. 2009).

Die unkontrollierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems scheint dabei eine zentrale Rolle in der Entstehung eines akuten Lungenversagens (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) sowie von Sepsis und Multiorganversagen zu spielen (Matthay und Zimmerman 2005; Roson et al. 2004).

Die Limitierung von überschießenden Entzündungsreaktionen könnte somit in Addition zu einer effektiven antimikrobiellen Therapie den Verlauf der schweren Pneumonie begünstigen.

Neben ihrer bewiesenen antimikrobiellen Potenz scheinen die Fluorchinolone, die eine Cyclopropyl-Gruppe an Position N1 der Chinolon-Kernstruktur tragen, antiinflammatorisches Potential zu besitzen (Dalhoff 2005).

Moxifloxacin, das unter anderem in der Behandlung der Pneumonie eingesetzt wird, ist eine solche Substanz. Moxifloxacin hemmte die Freisetzung von IL-1 β und TNF- α aus humanen Monozyten (Araujo et al. 2002). In humanen Alveolarepithelzellen, stimuliert mit hitzeinaktivierten Pneumokokken, reduzierte Moxifloxacin die Sekretion von IL-6. Als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus vermuteten die Autoren die Stabilisierung von *inhibitor of kappaB* (I κ B) und die damit verbundene verminderte Translokation von *nuclear factor kappaB* (Nf- κ B) in den Zellkern (Choi et al. 2003). Zudem verringerte Moxifloxacin die durch Lipopolysaccharide (LPS) induzierte Freisetzung von IL-1 β , IL-6 und IL-8 aus humanen Alveolarepithelien (Donnarumma et al. 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe konnte die Hemmung

der Aktivierung von *mitogen activated protein kinases* (MAPK) nach einer Vorbehandlung von humanen Alveolarepithelien mit Moxifloxacin zeigen (Werber et al. 2005).

Diese *in vitro* Daten suggerieren eine immunmodulatorische Funktion von Moxifloxacin, welche sich positiv auf den Verlauf der Pneumonie auswirken könnte. Bisher fehlten aber *in vivo* Untersuchungen zum Einfluss von Moxifloxacin auf die Entzündungsreaktion in der Pneumonie und die daraus gegebenenfalls resultierende Wirkung auf relevante funktionelle Parameter, wie pulmonalvaskuläre Schrankenstörung. Vor diesem Hintergrund sollte in dem vorliegenden Forschungsvorhaben das immunmodulatorische Potential von Moxifloxacin in Modellen der Pneumonie untersucht werden.

Hierzu wurden zunächst in einem *ex vivo* Modell vitale humane Lungenproben mit TNF- α oder *S. pneumoniae* stimuliert und der Effekt von Moxifloxacin auf die ausgelöste Entzündungsreaktion im Vergleich zu Ampicillin, einer der Standardtherapien der ambulant erworbenen Pneumonie, bestimmt. Ampicillin ist ein Aminopenicillin und gehört damit zur Gruppe der β -Laktam Antibiotika. Für Aminopenicilline sind keine auf das Immunsystem wirkenden Eigenschaften bekannt. Daher eignete es sich ideal als Referenzantibiotikum in der vorliegenden Studie. Darüber hinaus wurde die Moxifloxacin-Therapie in der Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell hinsichtlich Parametern der Entzündungsreaktion, der Erregere-
limination, pulmonalvaskulärer Schrankenstörung, histopathologischer Analyse der Lungenschädigung und dem klinischen Verlauf der Infektion ebenfalls im Vergleich zu Ampicillin untersucht.

Ziel der vorliegenden Studie war es, eventuelle immunmodulatorische Einflüsse von Moxifloxacin auf die Entzündungsreaktion und den Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie zu detektieren, und das therapeutische Potenzial von Moxifloxacin bei ambulant erworbener Pneumonie weitergehend zu charakterisieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Atmungsorgane

2.1.1 Aufbau der Atmungsorgane

Die Atmungsorgane der Säugetiere lassen sich in den oberen und unteren Respirationstrakt einteilen. Zum oberen Respirationstrakt zählen die mit Flimmerepithel ausgekleideten Atemwege von den Nasenhöhlen über Rachen, Kehlkopf und Luftröhre bis zu den Bronchien der Lunge. Über die Atemwege wird die eingeatmete Luft zum Gasaustauschsystem des unteren Respirationstraktes, den Alveolargängen (*ductus alveolares*) und Alveolen geleitet. *Via* Diffusion gelangt der Sauerstoff aus der Atemluft durch die Blut-Luft-Schranke in die Kapillaren der Lunge und Kohlendioxid wird im Austausch abgegeben (McGavin und Zachary 2009).

2.1.1.1 Anatomischer Aufbau der Lunge

Der Aufbau der Atmungsorgane von Mäusen und Menschen weist einige Unterschiede auf. Während die Trachea des Menschen vollständig von hyalinen Knorpelspangen umgeben ist, die sich bis in die Hauptbronchien fortsetzen, weist die Trachea der Maus nur im oberen Bereich Knorpelspangen auf. Im Gegensatz zur Maus, bei der sich die Trachea *monopodial* aufzweigt, zeigt die menschliche Luftröhre ein *dichotomes* Aufzweigungsmuster (Irvin und Bates 2003).

Beide Spezies besitzen eine in fünf Lappen (*Lobi*) gegliederte Lunge. Dabei besteht die Lunge des Menschen rechts aus drei und links aus zwei Lappen, wohingegen die Lunge der Maus auf der rechten Seite in vier Lappen gegliedert ist. Die linke Lunge der Maus besteht aus nur einem Lobus. Die totale Lungenkapazität der murinen Lunge beträgt ca. 1 ml, die des Menschen ungefähr 6 000 ml (Irvin und Bates 2003). Die weitere Gliederung der Lunge wird anhand der Aufzweigung der Hauptbronchien in die kleineren Bronchien vorgenommen. Ausgehend von den Hauptbronchien (*Bronchus principalis dexter et sinister*) teilen sich die luftleitenden Wege in die Lappenbronchien (*Bronchi lobares*), Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*) und über die *Bronchioli* bis in die terminalen Bronchiolen (*Bronchioli terminales*). An die terminalen Bronchiolen schließen sich die *Bronchioli respiratorii an*, die über die *ductus alveolares* in die Alveolen münden. Der murinen Lunge fehlen die *Bronchioli respira-*

torii. Die Alveolen der Mäuse sind kleiner (Durchmesser ca. 80 μm) als jene des Menschen (Durchmesser ca. 210 μm). Ebenso ist die Blut-Luft-Schranke der Mäuse (ca. 0,32 μm) dünner als die des Menschen (ca. 0,62 μm). Dies könnte sich laut Irvin und Bates sowohl auf den Gasaustausch als auch auf die Mechanik des Lungenparenchyms auswirken (Irvin und Bates 2003). Die Blut-Luft-Schranke besteht aus dem Kapillarendothel und den Alveolar-epithelzellen, die eine gemeinsame Basalmembran bilden und somit eine Barriere für den Gasaustausch darstellen. Eine weitere Besonderheit ist das fast vollständige Fehlen von Becherzellen und die hohe Anzahl an Clara-Zellen in den Bronchien der Maus im Gegensatz zum Menschen (Pack et al. 1980).

Aufgrund ihrer großen Kontaktfläche mit der äußeren Umgebung kommen alle Anteile der Atmungsorgane ständig mit Noxen aus der Atemluft in Kontakt. Täglich strömen bei Menschen circa 9 000 Liter Luft durch die Lunge und verteilen sich über die gesamte Oberfläche der Alveolen, die beim Menschen ungefähr 200 m^2 beträgt (McGavin und Zachary 2009).

Aber auch hämatogen können Mikroorganismen wie Bakterien oder Viren sowie verschiedene Parasiten ihren Weg in die Lunge finden. In seltenen Fällen können Pathogene auch direkt in die Lunge eindringen, beispielsweise durch penetrierende Verletzungen des Brustkorbes (McGavin und Zachary 2009).

2.1.2 Abwehrmechanismen der Atmungsorgane

Die Lunge verfügt, neben dem Gastrointestinaltrakt, über die größte zusammenhängende Schleimhautoberfläche im menschlichen Körper. Um eine Schädigung des Respirationstrakts zu verhindern, existieren daher verschiedene komplexe Mechanismen des unspezifischen und spezifischen Immunsystems, die eng miteinander vernetzt sind.

2.1.2.1 Physikalische Abwehrmechanismen

Ob eingeatmete Partikel Schäden in den Atmungsorganen hervorrufen können, hängt maßgeblich von deren Durchmesser, Form, sowie der Länge und elektrischen Ladung der Partikel ab (McGavin und Zachary 2009). Das Verhalten der Partikel in der sie umgebenden Luft wird durch den aerodynamischen Durchmesser beschrieben. Da nicht alle Partikel kugelförmig sind, ist der aerodynamische Durchmesser entscheidend dafür, wie weit ein Partikel in die Lunge vordringen kann. Viren (0,02 - 0,3 μm) und Bakterien (0,2 - 10 μm) verfügen über geringe aerodynamische Durchmesser und können bis in die Alveolen gelangen (Linsel 2001). Aber auch lange, schmale Partikel können in die Lunge gelangen, wenn ihr aerody-

namischer Durchmesser gering ist. Ein Beispiel hierfür sind Asbestfasern (McGavin und Zachary 2009).

Durch den spiraligen Aufbau der Nasenmuscheln kommt es zu turbulenten Strömungen der Luft, sodass Partikel mit einem größeren aerodynamischen Durchmesser ($> 5 \mu\text{m}$) wieder aus den Nasengängen heraus befördert werden können (Zhang et al. 2000). Neben Husten- und Niesreflex stellt die Aufzweigung der Trachea in die Hauptbronchien eine weitere Barriere dar. Die Luft strömt an der Bifurkation in verschiedene Richtungen, sodass die Partikel bedingt durch ihre Trägheit auf die Schleimhautoberfläche der Bronchien auftreffen, dort hängenbleiben und abtransportiert werden können.

Trotz dieser physikalischen Barrieren können Pathogene mit einem aerodynamischen Durchmesser unter $2,5 \mu\text{m}$ in den Bereich der Alveolen vordringen und sich bedingt durch die Schwerkraft dort ablagern (McGavin und Zachary 2009). Feinste Partikel, deren Größe unter $0,1 \mu\text{m}$ liegt, können durch Diffusion schließlich die alveolokapilläre Barriere überwinden und so über das Blut im gesamten Organismus verteilt werden (Heyder 2004).

2.1.2.2 Mukoziliäre Clearance

Die mukoziliäre Clearance gehört ebenfalls zu den Hauptkomponenten der physikalischen Abwehrmechanismen der luftleitenden Wege. Hierunter versteht man den gerichteten Transport von mit Partikeln behaftetem Mukus aus dem Atmungstrakt durch zilientragende Epithelzellen (Zhang et al. 2000). Dies wird ermöglicht, da ein Großteil der Atemwege mit respiratorischem Epithel ausgestattet ist. Dieses ist ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel, in dem Becherzellen und zilientragende Zellen eingebettet sind. Durch ihr Grundgerüst aus Mikrotubuli sind die Zilien in der Lage synchrone, wellenförmige Bewegungen auszuführen, sodass der Mukus und darin befindliche Partikel aus den unteren Atemwegen in den Rachen transportiert werden können. Dort wird er zum größten Teil abgeschluckt oder ausgehustet (Fahy und Dickey 2010; McGavin und Zachary 2009).

2.1.2.3 Physikochemische Barrieren

Der von den Becherzellen sowie den intraepithelialen serösen Drüsen gebildete Mukus hat nicht nur rein physikalische Bedeutung für die Immunabwehr in der Lunge. Im Mukus gelöst befinden sich verschiedene antimikrobielle Peptide (AMP) (Zhang et al. 2000). Diese werden zum größten Teil von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie Epithelzellen gebildet und in das *epithelial lining fluid* (ELF), dem Flüssigkeitsfilm, der die Atemwege bedeckt, se-

zerniert. Aufgrund ihrer Struktur können die AMP in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Zu den wichtigsten AMP des Menschen zählen die α - und β -Defensine sowie das Cathelicidin (Beisswenger und Bals 2005). Die AMP können direkt antimikrobiell auf Bakterien, Pilze und einige behüllte Viren wirken. Ihre antimikrobielle Aktivität beruht dabei auf der Zerstörung von Zellmembranen der Mikroorganismen. Hierbei können sich die positiv geladenen Defensine in die negativ geladene Phospholipidmembran der Pathogene einschieben und so zur Porenbildung und Lyse der Zelle führen (Yang et al. 2002). Neben ihrer direkten antimikrobiellen Aktivität können die Defensine auch indirekt regulatorisch auf das Immunsystem einwirken, indem sie beispielsweise chemotaktisch auf Monozyten und T-Lymphozyten wirken (Guaní-Guerra et al. 2010; Lai und Gallo 2009).

2.1.2.4 Erkennung von Pathogenen

Eine wichtige Rolle bei der Erkennung verschiedener Mikroorganismen spielen die *pattern recognition receptors* (PRR). Diese Rezeptoren befinden sich unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen und Granulozyten und erkennen eine Vielzahl hoch konservierter pathogenassoziierter Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) (Medzhitov und Janeway, Jr. 2000). Vermittelt über die Bindung der PAMP an die PRR werden phagozytierende Zellen aktiviert und das erkannte Pathogen eliminiert. Zu den PAMP zählen beispielsweise Lipopolysachharide (LPS), Lipoteichonsäure sowie Peptidoglykane. Aber auch das von *Streptococcus pneumoniae* gebildete Exotoxin Pneumolysin kann in niedrigen Konzentrationen mit dem *Toll-like* Rezeptor-4 (TLR-4) interagieren und so eine proinflammatorische Antwort auslösen (Malley et al. 2003; Mitchell und Mitchell 2010). *Toll-like* Rezeptoren, die zu den PRR gehören, sind Transmembranrezeptoren, die sich auf einer Vielzahl von Zellen befinden. Abhängig von der Beteiligung bestimmter Adaptermoleküle (*Myeloid differentiation primary response gene 88*, MyD88 oder *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* , TRIF) werden nach der Erkennung der PAMP durch TLR spezifische Signalkaskaden ausgelöst (Medzhitov und Janeway, Jr. 2000). Diese führen über mehrere Stufen zu einer verstärkten Expression von Genen, die beispielsweise proinflammatorische Proteine kodieren (Kawai und Akira 2010).

Des Weiteren gibt es PRR, die sich hauptsächlich im Zytosol der Zellen befinden, wie die *Nucleotide Oligomerization Domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLR) (Opitz et al. 2010). Weiterhin gibt es intrazelluläre zytosolische PRR, die unabhängig von TLR und NLR in der Lage sind, doppelsträngige und einzelsträngige virale RNA zu erkennen und dadurch eine Virusinfektion zu detektieren. Aber auch im Zytosol der Zelle replizierende Bakterien, beispielsweise

Legionella pneumophila und *Mycoplasma tuberculosis*, können durch die intrazellulären PRR erkannt werden und somit eine Immunantwort auslösen (Opitz et al. 2010).

Allerdings sind nicht nur Pathogene in der Lage an PRR zu binden und eine Immunantwort auszulösen. Vielmehr können auch endogene Moleküle, die nach Zellschädigung und/oder Zelltod aus der Zelle in das Zytosol gelangen, PRR aktivieren. Diese normalerweise intrazellulär befindlichen Moleküle werden als *danger-associated molecular patterns* (DAMP) bezeichnet (Opitz et al. 2010). Zu den wichtigsten DAMP zählt das *high mobility group box 1* Protein (HMGB1), ein hochkonserviertes Protein, das einerseits bei Zelltod durch Nekrose passiv freigesetzt, oder andererseits von verschiedenen Zellen, darunter Makrophagen und dendritische Zellen, aktiv sezerniert wird (Klune et al. 2008). Die Bindung von HMGB1 an TLR-2 oder TLR-4 führt MyD88-abhängig zu einer Aktivierung von NF- κ B und dadurch, unter anderem zu einer Expression von proinflammatorischen Mediatoren (Opitz et al. 2010). Auch Hyaluronan und Harnsäure sind wichtige DAMP und in der Lage über die Bindung an TLR oder NLR zu einer Aktivierung des Immunsystems zu führen. Weiterhin zählen zu den DAMP auch lösliche Komponenten wie die Surfactantproteine A (SP-A) und D (SP-D), die ebenfalls an TLR binden können (Tolle und Standiford 2013). Während das Surfactantprotein B vor allem für die Reduktion der Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit (Blut) verantwortlich ist, konnten Kingma und Whitsett darlegen, dass SP-A und SP-D zum einen direkt an Mikroorganismen binden und diese auch lysieren, zum anderen die Aktivität von verschiedenen Immunzellen modulieren und die Phagozytose von apoptotischen Zellen stimulieren (Kingma und Whitsett 2006). Ebenfalls zu den löslichen PRR gehört das Mannose bindende Lektin, das über den sogenannten Lektinweg die Komplementkaskade aktivieren kann (Fraser et al. 1998).

2.1.2.5 Zelluläre Immunität des angeborenen Immunsystems

(Alveolar-) Makrophagen sind ein Teil des unspezifischen bzw. angeborenen Immunsystems. Sie sind als ortsständige Makrophagen in der Lunge zu finden und phagozytieren Partikel, die die alveolokapilläre Membran überwinden konnten. Alveolarmakrophagen besitzen eine hohe Phagozytoseaktivität, sodass kleine Mengen an Pathogenen direkt durch diese Zellen phagozytiert werden können (Mizgerd 2008). Wie Makrophagen gehören auch dendritische Zellen, Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen, aber auch Epithelzellen zum angeborenen Immunsystem (Delclaux und Azoulay 2003). Ihre Aufgaben bestehen hauptsächlich in der unspezifischen Phagozytose von Pathogenen, der Freisetzung von Zytokinen, der Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und der Freisetzung von AMP (Mizgerd 2008).

Erwähnenswert ist auch die Fähigkeit von neutrophilen Granulozyten neben der Phagozytose von Pathogenen eine Art Netz aus antimikrobiellen Proteinen und einer Chromatin-Matrix bilden zu können (Brinkmann et al. 2004). Mit Hilfe dieser *neutrophil extracellular traps* (NET) ist der Granulozyt nicht nur in der Lage Bakterien zu binden und so die Verbreitung ebendieser einzuschränken, sondern es fördert auch die Abtötung von extrazellulären Mikroorganismen durch antimikrobielle Peptide (Brinkmann et al. 2004). Allerdings besitzen einige Bakterien eine DNase, die es ihnen ermöglicht die fibrilläre Matrix durchzuschneiden. Zu diesen zählt auch *S. pneumoniae* (Beiter et al. 2006).

2.1.2.6 Komplementsystem

Aber auch humorale Bestandteile, beispielweise das Komplementsystem, zählen zum angeborenen Immunsystem.

Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen miteinander interagierenden Plasmaproteinen, die zum einen fähig sind, Pathogene zu opsonieren, sodass diese durch phagozytierende Zellen erkannt und aufgenommen werden können. Zum anderen können die Komplementproteine polymerisieren und einen Membranangriffskomplex (*membrane attack complex*, MAC) bilden, der in der Lage ist, Poren in Zellmembranen von Pathogenen zu bilden und somit die Lyse der Zielzelle einzuleiten (Zipfel 2009). Des Weiteren können einige Komplementfragmente (C3a, C4a und C5a) eine Entzündungsreaktion auslösen. Die Komplementkaskade, an deren Ende der MAC steht, kann auf drei verschiedenen Wegen aktiviert werden, den klassischen Weg, den alternativen- und den Lektinweg. Alle drei Wege können allein durch Komponenten des angeborenen Immunsystems ausgelöst werden und funktionieren unabhängig von Antikörpern (Zipfel 2009). Zudem gibt es in den Alveolen einige lösliche antimikrobielle Produkte, die die Abwehr lokal unterstützen. Hierzu gehören Transferrin, Lactoferrin, Lysozym, C-reaktives Protein und Surfactant (Zhang et al. 2000).

2.1.2.7 Zelluläre Immunität des erworbenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem ist eng mit dem erworbenen Immunsystem vernetzt. So werden durch Makrophagen und dendritische Zellen spezifische Antigene an Oberflächenrezeptoren von B- und T-Lymphozyten präsentiert, die sich infolge dessen weiter differenzieren (Chaplin 2010). Des Weiteren werden Zytokine sezerniert, die ebenfalls zur Proliferation der Lymphozyten beitragen.

Antikörper werden von zu Plasmazellen ausdifferenzierten B-Lymphozyten gebildet und ausgeschüttet. Vor allem Immunglobulin A (IgA) spielt in der mukosalen Immunität der Lunge eine entscheidende Rolle. Es kann die Anhaftung von Antigenen verhindern (Zhang et al. 2000).

T-Lymphozyten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in verschiedene Typen unterteilt, die man als T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen, regulatorische T-Zellen sowie T-Gedächtniszellen bezeichnet (Murphy et al. 2009). T-Helferzellen sezernieren verschiedene Zytokine und können sowohl an der zellvermittelten als auch an der humoralen Immunantwort durch Stimulierung von Plasmazellen beteiligt sein. Im Gegensatz dazu erkennen zytotoxische T-Zellen vorrangig virusinfizierte Zellen, in denen sie über Signalwege Apoptose auslösen. Regulatorische T-Zellen bilden eine weitere Untergruppe der Helfer T-Zellen. Sie sind in der Lage sowohl aktivierte T- und B-Zellen als auch Antigen-präsentierende Zellen in ihren Effektorfunktionen zu inhibieren. Durch die Inhibition von autoreaktiven T- und B-Zellen spielen sie eine maßgebliche Rolle in der Aufrechterhaltung der (Selbst)-Toleranz. Sie können aber auch klassische pathogen-spezifische T- und B-Zellantworten unterdrücken, somit kann eine überschießende Kontrolle durch regulatorische T-Zellen zu einer verminderten Immunantwort und einer Ausbreitung von Pathogenen führen (Belkaid 2007).

Eine andere Population von T-Lymphozyten bildet zusammen mit Plasmazellen Gedächtniszellen aus, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen wieder aktiviert werden und so zu einer deutlich schnelleren Immunantwort führen. Eine effektive Abwehr von Pathogenen resultiert demnach aus der strukturierten Zusammenarbeit von angeborenem und erworbenem Immunsystem (Murphy et al. 2009).

Eine besondere Stellung nimmt das bronchienassoziierte lymphatische Gewebe (*bronchial associated lymphoid tissue*, BALT) ein (Bienenstock 1980). Auch wenn BALT in Lungen gesunder Menschen nicht anzufinden ist, so kann es unter bestimmten Voraussetzungen gebildet werden und eine Rolle in der Infektabwehr spielen (Pabst 1992). Es befindet sich vorwiegend in der Schleimhaut an den Aufzweigungen der Bronchien und Bronchiolen. Tango *et al.* konnten in der Maus das Vorhandensein von modifizierten Epithelzellen, den *microfold cells* (M-Zellen) belegen, die das BALT bedecken (Tango et al. 2000). M-Zellen sind in der Lage, Pathogene über ihre apikale Membran *via* Endozytose aufzunehmen, durch die Zellen zu transportieren und anschließend an ihrer basalen Membran den Zellen des spezifischen Immunsystems zu präsentieren (Tango et al. 2000). So kommen B- und T-Lymphozyten des BALT in den direkten Kontakt mit eingeatmeten Partikeln. Weiterhin werden von den Plasmazellen der Schleimhaut (B-Lymphozyten) Immunglobuline sezerniert, welche unter anderem das Anheften von Pathogenen an die Oberfläche der luftleitenden Wege verhindern sollen (Zhang et al. 2000).

2.1.2.8 Zytokine (Interleukin-1 beta, Interleukin-6 und *das keratinocyte-derived chemokine*)

Zytokine sind lösliche niedermolekulare (20-30 kD) Glykoproteine, die sowohl von Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems, aber auch von einer Vielzahl weiterer Zellen gebildet und sezerniert werden. Sie nutzen Signaltransduktionswege über extrazelluläre Rezeptoren und wirken aktivierend oder hemmend auf ihre jeweiligen Zielzellen (Turner et al. 2014). Dabei vermitteln sie ihre Wirkung sowohl autokrin auf die produzierende Zelle selbst als auch parakrin auf benachbarte Zellen oder endokrin über die Blutgefäße auf weiter entfernte Zellen. In dieser Arbeit wurden die Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) sowie das *keratinocyte-derived chemokine* (KC) in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF), im Blut sowie in Überständen humaner Lungenproben bestimmt, sodass hier auf diese fokussiert werden soll.

Das größtenteils von Makrophagen gebildete IL-1 β wird zunächst als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und liegt dann im Zytosol und auch in Lysosomen gespeichert vor. Durch eine Kalzium-abhängige Aktivierung des Inflammasoms kommt es zur Abspaltung des aktiven IL-1 β aus seinem Vorläuferprotein (pro-IL-1 β) und zu dessen Freisetzung. Die Spaltung des IL-1 β erfolgt am NLRP3-Inflammasom (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) einem zytosolischen Proteinkomplex, der aus NLRP3 (NALP3), Caspase-1 und ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain*) besteht (Opitz et al. 2010). Durch die Erkennung von PAMP durch das Inflammasom kommt es zur Aktivierung der Caspase-1, die wiederum für die Spaltung des inaktiven pro-IL-1 β verantwortlich ist (Mariathasan und Monack 2007). Witzernath *et al.* konnten zudem zeigen, dass das NLRP3 Inflammasom auch für die Aufrechterhaltung der alveolokapillären Barrierefunktion von Bedeutung ist (Witzernath et al. 2011). Darüber hinaus gibt es noch weitere Inflammasom-Komplexe, die meist aus einem NLR, dem Adaptermolekül ASC und Caspase-1 bestehen und unterschiedliche PAMP erkennen. Für die Produktion des Zytokins IL-1 β sind demnach zwei Stimuli notwendig: Einerseits eine NF- κ B-abhängige Bildung des pro-IL-1 β , andererseits eine Caspase-1-abhängige Spaltung der inaktiven Vorläuferstufe am Inflammasom (Opitz et al. 2010). IL-1 β wirkt über die Interleukin-1 Rezeptoren und induziert beispielsweise in Endothelzellen über NF- κ B die Synthese von Cyclooxygenase-2 und damit die Bildung von Prostaglandin E2 sowie die Produktion der Zytokine IL-6, Interferon-gamma (INF- γ) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), die anschließend aus Makrophagen freigesetzt werden. Zudem stimuliert IL-1 β die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten aus dem Blut ins Gewebe (Dinarello 2009).

Das Zytokin IL-6 kann von vielen verschiedenen Zelltypen synthetisiert werden, darunter Makrophagen, Lymphozyten, Endothelzellen, Mastzellen und Fibroblasten. Hauptsächlich

wird es jedoch auf einen extrazellulären Stimulus hin von Makrophagen gebildet. Es stimuliert die Bildung von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und die Einleitung einer adaptiven Immunantwort mittels Aktivierung von T-Lymphozyten und Differenzierung von B-Lymphozyten (Delclaux und Azoulay 2003). Daneben sorgt es im Knochenmark für das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen (van Snick 1990). Des Weiteren konnte in Patienten mit Sepsis eine Korrelation von IL-6 Plasmaspiegeln mit dem Schweregrad der Erkrankung gezeigt werden (Damas et al. 1992). In der Neonatologie scheint sich IL-6 in Kombination mit C-reaktivem Protein als Biomarker in der Erkennung von bakteriellen Infektionen zu eignen (Doellner et al. 1998).

Im Gegensatz zu IL-1 β und IL-6 wird das Zytokin IL-8 zu der Untergruppe der Chemokine gezählt (Turner et al. 2014). Chemokine sind eine große Gruppe von Zytokinen, die chemotaktisch aktiv sind. Chemokine sind folglich in der Lage, Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration migrieren zu lassen (Chemotaxis) (Fernandez und Lolis 2002). Auch bei der Auswanderung von Lymphozyten aus dem Blut spielen Chemokine eine Rolle. Bei Nagetieren fehlt ein direktes Pendant zum Chemokin IL-8. Allerdings scheinen unter anderem die Zytokine KC und das *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) funktionell die Aufgaben von IL-8 zu übernehmen, zu denen unter anderem die Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten *via* Chemotaxis zählen (Hol et al. 2010; James et al. 1995). KC wird vor allem von Alveolarmakrophagen und Epithelzellen gebildet (Huang et al. 1992).

2.2 Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen

2.2.1 Definition

Bei einer Pneumonie handelt es sich um eine durch Viren, Bakterien oder Pilze ausgelöste Infektion des Lungengewebes. Diese kann akut oder chronisch verlaufen und sich als interstitielle oder alveoläre Pneumonie auf verschiedene Bereiche der Lunge beziehen. Kennzeichnend für die Entzündung ist eine Verdichtung des Gewebes durch Zellinfiltrate und Exsudate. Daraus resultiert eine Verminderung der Gasaustauschfläche der Lunge (McGavin und Zachary 2009).

2.2.2 Epidemiologie und Einteilung

Nach Angaben des statistischen Bundesamts sind in Deutschland 2012 rund 18 000 Patienten an einer Pneumonie verstorben. Somit rangiert die Pneumonie auf Platz 10 der häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt (Destatis) 2013b). Diese Zahl ist seit 1980 relativ stabil geblieben. Auch weltweit gesehen ist die Pneumonie eine der bedeutendsten Infektionserkrankungen mit hoher Morbidität und Mortalität. Dabei sind besonders Kinder zwischen 0 und 5 Jahren sowie Erwachsene über 70 Jahren betroffen (Welte und Köhnlein 2009).

Die ambulant erworbene Pneumonie bezeichnet dabei all jene Lungenentzündungen des immunkompetenten Menschen, deren auslösendes Agens nicht im Krankenhaus aufgenommen wurde und die ambulant oder innerhalb der ersten 48 Stunden während eines Krankenhausaufenthalts diagnostiziert wurden. Ist aus klinischer Sicht, gestützt durch die Anwendung entsprechender Risikoscores (CRB-65, modifizierter ATS score) (Höffken et al. 2009) die Aufnahme auf eine Intensivstation notwendig, spricht man von einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie (sCAP) (Mandell et al. 2007).

Im Gegensatz dazu spricht man von einer nosokomialen Pneumonie (hospital-acquired pneumonia; HAP), wenn diese sich 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus entwickelt. Neben der ambulant erworbenen und der nosokomialen Pneumonie gibt es weiterhin die Lungenentzündung des beatmeten Patienten (ventilator-associated pneumonia; VAP), die *per definitionem* frühestens 48 - 72 Stunden nach einer endotrachealen Intubation zu diagnostizieren ist (Dalhoff et al. 2012).

Laut des deutschen Kompetenznetzwerks CAPNETZ (german network for community-acquired pneumonia) wurden in den Jahren 2005 und 2006 insgesamt 388 406 Patienten mit einer CAP stationär aufgenommen und behandelt. Dies entsprach einer Inzidenz von 2,75 Fällen im Jahr 2005 bzw. 2,96 Fällen im Jahr 2006 pro 1 000 Einwohnern (Ewig et al. 2009). Besonders im hohen Alter (>70 Jahre) nahm die Inzidenz und auch die Letalität der Erkrankung zu. Dabei wurden die ambulant behandelten Fälle nicht berücksichtigt (Ewig et al. 2009; Pletz et al. 2011). Mögliche prädisponierende Risikofaktoren sind beispielsweise eine vorhergehende Antibiotikatherapie (in den letzten 3 Monaten), das Bewohnen eines Pflegeheims, sowie chronische internistische (Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, terminale Niereninsuffizienz) oder neurologische Begleiterkrankungen (Schlaganfall) (Höffken et al. 2009).

Neben dem individuellen Gesundheitsaspekt ist auch der große ökonomische Faktor der Pneumonie zu berücksichtigen (Welte et al. 2012). Ott *et al.* stellten in zwei prospektiven Studien dar, dass für eine Pneumoniebehandlung im Schnitt ungefähr 1 284 Euro pro Patient

veranschlagt werden müssen. Diese Zahl erhöhte sich auf 2 200 Euro bei Berücksichtigung von Patienten mit Therapieversagen. Jährlich fielen so laut Ott *et al.* allein in Europa Kosten von 10 Milliarden Euro an (Ott *et al.* 2012).

2.2.3 Erreger und Therapie

Bakterielle Erreger sind die Hauptverursacher der CAP (Pletz *et al.* 2011). *Streptococcus pneumoniae* ist der mit Abstand am häufigsten nachgewiesene Erreger in der CAP weltweit und führt häufig zum Tod der Pneumoniepatienten (File 2004). Nur etwa 12 % aller ambulant erworbenen Pneumonien werden hingegen durch Viren hervorgerufen. Hiervon sind Kinder und immunsupprimierte Menschen vorrangig betroffen. Neben respiratorischen Viren wie Influenza-, Rhino- und Adenoviren finden sich dann auch Herpesviren. Von besonderer klinischer Relevanz sind sekundäre bakterielle Pneumonien, die sich während oder nach einer Influenza-Infektion entwickeln (van der Sluijs *et al.* 2010).

Nicht immer ist es möglich, durch Analysen des Blutes oder des Sputums den bzw. die auslösenden Erreger ausfindig zu machen. In Studien des CAPNETZ konnten in 40 % aller Fälle die verantwortlichen Pathogene diagnostiziert werden (Welte und Köhnlein 2009). Neben Pneumokokken werden auch andere Pneumonieerreger wie *Haemophilus influenzae*, *Clamydophila pneumoniae* und *Mycoplasma pneumoniae* nachgewiesen (Welte und Köhnlein 2009). Allerdings findet man diese bei weitem nicht so häufig wie *Streptococcus pneumoniae*. Dagegen findet man bei bakteriell bedingten HAP vorrangig *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* sowie *Klebsiella spp* (Kieninger und Lipsett 2009).

Dieses Erregerspektrum und dessen Gewichtung muss bei der Auswahl der initialen kalkulierten Antibiotikatherapie einbezogen werden. Dazu werden hauptsächlich β -Laktame, Makrolide und Fluorchinolone eingesetzt (Höffken *et al.* 2009).

Trotz spezifischer Antibiotikatherapien ist die Mortalität vor allem bei Patienten mit einer sCAP mit 23 – 50 % hoch (Rodriguez *et al.* 2009). Rodriguez *et al.* untersuchten Patienten auf Intensivstationen, welche an einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie litten. In ihre Observationen nahmen sie dabei nur Patienten auf, welche immunkompetent waren, an einer bewiesenen bakteriellen Pneumonie litten und eine Initialtherapie mit einem retrospektiv resistenzgerechten Antibiotikum erhalten hatten. Es zeigte sich, dass die Mortalität der untersuchten Studiengruppe ungeachtet suffizienter antibiotischer Behandlung bei 23 % lag (Rodriguez *et al.* 2009). Ein Grund für dieses Therapieversagen könnte in der unkontrollierten Aktivierung des Immunsystems und der damit verbundenen Entstehung von ARDS, Sepsis und Multiorganversagen liegen (Matthay und Zimmerman 2005). Im Verlaufe einer Infek-

tion kann es durch massive unkontrollierte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zur Schädigung der Alveolarepithelzellen und Gefäßendothelien kommen, und damit zur Beeinträchtigung der alveolokapillären Barrierefunktion (Hippenstiel und Suttorp 2003; Müller-Redetzky et al. 2014).

2.2.4 Acute Respiratory Distress Syndrome

Ursächlich für das Entstehen des Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) sind unter anderem komplizierte Pneumonieverläufe, (pneumogene) Sepsis, Polytrauma, Lungenkontusion, Fettembolie, Magensaftaspiration oder Schock (Leaver und Evans 2007). Die häufigste Ursache des ARDS ist die Pneumonie (Bersten et al. 2002; Esteban et al. 2004).

Ein Zusammenschluss aus internationalen Experten der *European Society of Intensive Care Medicine*, der *American Thoracic Society* und der *Society of Critical Care Medicine* veröffentlichte im Jahr 2012 mit der Berlin-Definition eine überarbeitete Definition des ARDS. Dabei wurden unter anderem die Schwere der Hypoxämie und die Oxygenierung des beatmeten Patienten berücksichtigt. Ferner entfiel die Bezeichnung des *acute lung injury* (ALI) für die milde Form des ARDS. Nach neuer Definition handelt es sich bei einem Quotienten von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2)/ inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FiO_2) = 201 – 300 mmHg, bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) ≥ 5 cm H_2O um ein mildes ARDS. Ein moderates ARDS liegt bei einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 101 - 200$ mmHg und einem PEEP ≥ 5 cm H_2O vor, und ein schweres ARDS bei einem $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg und einem PEEP ≥ 5 cm H_2O (ARDS Definition Task Force et al. 2012). Weiterhin muss *per definitionem* ein akuter Beginn (innerhalb einer Woche) vorliegen. Die Röntgenaufnahme oder Computertomographie des Thorax muss bilaterale Verdichtungen aufweisen und ein kardiogenes Ödem ist beispielsweise mittels Echokardiographie auszuschließen. Die Durchführung einer Rechtsherzkatheteruntersuchung ist nicht mehr obligat (ARDS Definition Task Force et al. 2012). Ein zentraler Pathomechanismus des akuten Lungenversagens ist die pulmonalvasculäre Permeabilitätserhöhung an der alveolokapillären Barriere und das daraus resultierende proteinreiche Lungenödem. Die alveolokapilläre Membran besteht aus dem Kapillarendothel und den Alveolarepithelzellen, die aus den Pneumozyten Typ I (Deckzellen) und Typ II (Nischenzellen) bestehen. Die anfälligeren Typ I Zellen machen bis zu 90 % der Alveolaroberfläche aus, während die resistenteren Typ II Zellen die restlichen 10 % einnehmen. Während die Typ I Zellen vorrangig für die Aufrechterhaltung der alveolokapillären Barriere sorgen und arm an Zellorganellen sind, bilden die Typ II Pneumozyten Surfactant, sind für den Ionen-Transport zuständig und können sich in Typ I Zellen differenzieren (Ware und Matthay 2000). Die Basallaminae des Kapillarendothels und der Pneumozyten sind fest mit-

einander verbunden. Mediatoren, die während der Pneumonie freigesetzt werden, können direkt die vaskuläre Permeabilität erhöhen. Dazu gehören unter anderem IL-1 β (Frank et al. 2007), IL-6, IL-8 und TNF- α . Neutrophile Granulozyten können reaktive Sauerstoffverbindungen, Proteasen und andere proinflammatorische Mediatoren freisetzen, welche die Lungenschädigung weiter verstärken (Mizgerd 2008). Zudem können im Alveolarraum bakterielle Produkte und Toxine die alveolokapilläre Membran lokal weiter schädigen und somit zu einer erhöhten pulmonalen Permeabilität führen. Es bilden sich durch auseinanderweichende Endothelzellen Spalten zwischen den Zellen (Müller-Redetzky et al. 2014; Schnittler et al. 1990). Die alveoläre Flüssigkeitsclearance sorgt als aktiver Prozess (ATP-abhängige Na⁺/K⁺-Pumpe) in der gesunden Lunge für ein Gleichgewicht zwischen Flüssigkeitsresorption und –filtration (Bein und Pfeifer 2010). Ist die endotheliale Barrierefunktion gestört, kommt es zum Austritt von Flüssigkeit, Zellen und Proteinen in das Lungengewebe, sodass ein proteinreiches Ödem im Interstitium und im Alveolarraum entsteht. Durch das Ödem werden die Zellen weiter geschädigt und es kommt unter anderem zur verminderten Bildung und Inaktivierung von Surfactant. Zudem wird durch die Zerstörung der Pneumozyten Typ II der Abtransport der Ödemflüssigkeit kompromittiert (Ware und Matthay 2000). Die beschriebenen Veränderungen können letztendlich in einer relevanten Diffusionsstörung und daraus resultierender Hypoxämie münden, die dazu führt, dass der Patient beatmet werden muss.

2.2.5 Sepsis

Die Immunantwort infolge einer Infektion in der Lunge läuft zunächst lokal und kontrolliert ab. Je nach Schwere der Infektion kann auch eine systemische Komponente hinzukommen. Entsteht dabei allerdings ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen und Mediatoren, kann eine generalisierte systemische Hyperinflammation die Folge sein (Sagy et al. 2013). Abhängig von Faktoren des Pathogens und des Wirtes resultiert so eine Sepsis, die in einen septischen Schock münden kann. Letztendlich können diese Vorgänge ein Multiorganversagen (*multi organ dysfunction syndrom* MODS) hervorrufen (Annane et al. 2005). Neben einer effektiven antimikrobiellen Therapie, die das körpereigene Immunsystem unterstützt, spielt demnach die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle für das Ausmaß und den Verlauf der Pneumonie. Immunmodulation zusätzlich zu einer effektiven antimikrobiellen Therapie könnte hier unterstützend eingreifen. Aus diesem Grund wäre es wünschenswert, Substanzen zu identifizieren, die neben antimikrobiellen Eigenschaften auch über eine immunmodulierende Komponente verfügen.

2.3 *Streptococcus pneumoniae*

Die Mitglieder der Gattung *Streptococcus* kennzeichnet ihre kugelförmige bis ovale Form, das grampositive Färbeverhalten sowie ihre Eigenschaft, sich paarweise als Diplokokken oder, vor allem in Flüssignährmedium, in Ketten anzuordnen (Hahn et al. 2009; Selbitz et al. 2011). Streptokokken bilden keine Sporen, sind unbegeißelt und damit unbeweglich. Durch ihre Fähigkeit zur Milchsäuregärung werden Streptokokken der Ordnung der *Lactobacillales* zugerechnet. Optimale Wachstumsbedingungen finden die fakultativen Anaerobier bei 5 % CO₂ und 37 °C (Hahn et al. 2009; Selbitz et al. 2011). Auf bluthaltigen Nährmedien bildet *Streptococcus pneumoniae* durch die Reduktion von Hämoglobin zu Methämoglobin mittels Wasserstoffperoxid eine vergrünende alpha-Hämolyse aus (Hahn et al. 2009; Selbitz et al. 2011).

Des Weiteren wird die Gattung *Streptococcus* taxonomisch zur Familie der *Streptococcaceae* gezählt, der wiederum eine Vielzahl an unterschiedlichen *Streptococcus* Spezies angehören (Hahn et al. 2009). Zu diesen Spezies zählt auch der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie *Streptococcus pneumoniae*. Erstmals 1881 zeitgleich in den USA von George Sternberg und in Frankreich von Louis Pasteur als eigene Spezies innerhalb der Streptokokken beschrieben, werden derzeit je nach Literaturquelle bis zu 91 Pneumokokken-Serotypen unterschieden (AlonsoDeVelasco et al. 1995; Kadioglu et al. 2008). Dabei gibt es bekapselte und unbekapselte Stämme. Lediglich 23 der über 90 verschiedenen Serotypen sind Verursacher der durch Pneumokokken hervorgerufenen Erkrankungen (Pletz 2005).

Mithilfe der als C-Substanz bezeichneten zellwandständigen Polysaccharide oder Lipoteichonsäure können die verschiedenen Streptokokken Spezies in die etablierten Lancefieldgruppen A-V eingeteilt werden (Lancefield 1928). Die Zuordnung von gruppenspezifischen Antigenen erfolgt dabei mittels Latexagglutinationstest oder Präzipitationsreaktionen. Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Gattung *Streptococcus* besitzt *S. pneumoniae* keine C-Substanz, sodass eine Zuordnung zu den Lancefieldgruppen nicht möglich ist (Hahn et al. 2009; Selbitz et al. 2011). Vielmehr erfolgt die Unterscheidung von *S. pneumoniae* in die einzelnen Serotypen anhand ihrer Kapselpolysaccharide (Dänische Nomenklatur). Hierzu kann man die Kapselquellungsreaktion von Neufeld heranziehen, bei der eine Agglutination mit Antiseren durchgeführt wird (Neufeld 1902).

Pneumokokken kommen natürlicherweise im menschlichen Nasopharynx vor und kolonisieren die Schleimhäute des oberen Atemtrakts meist asymptomatisch bei circa 50 % aller Kinder und 5 % aller Erwachsenen (Pletz 2005). Durch Tröpfcheninfektion kommt es zu einer Übertragung von *S. pneumoniae* von Mensch zu Mensch (Kadioglu et al. 2008). Gefördert

durch Störung der lokalen und/oder systemischen Immunfunktion, beispielsweise durch eine vorausgegangene Virusinfektion, können die Pneumokokken ausgehend vom Nasopharynx die Nasennebenhöhlen und auch das Innenohr besiedeln. Es entstehen so lokale Infektionen, wie *Sinusitis* und *Otitis media* (Donkor 2013). Kommt es durch Aspiration oder Inhalation zur Verschleppung der Erreger in den unteren Respirationstrakt kann eine Lobärpneumonie die Folge sein. Ausgelöst durch starke Vermehrung der Bakterien und der damit eintretenden Nährstoffknappheit kann es zu einer erhöhten Autolyse der Bakterienzellen kommen, sodass in kurzer Zeit sehr viele Virulenzfaktoren auf einmal frei werden. Die dadurch hervorgerufenen Entzündungsreaktionen bedingen eine starke Schädigung des Lungengewebes. Breitet sich die zunächst lobär begrenzte Pneumonie weiter aus, kann es zur Entstehung eines ARDS kommen. Durch die Überwindung der alveolokapillären Barriere kommt es zur Verschleppung der Pneumokokken über das Blut in andere Organsysteme (Müller-Redetzky et al. 2012). Gelangen die Erreger in den Pleuraspalt kann ein Empyem entstehen, welches eine häufige Komplikation der Pneumokokkenpneumonie darstellt. Nach Überwindung der Blut-Hirn-Schranke kann eine bakterielle Meningitis hervorgerufen werden, die beim erwachsenen Menschen häufig auf eine Pneumokokkeninfektion zurückzuführen ist (Donkor 2013). Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung können Perikarditis, Endokarditis und hämolytische Anämie den Krankheitsverlauf verkomplizieren und zur Erhöhung der Mortalitätsraten beitragen.

2.3.1 Virulenzfaktoren

2.3.1.1 Kapsel

Die Polysaccharidkapsel dient den Pneumokokken als wichtiger Virulenzfaktor. So ist die Virulenz bekapselter Stämme um einiges höher als jene der unbekapselten. Die Polysaccharide der Kapsel verhindern eine Opsonierung der Pneumokokken durch den Bestandteil C3b des Komplementsystems (Mitchell und Mitchell 2010) und damit die Einleitung des alternativen Weges der Komplementaktivierung (Fine 1975), sodass eine gezielte Phagozytose durch Zellen des Immunsystems erschwert ist.

Einige Serotypen zeigen des Weiteren eine Phasenvariation in der Expression ihrer Kapsel. Dies bedeutet, dass diese Erreger in der Lage sind, ihre Erscheinungsform so zu ändern, dass eine bessere Anheftung des Bakteriums an Zellen des Wirtes möglich ist, oder aber eine höhere Virulenz erreicht wird. Hammerschmidt *et al.* konnten in einer elektronenmikroskopischen Studie zeigen, dass im Infektionsverlauf Pneumokokken ohne direkten Kontakt

zu Endo- oder Epithelzellen des Lungengewebes eine deutlich stärkere Kapsel aufwiesen als jene Bakterien, die in direktem Kontakt mit den Zellen standen (Hammerschmidt et al. 2005). Zudem macht es die Kapsel den Bakterien möglich, sich dem Abtransport aus den Atemwegen durch den Mukus zu entziehen, da die negativ geladene Kapsel nicht am Mukus haften bleibt (Nelson et al. 2006).

2.3.1.2 Pneumolysin

Ein essentieller Virulenzfaktor der Pneumokokken, der von allen klinischen Isolaten exprimiert wird, ist das Pneumolysin (Mitchell und Mitchell 2010). Pneumolysin ist ein 53 kDa großes thiol-aktiviertes Toxin und befindet sich im Zytoplasma des Bakteriums. Es wird beim Wachstumsprozess oder bei der Autolysin (LytA) vermittelten Autolyse der Bakterien freigesetzt (Jedrzejewski 2001, Paton et al. 1993). Wird die stationäre Wachstumsphase der Pneumokokken, beispielsweise infolge einer Antibiotikabehandlung erreicht, kommt es zur Lyse der Bakterienzelle und zytosolische Proteine können aus dem Inneren austreten. Balachandran *et al.* konnten allerdings eine LytA unabhängige Freisetzung des Pneumolysins zeigen (Balachandran et al. 2001).

Über eine Cholesterol vermittelte Bindung an die Wirtszelle kommt es durch Pneumolysin zur Bildung von Transmembranporen und infolge dessen zur Lyse der Wirtszelle (Jedrzejewski 2001). Seine zytotoxische Aktivität wirkt sich auch auf das Flimmerepithel aus, indem der Zilienschlag reduziert wird (Steinfurt et al. 1989). Dadurch kann der produzierte Mukus nicht mehr effektiv abtransportiert werden und die Bakterien breiten sich aus. Zudem schädigt Pneumolysin die alveolokapilläre Barrierefunktion. Das durch den Flüssigkeitsaustritt entstandene, eiweißreiche Alveolarödem könnte als idealer Nährboden für die weitere Vermehrung der Bakterien dienen. Pneumolysin unterstützt demnach die Replikation der Pneumokokken in den Alveolen sowie die weitere Ausbreitung der Bakterien in die Lunge und Gefäße (Rubins et al. 1995). Pneumolysin kann in sublytischen Konzentrationen über eine Stimulierung von Monozyten und der damit verbundenen Freisetzung von TNF- α und IL-1 β auch proinflammatorisch wirken (Houldsworth et al. 1994). Auch für die Immunantwort bei einer Infektion mit *S. pneumoniae* spielt das Toxin eine entscheidende Rolle (Paton et al. 1993). Es kann den klassischen Komplementweg aktivieren und wird möglicherweise durch NLRP-3 und durch TLR-4 erkannt (Malley et al. 2003; Witztenrath et al. 2011). Des Weiteren konnten Witztenrath *et al.* zeigen, dass Pneumolysin zu einem Anstieg der Konzentration des plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) in der Lunge von Mäusen führt. Damit verbunden ist eine akute pulmonale Hypertonie und mikrovaskuläre Schrankenstörung, die beide kennzeichnend für das ARDS sind (Witztenrath et al. 2007).

2.3.1.3 Cholinbindungsproteine

Wie bei allen grampositiven Bakterien enthält die Peptidoglykanschicht der Zellwand von *S. pneumoniae* Teichon- und Lipoteichonsäuren. Diese beinhalten eine wichtige Bindungsstelle für Proteine, das Phosphorylcholin (Jedrzejewski 2001). Zu den Cholinbindungsproteinen zählen weitere wichtige Virulenzfaktoren wie die *pneumococcal surface* Proteine A (PspA) und C (PspC auch CbpA genannt) sowie das LytA. So scheinen PspA und PspC eine wichtige Rolle in der Kolonisierung des Nasopharynx und der Adhärenz des Bakteriums an Lungenepithelzellen zu spielen (Balachandran et al. 2002). Neben der Fähigkeit Proteine zu binden, kann das Phosphorylcholin mit dem Rezeptor für den PAF, der sich auf Endothelzellen befindet, interagieren (Cundell et al. 1995). Nach Assoziation an diesen Rezeptor, erfolgt die Aufnahme des Bakterien-Rezeptor-Komplexes *via* Endozytose in die Endothelzelle. Dieser Vorgang ist vermutlich auf durch Inflammation aktivierte Zellen beschränkt und lediglich der transparente Phänotyp ist aufgrund seiner Oberflächenstruktur in der Lage, an den PAF-Rezeptor zu binden (Cundell et al. 1995). Vom Inneren der Zellen aus können die Bakterien in die Blutgefäße transmigrieren, sich mit dem Blutstrom in andere Organe ausbreiten, diese infizieren und so beispielsweise zu Meningitis führen (Ring et al. 1998).

Des Weiteren sind Enzyme wie Neuraminidase und Hyaluronidase an die Zellwand assoziiert. Mit Hilfe der Hyaluronidase sind Pneumokokken in der Lage Hyaluronsäure, einen wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, abzubauen. Dies ermöglicht es den Pneumokokken leichter ins Gewebe einzudringen. Einige Autoren vermuten weiterhin, dass der Abbau der Hyaluronsäure den Übertritt der Kokken zwischen verschiedenen Geweben erleichtert und auch eine Rolle in der inflammatorischen Antwort in der Lunge spielen könnte (Boulnois 1992; Mitchell und Mitchell 2010; Paton et al. 1993).

2.3.2 Resistenzsituation

In den letzten 20 Jahren hat die Anzahl antibiotikaresistenter Pneumokokkenstämme stark zugenommen. Auch wenn in Deutschland im Vergleich zu anderen europäischen Ländern der Anteil an Penicillin-resistenten Pneumokokken mit ungefähr 6 % sehr niedrig ist (Griechenland ca. 57 %, Frankreich ca. 49 %, Spanien ca. 40 %) (Woodhead 2009), so liegt die klinisch bedeutsamere Makrolidresistenz mit 15 % im relevanten Bereich (Imöhl et al. 2010; Reinert et al. 2002).

Streptococcus pneumoniae besitzt keine Betalaktamasen. Durch die Expression von modifizierten Penicillin Bindungsproteinen (PBP) verschiedener Serotypen kommt es jedoch trotz-

dem zur Ausbildung und Verbreitung von Resistenzen gegen β -Laktam Antibiotika. Trotz der bisherigen geringen Relevanz der β -Laktam-Resistenzen in Deutschland ist zu bemerken, dass es in nur 8 Jahren zu einer deutlichen Steigerung der Resistenzrate von circa 2 % auf 6 % kam (Reinert et al. 2002). Auch in den letzten Jahren konnte eine leichte Zunahme der Penicillin-resistenten Pneumokokkenstämme beobachtet werden (Imöhl et al. 2014). Dies zeigt deutlich den dynamischen Prozess, dem die Resistenzbildung unterliegt und dass nach alternativen und adjuvanten Therapiemöglichkeiten gesucht werden muss. Für die Zunahme der Resistenzraten gibt es verschiedene Ursachen. Zum einen kann ein unkontrollierter Einsatz von Breitbandantibiotika zur Selektion resistenter Stämme führen. Andererseits sind Pneumokokken in der Lage, mithilfe von Bakteriolytinen andere, nicht kompetente Bakterien derselben Spezies zu lysieren, sodass die Aufnahme bakterieller DNA und damit horizontaler Genshift möglich ist (Havarstein et al. 2006). Auch der Austausch von DNA zwischen *S. pneumoniae* und nah verwandten Streptokokkenspezies wie *Streptococcus oralis* oder *Streptococcus mitis* ist möglich (Pletz 2005). *S. pneumoniae* hat natürlicherweise eine stark ausgeprägte Fähigkeit zur Transformation. Dies erleichtert den Austausch von Genen untereinander (Bondi et al. 2012). Ein weiterer Grund für die schnelle Verbreitung von resistenten Pneumokokkenstämmen über internationale Grenzen hinaus liegt in der gestiegenen Mobilität der Menschen im Lauf der letzten Jahrzehnte. Als Beispiel hierfür sei der Penicillin- und Makrolid-resistente Klon Spain 23F genannt, der sich von Spanien aus weltweit verbreitet hat (Reinert et al. 2003). Es ist nicht auszuschließen, dass es zukünftig zu einer Verschlechterung der Resistenzlage und durch den vermehrten Einsatz neuerer Antibiotika zu Bildung weiterer Resistenzen bis hin zu Multiresistenzen kommt. Daher sind modifizierte antimikrobielle Therapieansätze wünschenswert.

2.3.3 Impfung

Das zunehmende Auftreten von Resistenzen macht eine effektive Prävention der Erkrankung besonders wichtig. Vorbeugend steht ein unkonjugierter Impfstoff gegen Pneumokokken zur Verfügung. Dieser ist basierend auf den Kapselantigenen der Pneumokokken entwickelt worden und beinhaltet Antigene der 23 zur Entwicklungszeit am häufigsten vorkommenden pathogenen Serotypen (Pneumovax 23™). Die ständige Impfkommission des Robert Koch Instituts empfiehlt derzeit die Impfung mit dem polyvalenten unkonjugierten Pneumokokken-Impfstoff als Standardimpfung bei Erwachsenen über 60 Jahren und bei Personen, die einer besonderen Gefährdung unterliegen (Robert Koch-Institut (RKI)).

Des Weiteren ist in Deutschland ein konjugierter Impfstoff zugelassen, der Antigene von 13 verschiedenen Pneumokokken Serotypen beinhaltet (Prevenar13®). Dieser ist seit Oktober

2011 für Erwachsene ab 50 Jahren, seit Januar 2013 für alle Kinder (ab 6 Wochen) und Jugendliche bis 17 Jahre und seit Juli 2013 für alle Erwachsenen zugelassen. Es besteht allerdings die Gefahr, dass ein Einsatz einzelner Serotypen für Impfstoffe eine Verschiebung in Richtung der nicht integrierten Serotypen hervorruft und diese dann häufiger für Erkrankungen verantwortlich sind (Reinert 2009; Tan 2003).

2.4 Antibiotika und Immunmodulation

Trotz Bemühungen, mithilfe geeigneter medikamentöser Therapien und Impfungen die Morbidität und Mortalität der ambulant erworbenen Pneumonie zu senken, hat sich die Sterberate in den letzten Jahren kaum verändert (Pletz 2005). Neue Therapiekonzepte, die auf einer Modulation des Immunsystems zur Limitierung überschießender Immunreaktionen beruhen, könnten ein vielversprechender Ansatz sein.

Bereits seit über 20 Jahren vermutet man eine antiinflammatorische Aktivität von Makroliden (Amsden 2004; Umeki 1993). Die potenziell immunmodulierende Wirkung von Makroliden wurde in einer Vielzahl von Studien untersucht (Amsden 2004). So konnte gezeigt werden, dass Erythromycin die Freisetzung von IL-8 und *epithelial cell-derived neutrophil attractant* (ENA-789) im Blut inhibierte (Schultz et al. 2000). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Clarithromycin die LPS-induzierte IL-8 Produktion in humanen Monozyten und in THP-1 Zellen, eine humane, leukämische, monozytäre Zelllinie, unterdrücken konnte (Kikuchi et al. 2002). Einen Überblick über die Wirkung von Makroliden auf das Immunsystem bietet die Arbeit von Kanoh und Rubin (Kanoh und Rubin 2010).

Eine retrospektive Arbeit lässt die positive Wirkung einer additiven Makrolidtherapie auf das bessere Überleben von Pneumoniepatienten vermuten. Ergebnis dieser Studie war, dass die Addition eines Makrolid-Antibiotikums zu einer Therapie mit β -Lactam Antibiotika das Überleben von intubierten Patienten mit einer schweren CAP verbesserte. Ursächlich für diese Beobachtung schien nicht eine verbesserte antimikrobielle Aktivität der Wirkstoffkombination zu sein. Demnach könnte eine immunmodulatorische bzw. antiinflammatorische Wirkung von Makroliden vermutet werden (Martin-Loeches et al. 2010).

Neben der Ermittlung des genauen Mechanismus, der hinter der antiinflammatorischen Funktion steckt, wurden seither weitere Substanzen gesucht, die ein adjuvantes Potenzial auf das Immunsystem innehaben könnten (Tauber und Nau 2008).

2.4.1 Fluorchinolone

Abgesehen von ihren gut untersuchten antimikrobiellen Eigenschaften scheinen Fluorchinolone mit einer Cyclopropylgruppe an erster Position der Chinolon-Grundstruktur einen antiinflammatorischen Effekt zu besitzen. Hierzu zählen unter anderem Ciprofloxacin und Moxifloxacin (Dalhoff 2005).

Fluorchinolone sind eine Untergruppe der Chinolone und gehören damit zu den Gyrasehemmern. Diese wirken bakterizid bzw. in geringeren Konzentrationen teilweise auch bakteriostatisch, indem sie durch die Bindung an die bakterielle Gyrase zu einer Hemmung der bakteriellen Replikation führen. Abbildung 1 zeigt die Grundstruktur der Chinolone (modifiziert nach Andersson und MacGowan 2003).

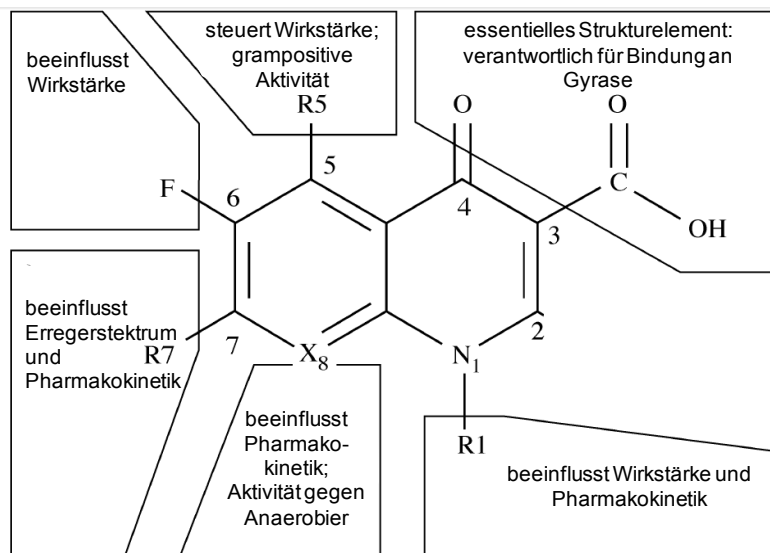


Abbildung 1: **Grundstruktur der Chinolone modifiziert nach Andersson und MacGowan** (Andersson und MacGowan 2003); X= Kohlenstoff

Nalidixinsäure wurde 1962 als erstes antimikrobiell wirksames Chinolon eher zufällig synthetisiert und zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt (Emmerson und Jones 2003). Jedoch hatten die frühen Chinolone keine Wirksamkeit gegen gram-positive Organismen. Das Wirtsspektrum und die antimikrobielle Wirksamkeit wurden durch die Substitution eines Piperazinrings an Position 7 und einem Fluoratom an Position 6 deutlich gesteigert (Andersson und MacGowan 2003). Allerdings konnten erst zwischen 1985 und 1990 Chinolone entwickelt werden, die auch systemisch einen guten Nutzen versprachen. Weitere strukturelle Veränderungen des Chinolon-Grundgerüsts trugen erheblich zur Verbesserung der antimikrobiellen Aktivität, vor allem gegen gram-positive Keime und zur besseren oralen Verfügbarkeit bei, sodass heute eine Vielzahl an verschiedenen Molekülen patentiert sind (Andersson und MacGowan 2003).

Die heute eingesetzten Fluorchinolone besitzen eine gute Bioverfügbarkeit sowie günstige pharmakokinetische Eigenschaften wie eine hohe Gewebegängigkeit, darüber hinaus verfügen sie über ein breites Wirtsspektrum und haben wenig unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Moxifloxacin ist ein solches neueres Fluorchinolon und zeichnet sich durch seine Methoxygruppe (8-Methoxyfluorchinolon) aus. Es wurde speziell für die Behandlung von Atemwegserkrankungen entwickelt. Dabei minimiert die Methoxygruppe die Fotoreaktivität dieser Verbindung, die andere Chinolone, beispielsweise Clinafloxacin, Fleroxacin oder Sparfloxacin, innehaben (Andersson und MacGowan 2003).

2.4.1.1 Moxifloxacin

Moxifloxacin wird heute vor allem für die Behandlung von chronischer Bronchitis, Pneumonie, Haut- und Weichteilgewebsinfektionen und zunehmend auch in der Therapie von multi-resistenter Tuberkulose eingesetzt (Schaberg et al. 2012).

Moxifloxacin hat eine hohe Wirksamkeit gegen Bakterien, die vorrangig Infekte der Atemwege verursachen, darunter *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Anaerobier (Aldrige und Ashcraft 1997) und atypische Erreger wie *Chlamydomphila pneumoniae* (Woodcock et al. 1997). Auch gegen Pneumokokken, die β -Laktamasen (Reinert et al. 1998) bilden oder Resistenzen gegen Makrolide oder Tetrazykline aufweisen, ist es wirksam. Des Weiteren ist Moxifloxacin ebenfalls gegen die Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* aktiv (Miyazaki et al. 1999; Pascual et al. 1999). Allerdings hat Moxifloxacin bedingt durch die Veränderungen am Molekül kaum noch eine Wirkung gegen *Pseudomonas aeruginosa* (Woodcock et al. 1997). Es besitzt eine lange Halbwertszeit (12 Stunden), sodass eine einmalige Dosis von 400 mg täglich zur Behandlung ausreichend ist, um Konzentrationen oberhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für relevante Pathogene zu erreichen (Stass et al. 1998). Moxifloxacin penetriert in phagozytierende (neutrophilen Granulozyten, Makrophagen) und nicht-phagozytierende Zellen (Epithelzellen). Dabei erreicht es höhere intrazelluläre als extrazelluläre Konzentrationen und bleibt intrazellulär in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auch weiterhin aktiv (Pascual et al. 1999).

Die bakterizide Wirkung des Moxifloxacins wird durch die Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II (Gyrase) und IV vermittelt. Durch die Bindung an diese beiden für die Replikation, Transkription und DNA-Reparatur des Bakteriums essentiellen Enzyme, wird unter anderem durch Induktion der SOS-Antwort der prokaryotische Zelltod eingeleitet. Die Topoisomerase IV spielt zudem eine Rolle in der Teilung der Bakterienchromosome. Ist diese gehemmt, tritt der Zelltod ein. Die Topoisomerasen der Eukaryoten werden durch die in der

Klinik eingesetzten Konzentrationen der Gyrasehemmer nicht angesprochen (Emmerson und Jones 2003).

Im Anschluss an die orale Einnahme wird Moxifloxacin fast vollständig aus dem Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Die Bioverfügbarkeit liegt bei über 85 %. Jedoch verringert sich die Absorptionsrate bei gleichzeitiger Nahrungsaufnahme (Balfour und Wiseman 1999). Vom Blut ausgehend, in dem es zu geringeren Anteilen als andere Fluorchinolone an Serumalbumin gebunden ist, verteilt sich Moxifloxacin zügig im Körper (Wise 2003). Die Eliminierung des Medikaments erfolgt unverändert über Leber und Nieren ohne Beteiligung des Cytochrom P 450 Metabolismus (Stass und Kubitzka 2001). Jedoch überwiegt der hepatische Weg, weshalb von der Einnahme von Moxifloxacin bei fulminanten Leberschäden abgeraten wird. Zudem kann es in seltenen Fällen zu schweren Hautreaktionen kommen (Bayer Vital GmbH MED-Information Leverkusen 2008). Weitere unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Moxifloxacin sind neben gastrointestinalen Beschwerden wie Nausea und Diarrhö zentralnervöse Störungen sowie eine mögliche Verlängerung der QT-Zeit (Oliphant und Green 2002). Zudem kann es unter Moxifloxacin wie unter anderen Fluorchinolonen zu chondrotischen Effekten kommen. Des Weiteren sind Sehnenentzündungen und -rupturen vor allem bei älteren Patienten beschrieben (Burkhardt et al. 2004; Stahlmann und Lode 2013).

Resistenzen gegen (Fluor-)Chinolone sind vor allem bedingt durch Veränderungen in der Struktur des Zielenzym der Topoisomerase II und/oder IV. Dabei kann sowohl die A als auch die B Untereinheit der Enzyme betroffen sein. Einen anderen Resistenzmechanismus stellen Effluxpumpen dar, die die intrazelluläre Konzentration der Chinolone in den Bakterien senken können und so die Selektion resistenter Mutanten fördern, indem die MHK heraufgesetzt wird (El Garch et al. 2010). Da Moxifloxacin beide Topoisomerase-Typen anspricht und in einer Konzentration angewendet wird, die weit oberhalb der MHK liegt, wird die Wahrscheinlichkeit für eine Resistenzbildung als gering eingeschätzt (Blondeau et al. 2001; Miravittles 2005).

In unterschiedlichen *in vitro* Studien wird ein immunmodulatorischer Effekt von Moxifloxacin beschrieben, der über die bakterizide Wirkung des Medikamentes hinausgeht. So konnten Zimmermann *et al.* darstellen, dass Moxifloxacin die spontane und TNF- α induzierte Freisetzung von IL-8 und des *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) aus humanen Bronchialepithelzellen stärker hemmte als Azithromycin, Levofloxacin und Cefuroxim (Zimmermann et al. 2009). In einer anderen Studie konnte eine signifikante Reduktion von IL-1 α und TNF- α aus humanen Monozyten, die mit LPS stimuliert und mit Moxifloxacin (1, 5, 10 mg/ml) behandelt wurden, gezeigt werden. Allerdings zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Moxifloxacin auf die Sekretion von IL-4, -6 und -12 in diesem Versuchsansatz. Weiterhin wurden in derselben Studie Monozyten mit hitzeinaktiviertem *Staphylococcus au-*

reus stimuliert. Hier war Moxifloxacin nicht effektiv in der Verminderung der durch die Bakterienstimulation ausgelösten Zytokinproduktion (Araujo et al. 2002). In einem ähnlichen Versuchsansatz konnten Donnarumma *et al.* ebenfalls die Reduktion der Freisetzung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-8 aus humanen Alveolarepithelzellen darstellen, die mit LPS vorstimuliert und anschließend mit Moxifloxacin (10 μ g/ml) behandelt wurden (Donnarumma et al. 2007).

Mechanismen, die hinter der vermuteten immunmodulatorischen Funktion von Moxifloxacin stehen, waren Gegenstand weiterer Untersuchungen. Dabei wurden zum einen Monozyten nach Vorbehandlung mit Moxifloxacin (5 - 20 μ g/ml) mit LPS, IL-1 β oder TNF- α stimuliert und neben der Zytokinfreisetzung molekulare Signalwege bestimmt. Es ließ sich eine dosisabhängige Reduktion der Sekretion von IL-1 β , IL-8 und TNF- α feststellen. Des Weiteren konnte die Inhibierung von wichtigen, in der Entzündung eine Rolle spielenden Enzymen beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um NF- κ B, mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK), *Extracellular-signal Regulated Kinases* (ERK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) (Weiss et al. 2004).

In einer weiteren Studie wurden die humanen Bronchialepithelzelllinien IB3 und C38 mit TNF- α , IL-1 β oder LPS stimuliert und anschließend mit Moxifloxacin, Ciprofloxacin oder Azithromycin (je 5 - 50 μ g/ml) inkubiert. Bei IB3 Zellen handelt es sich um immortalisierte Bronchialepithelzellen, die ursprünglich aus einem Patienten mit zystischer Fibrose isoliert wurden. Sie weisen einen für cystische Fibrose typischen Defekt im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR), einem Chloridkanal, auf. C38 Zellen besitzen diesen Defekt nicht. Auch in dieser Studie wurde eine dosisabhängige Inhibierung der Zytokinfreisetzung, der JNK Aktivität sowie NF- κ B Aktivierung unter Moxifloxacin festgestellt, während Ciprofloxacin lediglich in der höchsten Dosis einen Effekt aufwies (Blau et al. 2007). Dieselben Signalwege wurden in einer weiteren Studie inhibiert, in der A549 Lungenepithelzellen zunächst mit Moxifloxacin (2,5 - 10 mg/l) inkubiert und anschließend mit IL-1 β oder IFN- γ aktiviert wurden. Zusätzlich konnte eine Inhibierung der Zytokin-induzierten NO-Sekretion beobachtet werden (Werber et al. 2005). Analoge Ergebnisse konnten in einer Versuchsreihe gezeigt werden, in der Monozyten mit hitzeinaktivierten Pneumokokken, LPS, *E. coli* oder Lipoteichonsäure stimuliert wurden. Choi *et al.* sahen dabei neben einer Reduktion der IL-6 Sekretion nach allen Stimuli durch Moxifloxacin auch, dass der Anteil CD 14+ Zellen an der Gesamtpopulation nach Moxifloxacin-Behandlung abnahm (Choi et al. 2003).

In vitro und tierexperimentelle Untersuchungen zeigten in der Infektion mit *Candida albicans* oder *Aspergillus fumigatus* ebenfalls eine reduzierte Zytokinantwort nach einer Behandlung mit Moxifloxacin. Auch in diesen Experimenten wurden die bereits oben erwähnten Signalwege, die in der Entzündung eine Rolle spielen, gehemmt und das Überleben von infizierten

Mäusen verbessert. Da Fluorchinolone an sich keine antifungalen Eigenschaften aufweisen, könnte das immunmodulatorische Potenzial von Moxifloxacin für die Ergebnisse verantwortlich sein (Shalit et al. 2002; Shalit et al. 2006).

In einer klinischen retrospektiven Studie wurden Anzeichen gefunden, die das verbesserte Überleben von Patienten mit einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie (CRB-65 2-3) unter Moxifloxacin-Therapie verglichen mit einer β -Laktam Behandlung vermuten lassen (Ewig et al. 2011). In dieser Studie wurden keine Mechanismen, die für das verbesserte klinische Ergebnis in der Moxifloxacingruppe verantwortlich sein könnten, gefunden. Eventuell könnte eine immunmodulatorische Komponente von Moxifloxacin zu diesem Ergebnis beigetragen haben.

2.5 Arbeitshypothese, Ziele und experimentelle Strategien der Dissertationsarbeit

Zahlreiche *in vitro* Daten sowie einige retrospektive klinische Studien suggerierten einen möglichen additiven Nutzen von Moxifloxacin aufgrund potenzieller immunmodulierender Eigenschaften in der Pneumonietherapie, jedoch war die Datenlage nicht eindeutig. In dieser Arbeit sollte daher experimentell die Hypothese geprüft werden, dass Moxifloxacin zusätzlich zu seiner antimikrobiellen Wirkung die Inflammation in der Pneumokokken-Pneumonie im Vergleich zur Standardtherapie mit Ampicillin reduziert. Ampicillin ist ein Aminopenicillin und gehört damit zur Gruppe der β -Laktam Antibiotika. Für Aminopenicilline sind keine auf das Immunsystem wirkenden Eigenschaften bekannt. Aminopenicilline werden seit Jahren erfolgreich in der Behandlung der ambulant erworbenen Pneumonie eingesetzt und sind auch heute noch Mittel der Wahl bei der Initialtherapie einer unkomplizierten ambulant erworbenen Pneumonie (Höffken et al. 2009). Aus diesen Gründen eignete Ampicillin sich ideal als Referenzantibiotikum in der vorliegenden Studie.

Ziel war zunächst, potenzielle immunmodulatorische Eigenschaften von Moxifloxacin in einem *ex vivo* Modell zu charakterisieren. Hierfür wurde humanes tumorfreies Lungengewebe mit TNF- α oder *S. pneumoniae* stimuliert (Szymanski et al. 2012) und anschließend mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelt. Durch Messung der Zytokinfreisetzung in den Überständen der Explantate sollten mögliche Effekte von Moxifloxacin auf die Inflammation des pulmonalen Gewebes detektiert werden.

Zielführend war weiterhin, potenzielle immunmodulatorische Eigenschaften von Moxifloxacin in einem tierexperimentellen Modell zu verifizieren, in welchem Mäuse nach Infektion mit

Streptococcus pneumoniae eine schwere Pneumonie und nachfolgend eine pneumogene Sepsis entwickeln (Reppe et al. 2009; Doehn et al. 2013).

Durch die antibiotische Behandlung der Tiere war es möglich, etwaige antiinflammatorische Effekte von Moxifloxacin *in vivo* zu bewerten. Als Vergleichsantibiotikum diente bei allen Untersuchungen Ampicillin, das als eine der Standardtherapien der ambulant erworbenen Pneumonie des Menschen gilt.

Neben der initialen Phase der Infektion konnte auch die beginnende Auflösung der Pneumonie beobachtet und bewertet werden. Zudem wurden zentrale Marker der pulmonalen und systemischen Inflammation, die Reduktion der bakteriellen Last und die pulmonalvaskuläre Permeabilität bestimmt, klinische Parameter erfasst und eine histologische Analyse der Gewebe durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 *Ex-vivo* Experimente an humanem Lungengewebe

Zunächst erfolgten *ex vivo* Versuche an humanem Lungengewebe. Dieses wurde in Vorversuchen mit rekombinantem humanem Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) stimuliert und mit Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) inkubiert. In weiteren Experimenten wurde das Lungengewebe mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert und im Verlauf ebenfalls mit Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) inkubiert. Es erfolgte die Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 in der Überständen der Lungenproben mittels ELISA sowie die Bestimmung der Bakterienlast im Lungengewebe.

3.1.1 Vorbereitung des humanen Lungengewebes

Für die Untersuchungen an humanem Lungengewebe wurden frische tumorfreie Lungenabschnitte von Patienten, die sich einer Lungenteilresektion unterziehen mussten, mit deren schriftlichen Einverständnis gewonnen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Berlin (Ethikvotum: EA2/079/13) genehmigt.

Die Lungenabschnitte wurden zunächst auf Eis gekühlt und mit einem Skalpell (Einwegskalpell, FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) in kleinere Teilstücke zerteilt. Anschließend wurden mittels Biopsiestanze (8 mm, pfm medical AG, Köln) kleine, etwa gleichgroße Zylinder herauspräpariert (~3 × 8 × 8 mm, ~100 mg). Vor allen weiteren Schritten wurden die erhaltenen Proben in 6-well Platten (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) eingewogen (KERN 440-33N, Laborpräzisionswaage, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern) und 24 Stunden in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Österreich) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um etwaige Blut- und Medikamentenreste auszuwaschen. Alle Versuche wurden im Duplikat durchgeführt (Szymanski et al. 2012).

3.1.2 Stimulation der Lungenproben mit TNF- α

Für die Stimulation der Lungenproben mit TNF- α ergab sich folgender Versuchsansatz (Abb. 2):

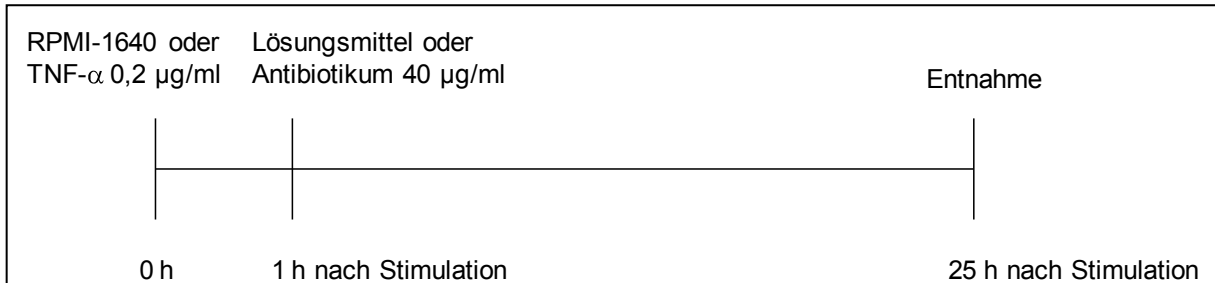


Abbildung 2: **Versuchsablauf TNF- α Stimulation der humanen Lungenproben:** Humanes Lungengewebe wurde 1 h nach TNF- α Stimulation mit Ampicillin (40 μ g/ml), Moxifloxacin (40 μ g/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde Gewebe für Analysen asserviert. Kontrollstimuliertes Gewebe (RPMI-1640) wurde ebenfalls mit Antibiotikum oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) behandelt.

Es ergaben sich daraus folgende Versuchsgruppen (Tab. 1):

Tabelle 1: **Versuchsgruppen TNF- α Stimulation der humanen Lungenproben**

A: Kontrolle + Lösungsmittel	a: TNF- α + Lösungsmittel
B: Kontrolle + Ampicillin	b: TNF- α + Ampicillin
C: Kontrolle + Moxifloxacin	c: TNF- α + Moxifloxacin

Humanes Lungengewebe wurde 1 h nach TNF- α Stimulation mit Ampicillin (40 μ g/ml), Moxifloxacin (40 μ g/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde Gewebe für Analysen asserviert. Kontrollstimuliertes Gewebe (RPMI-1640) wurde ebenfalls mit Antibiotikum oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) behandelt.

Lungenproben wurden mit TNF- α stimuliert und anschließend mit Ampicillin (Ampicillin-ratiopharm® 0,5 g ratiopharm GmbH, Ulm), Moxifloxacin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) oder Lösungsmittel inkubiert (Abb. 2). Als Lösungsmittel diente in allen Versuchen sterile isotone Natriumchloridlösung 0,9 % (B.Braun Melsungen AG, Melsungen)

Rekombinantes humanes TNF- α (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) wurde in einer Konzentration von 200 μ g/ml in sterilem *phosphate buffered saline* (PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X) PAA Laboratories GmbH, Österreich) mit einem 0,1 prozentigem Zusatz von bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) gelöst und in einer Konzentration von 0,2 μ g/ml angewandt.

Ampicillin wurde in steriler isotoner Kochsalzlösung und Moxifloxacin in sterilem *aqua ad iniectabilia* gelöst. Als Konzentration für die Instillation wurde für beide Antibiotika 40 μ g/ml

gewählt. Die Lungenstanzen wurden hierfür nach der 24-stündigen Inkubationszeit in 6-*well* Platten mit je 4 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem, RPMI-1640 Medium je *Well* umgeben. Dabei wurde dem RPMI-1640 Medium für die Proben a - c 0,2 µg/ml TNF-α (R&D Systems GmbH, Wiesbaden) hinzugefügt und davon je 400 µl mittels einer 1 ml Spritze (BD Plastipak™ 1 ml, BD Bioscience, Heidelberg) mit 26 G Kanüle (BD Microlance™, 26 G, BD Bioscience, Heidelberg) in jedes Lungenstück injiziert. Die Kontrollproben A - C erhielten die entsprechende Menge RPMI-1640 Medium als Kontrolle gespritzt. Die 6-*well* Platten inkubierten anschließend 1 Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Instillation der Antibiotika bzw. des Lösungsmittels. Durch vorsichtige Kreisbewegungen der Platten konnte sich das Antibiotikum bzw. das Lösungsmittel gleichmäßig im Medium verteilen. Anschließend wurden 400 µl des mit Antibiotikum bzw. Lösungsmittel versetzten Mediums in die Lungenzylinder mittels steriler 1 ml Spritze und 26 G Kanüle injiziert. Die 6-*well* Platten wurden daraufhin weitere 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgte die Aliquotierung der Überstände je *Well* in sterile Eppendorfgefäße zu 500 µl. Die Lungenproben wurden mittels Gewebeschere zerteilt und ebenfalls in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

3.2.1 Ansetzen der Nährlösung

Zum Anzüchten der Streptokokken wurde eine Nährlösung benötigt, welche aus 30 g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY, BD Biosciences, Heidelberg) unter Zusatz von 5 g Bacto™ Technischem Hefeextrakt (BD Biosciences, Heidelberg) in einem Liter destilliertem Wasser hergestellt wurde. Diese wurde auf dem Magnetrührer so lange gerührt, bis eine klare goldbraune Flüssigkeit entstand. Die in Glasflaschen abgefüllte Nährlösung wurde bei 115 °C für 10 min autoklaviert.

Zusätzlich war steriles fetales Kälberserum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Österreich) für die Anzucht erforderlich. Hierzu wurde FCS bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert, anschließend in 50 ml Falcons steril aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. Direkt nach dem Auftauen erfolgte eine Sterilfiltration mittels eines sterilen Rotilabo® Spritzenfilters

(Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe) mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die gebrauchsfertige Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.2.2 Bakterien

Bei dem verwendeten Bakterium handelte es sich um einen humanpathogenen Stamm der Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC „National Collection of Type Cultures“ 7978).

3.2.3 Test der minimalen Hemmkonzentration

Der vorliegende Bakterienstamm war *in vitro* sensibel für Ampicillin (MHK 0,016 µg/ml) und Moxifloxacin (MHK 0,032 µg/ml). Die MHK Werte wurden im Epsilomertest (Etest® bio-Mérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) bestimmt. Hierbei wurde ein Kunststoffstreifen, der das zu testende Antibiotikum enthielt, auf eine beimpfte Agarplatte platziert und inkubiert. Im Anschluss konnte die MHK in µg/ml des getesteten Antibiotikums direkt an der Schnittstelle der Skala und der ellipsenförmigen Hemmzone abgelesen werden.

3.2.4 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Mittels einer Einweg-Plastiköse (1 µl Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) wurden die Bakterien auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut (BD Biosciences, Heidelberg) ausgestrichen und 9 - 10 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Überimpfung mehrerer Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen in das Anzuchtmedium bestehend aus 18 ml THY-Nährlösung und 2 ml sterilfiltriertem FCS. Die Anzahl der Kokken wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) ermittelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,03 - 0,04 wurden die Pneumokokken weitere 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch mehrmaliges Messen der OD wurde das Wachstum kontrolliert und bei Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (bei einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4) das Gesamtvolumen gemessen und die Suspension bei 2 009 g für 10 min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Volumen der verbliebenen Suspension bestimmt. Aus den gemessenen Volumina sowie der Stimulations-OD ergab sich die Bakterienkonzentration der Suspension. Hierbei entsprach eine OD₆₀₀ von 0,1 einer

Bakterienkonzentration von 1×10^8 Koloniebildende Einheiten/ml (KbE/ml), sodass durch Hinzufügen von PBS (Dulbecco's without Ca & Mg (1X) PAA Laboratories GmbH, Österreich) die gewünschte Infektionsdosis über mehrere Zwischenstufen eingestellt werden konnte. Um die korrekte Verdünnung zu überprüfen, wurde die Bakteriensuspension weiter verdünnt und auf Columbia Schafblutagar ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Auszählung der Kolonien.

3.3 Infektion von humanem Lungengewebe mit *Streptococcus pneumoniae*

Für die Infektion der humanen Lungenproben mit *S. pneumoniae* ergab sich folgender Versuchsansatz (Abb. 3):

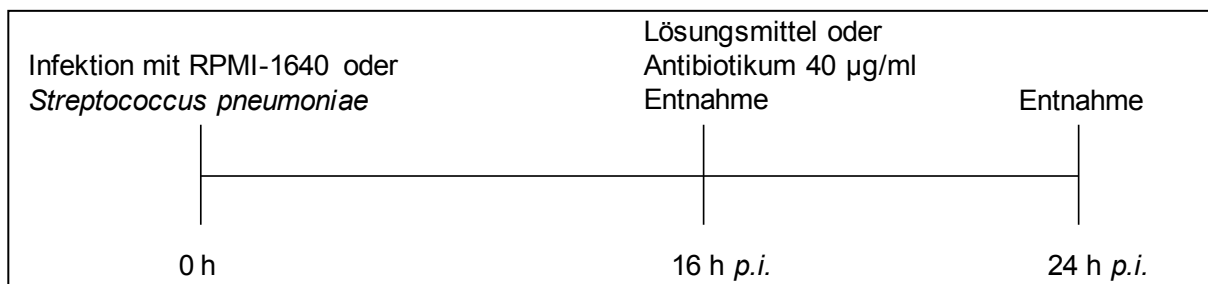


Abbildung 3: **Versuchsablauf der Infektion des humanen Lungengewebes mit *Streptococcus pneumoniae***: Humanes Lungengewebe wurde mit 1×10^2 KbE/ml *Streptococcus pneumoniae* infiziert und 16 h nach Infektion mit Ampicillin (40 µg/ml), Moxifloxacin (40 µg/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. 16 h sowie 24 h nach der Infektion wurden die Gewebeproben homogenisiert und die KbE aus den Überständen bestimmt. Die Überstände aus den Wells wurden ebenfalls zu beiden Zeitpunkten entnommen und für weitere Analysen asserviert. Abkürzung: *p.i.*, *post infectionem*

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen (Tab. 2):

Tabelle 2: **Versuchsgruppen der Infektion des humanen Lungengewebes mit *Streptococcus pneumoniae***:

Entnahmezeitpunkt 16 h p.i.	Entnahmezeitpunkt 24 h p.i.
Kontrolle + Lösungsmittel	Kontrolle + Lösungsmittel
<i>S. pneumoniae</i> + Lösungsmittel	<i>S. pneumoniae</i> + Lösungsmittel
	<i>S. pneumoniae</i> + Ampicillin
	<i>S. pneumoniae</i> + Moxifloxacin

Humanes Lungengewebe wurde mit 1×10^2 KbE/ml *Streptococcus pneumoniae* oder RPMI-1640 infiziert und 16 h nach Infektion mit Ampicillin (40 µg/ml), Moxifloxacin (40 µg/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. 16 h sowie 24 h nach der Infektion wurden die Gewebeproben homogenisiert und die KbE aus den Überständen bestimmt. Die Überstände aus den Wells wurden ebenfalls zu beiden Zeitpunkten entnommen und für weitere Analysen asserviert. Abkürzungen: *S. pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*; *p.i.* *post infectionem*

Tumorfrees humanes Lungengewebe wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit in frisches RPMI-1640 Medium umbettet und mit *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert (Abb. 3). Als Infektionsdosis wurden hierfür 1×10^2 KbE/ml gewählt.

Die Anzucht von *S. pneumoniae* erfolgte wie unter Punkt 3.2. beschrieben. Nach Erreichen der Stimulations-OD₆₀₀ von 0,3 – 0,4 wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert und anschließend bis zur benötigten Infektionsdosis verdünnt. Zur Verdünnung wurde RPMI-1640 Medium genutzt. Um die korrekte Verdünnung zu überprüfen, wurde die Bakteriensuspension auf Columbia Schafblutagar ausplattiert. Nach 24 Stunden im Wärmeschrank konnten die Kolonien ausgezählt werden.

Jeweils 400 µl Lösungsmittel (RPMI-1640) oder Kockensuspension wurden mittels einer 1 ml Spritze mit 26 G Kanüle in die Lungen appliziert. Anschließend inkubierten die Proben für 16 Stunden im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂).

Nach der Inkubation mit *S.pneumoniae* für 16 Stunden erfolgte die Behandlung der Lungenproben mit Ampicillin oder Moxifloxacin (Abb. 3). Die Konzentration des jeweiligen Antibiotikums betrug 40 µg/ml. Als Kontrolle diente die Applikation von isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %). Die Applikation erfolgte wie bereits unter Punkt 3.1.2 beschrieben.

Zeitgleich mit dem Verabreichen der Antibiotika wurden die ersten Proben entnommen und im FastPrep-24 Homogenisator (MP Biomedicals, Heidelberg) bei 6 m/s für 4x30 Sekunden auf Trockeneis homogenisiert. Diese Proben dienten als Kontrollen, einerseits für den Erfolg der Infektion, andererseits für den Verlauf der Zytokinproduktion.

Alle anderen Proben inkubierten für weitere 8 Stunden im Inkubator, sodass sich eine Gesamtversuchszeit von 24 Stunden ergab (Abb. 3). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden alle Proben aus dem Medium entnommen und in *Lysing Matrix G Tubes* (MP Biomedicals LLE, Ohio) überführt und im Anschluss unter Verwendung des FastPrep-24 Homogenisator homogenisiert. Zudem wurden die Überstände aus den jeweiligen *Wells* aliquotiert, sofort in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.1 Bestimmung der Bakterienlast im humanen Lungengewebe

Zur Bestimmung der Bakterienlast wurden die Lungenproben 16 Stunden und 24 Stunden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* homogenisiert und je 10 µl pur sowie in einer Verdünnung (mit PBS) von 1:10, 1:100, 1:1 000 oder 1:10 000 auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und für 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der anschließenden Auszählung der KbE erfolgte die Berechnung der Bakterienlast unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe und des Gewichts der Lungenprobe.

3.4 Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Überständen des humanen Lungengewebes

Die Zytokine IL-6 und IL-8 wurden einzeln im *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Die ELISA wurden von der Firma BD Bioscience bezogen. Zur Durchführung der ELISA wurden die aliquotierten und bei -80 °C gefrorenen Überstände langsam auf Eis aufgetaut. Die jeweiligen ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt und alle Arbeitsschritte konnten den beiliegenden Anleitungen entnommen werden. Alle verwendeten Puffer und Standardverdünnungen wurden ebenfalls nach Herstellerangaben angefertigt. Die Messung der OD erfolgte bei 450 nm im Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos).

Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Herstellerangaben zur Auswertung sowie unter Berücksichtigung des Gewichtes der humanen Lungenproben.

3.5 Tierexperimentelle Untersuchungen

3.5.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse wurden in einem Alter von 8 - 10 Wochen und einem Gewicht von 18 g – 22 g von Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Für die Versuchsdurchführung wurden ausschließlich weibliche C57BL/6N Wildtyp-Mäuse (Inzuchtstamm) verwendet.

3.5.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden während des Zeitraums der Versuche in individuell ventilierten, geschlossenen Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) auf Standard Einstreu gehalten. Wasser und pelletiertes Futter standen den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung. Der tägliche Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase erfolgte alle 12 Stunden. Die Tiere der unterschiedlichen Behandlungsgruppen wurden strikt getrennt voneinander in separaten Käfigen gehalten. Dabei wurden maximal fünf Tiere zusammen in einem Käfig untergebracht.

3.6 Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

3.6.1 Versuchsgruppen

Für die tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen ergaben sich folgende Versuchsgruppen und Entnahmezeitpunkte (Tab. 3):

Tabelle 3: **Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen**

Infektion mit:	Behandlung mit:	Entnahmezeitpunkte <i>p.i.</i> [h]:
Lösungsmittel	Lösungsmittel	24, 36, 48, 72, 120
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Lösungsmittel	24, 36, 48
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ampicillin	36, 48, 72, 120
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ampicillin + Moxifloxacin	36, 48, 72
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Moxifloxacin	36, 48, 72, 120

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h *p.i.* erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). In einer Versuchsserie erhielten die Tiere beide Antibiotika kombiniert (Ampicillin 0,02 mg/g, Moxifloxacin 0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* untersucht. Mäuse, die beide Antibiotika bekamen, wurden bis zum Zeitpunkt 72 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Abkürzung: *p.i. post infectionem*

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden im Rahmen des vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LaGeSo) genehmigten Versuchsvorhabens G-0365/10 durchgeführt.

3.7 Handhabung der Antibiotika

3.7.1 Verabreichung von Ampicillin

Ampicillin wurde als Trockensubstanz von der ratiopharm GmbH (Ampicillin-ratiopharm® 0,5 g, Ratiopharm GmbH, Ulm) bezogen.

Die Tiere erhielten pro *intraperitonealer* (*i.p.*) Injektion 0,02 mg/g Ampicillin gelöst in 200 µl isotoner Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % B.Braun Melsungen AG, Melsungen).

3.7.2 Verabreichung von Moxifloxacin

Moxifloxacin (Bayer Vital GmbH, Leverkusen) wurde als Reinsubstanz von der Bayer Vital GmbH für die Experimente zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse erhielten 0,1 mg/g Moxifloxacin gelöst in 200 µl sterilem *aqua ad iniectabilia* (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) pro *i.p.* Injektion.

Zudem erhielt eine Gruppe von Tieren in einer Versuchsserie eine Kombination beider Antibiotika in obengenannten Dosierungen. Alle anderen Versuchsgruppen erhielten entsprechend eine zusätzliche Applikation des Lösungsmittels. Als Lösungsmittel wurde in allen Versuchsserien sterile isotone Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % B.Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet.

3.8 Infektion der Mäuse mit *Streptococcus pneumoniae*

Vor der Infektion erfolgte zuerst die Bestimmung von Körpertemperatur und –gewicht jeder zu infizierenden Maus. Anschließend wurden die Mäuse durch *i.p.* Injektion von einem Gemisch aus 80 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml, Pfizer, Berlin) und 25 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun 2 % Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) verdünnt mit isotoner Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung erhielten alle Tiere Thilo-Tears® Augengel (Alcon Pharma GmbH Freiburg) auf die Kornea. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe wurden die Tiere unter der Sterilbank in einer speziellen Haltevorrichtung an den oberen Schneidezähnen fixiert. Dann wurden jeder Maus 10 µl Infektionslösung pro Nasenloch transnasal *via* Tröpfcheninfektion appliziert. Die Bakterien wurden wie unter Punkt 3.2 beschrieben angezüchtet. Die Infektionsdosis für alle Infektionsversuche betrug 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae*. Die Infektion der Kontrolltiere erfolgte analog mit 10 µl PBS (Dulbecco's without Ca & Mg (1X) PAA Laboratories GmbH, Österreich) pro Nasenloch anstelle der Bakteriensuspension. Während der Aufwachphase unter Rotlicht wurden die Tiere regelmäßig überwacht (Reppe et al. 2009).

3.9 Behandlung mit Antibiotika

Die Behandlungen begannen 24 Stunden nach der Infektion und wurden dann alle 12 Stunden, bis zum jeweiligen Versuchsende, durchgeführt (Abb. 4). Die Injektionen erfolgten *i.p.* Dabei erhielt eine Gruppe Ampicillin, eine weitere Moxifloxacin und eine dritte Gruppe beide Antibiotika. Die uninfizierten Kontrolltiere sowie die infizierte und unbehandelte Gruppe bekamen die entsprechende Menge (200 µl bzw. 400 µl) isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) verabreicht. Zudem wurden alle 12 Stunden die Vitalparameter Körpertemperatur und –gewicht sowie der *status praesens* erfasst.

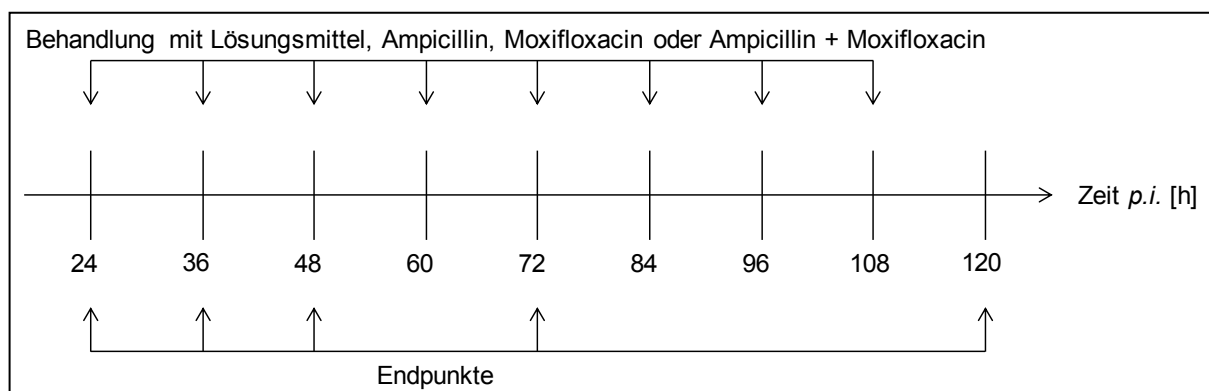


Abbildung 4: **Versuchsablauf der Infektionsversuche an Mäusen:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h *p.i.* erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g), Moxifloxacin (0,1 mg/g) oder mit beiden Antibiotika (Ampicillin 0,02 mg/g, Moxifloxacin 0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* untersucht. Mäuse, die beide Antibiotika bekamen, wurden bis zum Zeitpunkt 72 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Abkürzung: *p.i. post infectionem*

3.10 Endpunkte

Zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* erfolgte die Präparation der Tiere. Da die Antibiotikabehandlungen erst 24 h nach Infektion begannen, gibt es keine Daten zu den antibiotisch behandelten Mäusen zum Zeitpunkt 24 h *p.i.*

Mäuse, welche mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert, aber nicht mit Antibiotikum behandelt wurden, bildeten bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* ARDS und Sepsis aus, sodass diese Gruppe nicht in die Betrachtungen 72 h und 120 h *p.i.* einbezogen wurde.

3.11 Untersuchung des klinischen Verlaufs der Pneumokokkenpneumonie

Der klinische Zustand der Tiere sowie das Allgemeinbefinden wurden über den gesamten Versuchszeitraum überwacht und dokumentiert. Zusätzlich erfolgte alle 12 Stunden sowohl bei den infizierten als auch bei den scheininfizierten Tieren die Erhebung von Körpertemperatur und –gewicht. Fiel dabei auf, dass die Erkrankung bei einem Tier soweit fortgeschritten war, dass das Leiden des Tieres ein ethisch vertretbares Maß überschritt, erfolgte die Euthanasie des Tieres durch zervikale Dislokation nach vorhergehender tiefer Ketamin-Xylazin-Narkose.

Die Beurteilung erfolgte auf Grundlage der modifizierten Arbeitsanweisungen (Tab. 4) nach den „Empfehlungen des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (Stand 22.7.2009).

Tabelle 4: **Handlungsanweisungen**

Tier isoliert sich	A
Struppiges Fell/ Hautverletzungen	A
Urin u./o. Kot abweichend in Menge, Farbe und Konsistenz	A
Atmung*	A/B/C
Torkeln, Krämpfe	B
Schmerzen (gekrümmte Haltung, Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	B
Blässe (Augen, Ohren, Haut)	B
Krustige Belege am Augenrand, eingesunkene trübe Augen	B
Paresen	B
Paralysen, spätestens sobald die Gefahr besteht, dass die Tiere aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen	C
Beim Umsetzen/ Handling	
Tier vermeidet Bewegung	A
Fehlstellung der Zähne	A
Verletzungen, Hautveränderungen	A
Teilnahmslosigkeit	A
Ruhelosigkeit	A
Circling	A
Stelzgang	A
Lokale Infektionen	B

Tabelle 4 (fortgeführt): **Handlungsanweisungen**

Abszesse	B
Automutilation	B
Ödembildung	B
Schmerzen beim Anfassen	A/B
Leib hart oder gespannt	A/B
Hautfalten bleiben stehen	B
Leib hart und aufgetrieben	C
Moribund	C
Ungewöhnliche Zunahme	B
Abnahme von 10% im Vergleich zur Körpermasse der nicht infizierten Kontrollgruppen	B
Abnahme von 20% im Vergleich zur Körpermasse der nicht infizierten Kontrollgruppen	C

* Atmung: n = normal/geringfügig verstärkt; t = beschleunigt/ flach (gilt als Kategorie B); s = schwerfällige Atmung (gilt als Kategorie C; siehe Tabelle)

Hierbei bedeutet:

A: Tier weiter beobachten

B: In Kombination mit Schmerzen oder Blässe Tier einschläfern

C: Tier sofort einschläfern

3.12 Präparation der Tiere und Probenentnahme

3.12.1 Präparation der Mäuse

Vor der finalen Präparation erfolgte die Bestimmung von Körpertemperatur und –gewicht sowie die Beurteilung des *status praesens* der Maus. Im Anschluss daran wurde dem Tier ein Gemisch aus 160 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml Pfizer, Berlin) und 75 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun 2 % Injektionslösung, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) verdünnt in isotoner Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 %, Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) *i.p.* verabreicht. Nach Feststellung einer adäquaten Narkosetiefe durch wiederholte Überprüfung des Zwischenzehenreflexes wurde der Operationsbereich mit Braunol® 7,5 % (B.Braun, Melsungen) gereinigt und das Tier in Rückenlage auf einer Styroporunterlage fixiert. Anschließend erfolgte ein medianer Hautschnitt zur Darstellung der Trachea. Diese wurde unterhalb des *Larynx* eröffnet und mit einer Ligatur

versehen, sodass die eingeführte Trachealkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) fixiert werden konnte. Die Maus wurde dann mit einem Beatmungsgerät für Kleinnager (MiniVent, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) mit einem Atemzugvolumen von 200 µl und 150 Atemzügen pro Minute beatmet.

Nach medianer Laparotomie und Eröffnung des *Diaphragmas* wurden 50 µl Heparin (25 000 I.E./ml, ratiopharm 1:1 verdünnt mit isotoner Natriumchloridlösung, 0,9 %, Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) in die rechte Herzkammer appliziert. Nach Punktion der linken *Vena renalis* mit einer 27 G Kanüle (BD Microlance™ 3, 27 G, BD Bioscience, Heidelberg) und Vorschub der Kanüle in die *Vena cava* trat durch raschen Blutentzug sofortiger Herz- und Kreislaufstillstand ein. Anschließend wurde das *Diaphragma* vollständig von der Thoraxwand gelöst, das *Sternum median* eröffnet und die Thoraxhälften seitlich fixiert. Der Thy-mus wurde entfernt und eine Ligatur um die *Arteria pulmonalis* gelegt. Nach Entfernen der Herzspitze und Eröffnung der Herzkammern konnte die Pulmonalarterienkanüle (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) in den *Truncus pulmonalis* vorgeschoben und fixiert werden.

Die Lunge wurde anschließend 1 Minute mit steriler eiskalter Natriumchloridlösung, (0,9 % Fresenius Kabi Deutschland, Bad Homburg) mittels einer Rollenpumpe (Peristaltikpumpe, Ismatec® Reglo-Analog, Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH) mit einer Flussrate von 1 ml/min perfundiert, um das Blut aus dem pulmonalen Gefäßbett zu entfernen. Hiernach konnten die Organe für die spezifischen Untersuchungen entnommen werden.

3.12.2 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Nach beendeter Perfusion und Beatmung wurde die Lunge zweimal mit 800 µl eisgekühltem PBS, welchem ein Protease-Inhibitor zugesetzt wurde (1 Tablette Complete™ Mini, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, gelöst in 10 ml kaltem PBS) gleichmäßig und langsam gespült. Die so gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) wurde nach Volumenbestimmung zügig weiterverarbeitet.

3.12.3 Durchführung der Organentnahme

Die Organe (Lunge, Milz, Nieren, Darm) wurden im Anschluss an die Präparation unter Schonung des jeweiligen Gewebes entnommen.

3.13 Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut

3.13.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Im Anschluss an die Entnahme wurde die BALF in 5 ml-Polypropylen Round-Bottom Tubes (BD Biosciences, Heidelberg) überführt und mit 1 011 g, 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und separat bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die erhaltenen Zellpellets aus BAL 1 und BAL 2 wurden gepoolt und in 1 ml PBS resuspendiert. 5 µl dieser Zellsuspension wurden mit gleicher Menge Methylviolett (verdünnt mit Eisessig, Merck, Darmstadt) versetzt, die Neubauerzählkammer mit diesem Gemisch befüllt und unter dem Mikroskop (Axioskop, Zeiss Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung betrachtet. Nach Auszählung der Leukozyten in 4 x 16 Großquadraten wurde die Gesamtleukozytenzahl der gewonnenen BALF (Gesamtvolumen BALF 1 + BALF 2) unter Verwendung der Berechnungsformel $[\text{Gesamtleukozytenzahl} / 4 \times 2 \times 10\,000]$ bestimmt, hierbei wurden die Verdünnungsschritte sowie das Zählkammervolumen berücksichtigt.

Das angestrebte Verhältnis von 3 µl Antikörper zu 300 000 Zellen wurde nach der Zählung durch Entnahme des entsprechenden Volumens aus der Suspension erreicht, dieses wurde mit PBS überschichtet und mit 470 g 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand verworfen und das mit 2 µl Fc-Block (BD Biosciences, Heidelberg) (ausreichend für 1×10^6 Zellen) versetzte Pellet für 10 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend konnte die Probe zu den bereits vorgelegten fluoreszenzmarkierten Antikörpern GR-1 Phycoerythrin-konjugiert (PE), CD45 Peridinin-Chlorophyll-Protein-konjugiert (PerCP) und F4-80 Allophycocyanin-konjugiert (APC) (alle Antikörper BD Biosciences, Heidelberg) pipettiert und 30 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert werden. Vor dem nächsten Zentrifugationsschritt (470 g, 5 min, 4 °C) wurde die Probe mit 500 µl FACS™ *Lysing Solution* (1X) (BD Biosciences, Heidelberg) versetzt, welche Formaldehyd enthielt und der Fixierung der Zellen diente. Die Probe wurde anschließend weitere 10 min inkubiert und mit *CellWash* (BD Biosciences, Heidelberg) auf ca. 4 ml aufgefüllt. Der Überstand wurde verworfen und zum verbliebenen Volumen 500 µl *CellWash* (BD Biosciences, Heidelberg) hinzugefügt und gut gemischt.

Schließlich konnte die Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie im BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt werden. Hierbei wurden die Fraktionen der Makrophagen, der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bestimmt.

Während der *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Analyse passierten die zu analysierenden Zellen einen fokussierten Laserstrahl und das dabei entstehende Fluoreszenz- und Streulicht wurde gemessen. Basierend auf der Größe und der Granularität bzw. dem Plasma/Kern Verhältnis der Zellen wurde das Licht auf unterschiedliche Weise gestreut. Dabei beschrieb das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) die Lichtbeugung gemessen entlang der Achse des einfallenden Lichts und korrelierte mit der Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) war ein Maß für die Brechung und Reflexion des Lichts und wurde in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen. Anhand von FCS und SSC konnten somit die unterschiedlichen Zellpopulationen voneinander differenziert werden. Die zur Färbung der Zellsuspension eingesetzten fluoreszenzmarkierten Antikörper (anti-GR-1 PE, anti-CD45 PerCP und anti-F4-80 APC) boten zusätzlich die Möglichkeit die Zellen anhand spezifischer Oberflächenstrukturen zu unterscheiden. Dabei emittierte jedes Fluorochrom Licht unterschiedlicher Wellenlängen, das detektiert wurde und eine genauere Differenzierung zuließ.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse wurden auf eine vertikale und horizontale Achse aufgetragen, dabei entsprach jeder Punkt einer Zelle (Abb. 5). Durch das Setzen von Analysefenstern (*Gates*) wurden die Zellen anschließend selektiert. Dabei wurden zuerst alle CD 45 positiven Zellen selektiert, die der Gesamtpopulation an Leukozyten in der Probe entsprachen. Im nächsten Schritt erfolgte die simultane Selektion nach F4/80 positiven Zellen (Makrophagen) und nach GR-1 positiven und F4/80 negativen Zellen (neutrophile Granulozyten). Die letzte Population bildeten die Lymphozyten, welche für beide Antikörper negativ waren (Abb. 5).

Die absoluten Zahlen der jeweiligen Zellpopulationen wurden anhand der Gesamtleukozytenzahl, des Gesamtvolumens der gewonnenen BALF und der prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen bezogen auf 1 ml BALF unter Berücksichtigung folgender Formeln ermittelt: [Zellzahl gesamte BALF/ Gesamtvolumen BALF in ml = Zellzahl pro ml BALF]; [Zellzahl pro ml BALF x prozentualer Anteil Leukozytenpopulation = absolute Zellzahl der jeweiligen Zellpopulation].

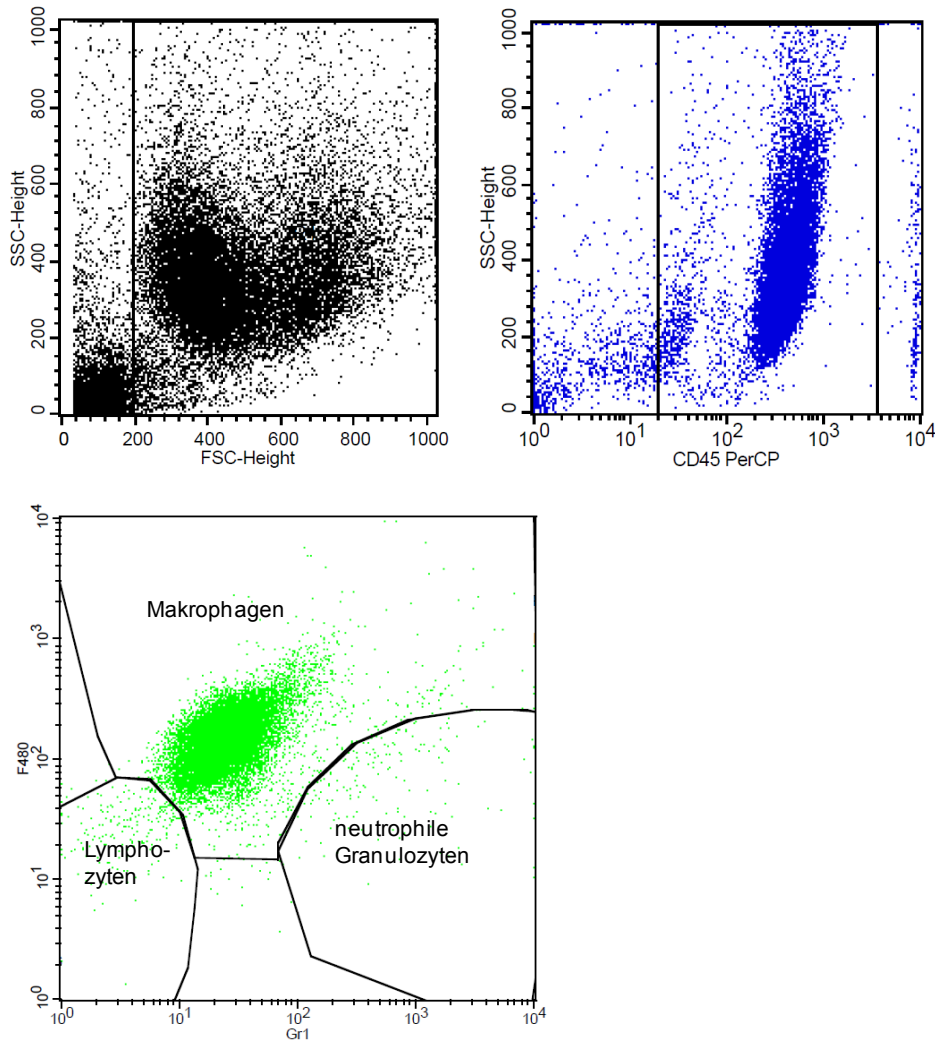


Abbildung 5: **Differenzierung der Gesamtleukozytenzahl der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit:** Beispiel für die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung in der BALF mittels Durchflusszytometrie im BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) Abkürzungen: BALF bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, SSC *sideward scatter*, FSC *forward scatter*

3.13.2 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung im Blut

Im Anschluss an die Blutentnahme wurden 60 µl des gewonnenen Blutes in ein EDTA-Röhrchen pipettiert. 5 µl der fluoreszierenden Antikörper GR-1 PE und CD45 PerCP wurden auf das sich am Boden des BD TruCount™ Tubes (BD Biosciences, Heidelberg) befindliche Sieb gegeben. Dann wurden 50 µl des vorbereiteten Blutes hinzugefügt und die Probe 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl FACS™ *Lysing Solution* (1X) (BD Biosciences, Heidelberg), die der Lyse der Erythrozyten diente, erfolgte nochmals eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Vor der Messung mittels Durchflusszytometrie im BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) wur-

de die Probe in ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml BD Biosciences, Heidelberg) überführt. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl sowie die Fraktionen von Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bezogen auf 1 ml Vollblut ermittelt (Abb. 6). Analog zum Vorgehen bei der BALF wurden zunächst alle CD 45 positiven Zellen (Leukozyten) selektiert und im Anschluss weiter differenziert. Dabei entsprachen die GR-1 positiven Zellen den neutrophilen Granulozyten, die leicht GR-1 positiven Zellen den Monozyten und die GR-1 negativen Zellen den Lymphozyten.

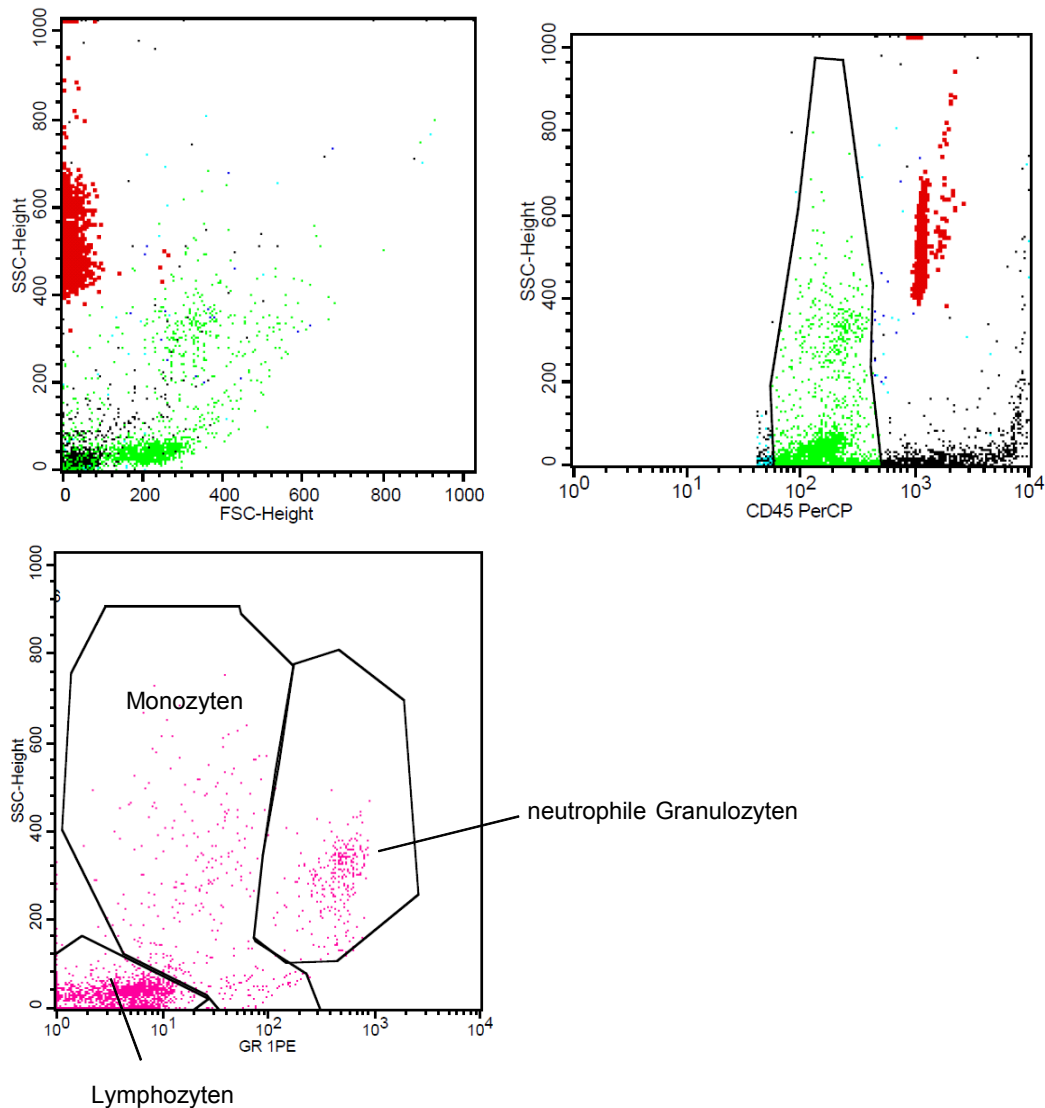


Abbildung 6: **Quantifizierung und Differenzierung der Gesamtleukozytenzahl des Blutes:** Beispiel für die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung im Blut mittels Durchflusszytometrie im BD FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg); Abkürzungen: SSC *sideward scatter*, FSC *forward scatter*

3.14 Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut

Die Quantifizierung der Zytokine in der BALF und im Plasma wurde mittels *Multiplex Array*-Technologie der Firma Biorad durchgeführt. Hierfür wurde ein *Mouse Cytokine Group 1 3-plex* der Firma BD für die BALF verwendet, welcher die Zytokine IL-1 β , IL-6 sowie KC quantifizierte. Um die Zytokine im Plasma zu bestimmen, wurde des Weiteren ein *Mouse Cytokine Group 1 2-plex* mit den Zytokinen IL-6 und KC der Firma Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA) genutzt.

Um dem Abbau der Proteine entgegen zu wirken, wurde der BALF ein Proteasehemmer hinzugefügt und diese direkt nach der Gewinnung mit 1 011 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde entnommen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Sicherheitsverschluss bei -80 °C bis zur Durchführung des Multiplex-Assays gelagert.

Das gewonnene Blut wurde ebenfalls direkt im Anschluss mit 1 520 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß bei -80 °C gelagert. Zur Verwendung im *Bio-Plex™ Mouse Multi-Plex Cytokine Assay* wurden die BALF und Plasma Proben auf Eis langsam aufgetaut. Die Verdünnung des Zytokinstandards für die BAL Proben erfolgte im Probenmedium unter Zusatz von 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA). Alle BAL Proben wurden pur, die Plasmaproben in einer Verdünnung von 1:4 aufgetragen. Alle weiteren Arbeitsschritte können der Arbeitsanleitung der Herstellerfirma entnommen werden. Die abschließende Messung der Proben erfolgte im Bio-Plex Array Reader. Die Messergebnisse wurde unter Zuhilfenahme des Bioplex Handbuches Version 4.2.2 ausgewertet.

3.15 Genexpression der Zytokine in der Lunge

3.15.1 Isolierung der RNA aus Mauslungen

Im Anschluss an die Präparation wurde die gespülte, aber unlavagierte Lunge unter Schonung des Gewebes aus dem Tier entnommen, wobei der Lungenhilus mit angrenzenden Lymphknoten im Kadaver verblieb. Die entnommene Lunge wurde in PBS zwischengelagert, mittels Präparierschere zerteilt und anschließend gewogen. Ein Drittel der zerkleinerten Lunge wurde in ein Greiner Röhrchen (Polypropylen round bottom, BD Biosciences, Heidelberg) überführt, sofort in 1 ml Trizol® Reagent (Invitrogen, Darmstadt) mithilfe des Ultra-Turrax T8

(IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen) homogenisiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur RNA-Isolation gelagert. Beim Homogenisieren lysierte das im Trizol enthaltene Guanidinthiocyanat die Zellwände und inaktiviert alle Enzyme, sodass einem Abbau der instabilen RNA vorgebeugt wird. In dem zusätzlich enthaltenen Phenol lösen sich Proteine sowie DNA. Die restlichen 2/3 der Lungen wurden ebenfalls aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden die Proben auf Eis aufgetaut, $500\text{ }\mu\text{l}$ der Organsuspension entnommen, in ein $1,5\text{ ml}$ Reaktionsgefäß überführt und mit $12\text{ }000\text{ g}$ 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit $100\text{ }\mu\text{l}$ Chloroform (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt, anschließend für 15 sec gerüttelt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit $12\text{ }000\text{ g}$ für 15 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde die obere Phase, welche die gelöste RNA beinhaltet, in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Um die RNA auszufällen, wurden $250\text{ }\mu\text{l}$ 2-Propanol (Merck, Darmstadt) hinzupipettiert und die Probe gründlich gerüttelt. Im Anschluss erfolgte eine nochmalige Zentrifugation mit $12\text{ }000\text{ g}$ für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Pellet in $350\text{ }\mu\text{l}$ 70% reinst Ethanol (Merck, Darmstadt) gewaschen und zentrifugiert ($12\text{ }000\text{ g}$, 15 min , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dann wurde der Alkohol abpipettiert und verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur für ca. 15 min getrocknet und in $100\text{ }\mu\text{l}$ *aqua ad iniectabilia* (B.Braun Melsungen AG, Melsungen) resuspendiert.

Vor der Herstellung von Aliquots zu je $250\text{ ng}/\mu\text{l}$ erfolgte die Ermittlung des RNA-Gehaltes der Proben. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem NanoDrop 2000 der Firma Thermo Scientific photometrisch bestimmt. Hierbei entsprach eine $\text{OD}_{260} = 1$ einem Gehalt von $40\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA in der Probe. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm , dies resultiert aus den Absorptionsspektren der aromatischen Aminosäurenreste. Um den Reinheitsgrad der Probe ermitteln zu können, wurde zusätzlich das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} bestimmt. Der so errechnete Quotient sollte für reine RNA zwischen $1,9$ und $2,0$ liegen. Atypische Absorptionsspektren kamen in der isolierten RNA nicht vor. Für alle Arbeitsschritte wurden RNase-, DNase- sowie Pyrogenfreie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

3.15.2 Durchführung der reversen Transkription

Für den Einsatz der isolierten Lungenproben in der quantitativen PCR musste die gewonnene RNA zunächst in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde eine RNA-abhängige DNA Polymerase (reverse Transkriptase) benötigt, die ausgehend von der einzelsträngigen RNA zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert. Anschlie-

ßend wurde der RNA-Anteil von einer anderen Untereinheit desselben Enzyms mit Exoribonukleaseaktivität abgebaut.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit der Firma Applied Biosystems® gemäß Herstellerangaben verwendet.

Es wurde ein *Master Mix* aus den folgenden Komponenten vorbereitet (Tab. 5):

Tabelle 5: **Master Mix Zusammensetzung für die reverse Transkription der RNA in cDNA**

Reverse Transkription	
Nuklease freies Wasser	4,2 µl
dNTP	0,8 µl
10x Puffer	2,0 µl
Hexamer Primer	2,0 µl
HCRT Polymerase	1,0 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	10,0 µl

Die benötigten Komponenten wurden in ein DNase und RNase freies Reaktionsgefäß pipettiert und mit 10 µl der eluierten RNA (2,5 µg) versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde der Inhalt vermischt und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Die Ansätze wurden auf dem Thermocycler PTC 200 (Peltier Thermocycler; Firma MJ Research) zuerst für 10 min bei 25 °C (primer annealing) und anschließend für 2 Stunden bei 37 °C (Transkription) inkubiert. Während des ersten Inkubationsschrittes erfolgte die Primerhybridisierung. Im nächsten Schritt lief die Transkription. Die Enzymaktivierung erfolgte danach bei 85 °C für 5 Sekunden. Die cDNA, die als Matrize für die anschließende quantitative PCR diente, wurde im Thermocycler bei 4 °C bis zur Entnahme gehalten (Tab. 6) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6: **Reaktionsschritte der reversen Transkription**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Primerhybridisierung	25 °C	10 min
Transkription	37 °C	120 min
Enzyminaktivierung	85 °C	5 sec
Kühlung	4 °C	bis Entnahme

3.15.3 Durchführung der quantitativen *Real-Time*-PCR

Ausgehend von der vorliegenden cDNA wurde die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) mit dem ABI 7300-Real Time PCR System durchgeführt. Es wurden die Gene *mouse* IL-6, *mouse* KC, *mouse* IL-1 β sowie die *mouse* Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bestimmt. Dabei wurde der *TaqMan*® *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems®) sowie der *TaqMan*® *Gene Expression Assay* (Applied Biosystems®) verwendet (Tab. 7).

Tabelle 7: **Master Mix Zusammensetzung für die quantitative *Real-Time*-PCR**

Master Mix quantitative PCR :	
<i>TaqMan</i> ® <i>Gene Expression Master Mix</i>	10 μ l
Nuklease freies Wasser	4 μ l
<i>TaqMan</i> ® <i>Gene Expression Assay (Assay on demand)</i>	1 μ l
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	15 μ l

Der *Master Mix* wurde in die Vertiefungen einer Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate (Applied Biosystems®, USA) vorgelegt und anschließend 5 μ l der cDNA hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte kurz bei 1 000 g an zentrifugiert und im ABI 7300 REAL TIME PCR System (Applied Biosystems®, USA) gemessen. Zuerst erfolgte eine Inkubation für 2 min bei

50 °C, an die sich eine Inkubation von 10 min bei 95 °C anschloss. Es folgten 40 Zyklen der Denaturierung bei 95 °C für 15 sec. Die Elongation erfolgte anschließend 1 min bei 60 °C.

An das 5'-Ende der *TaqMan* Sonde ist ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (FAM) gebunden. Dem gegenüber steht ein an das 3'-Ende gebundener Quencher-Farbstoff (TAMRA). Zusätzlich wird das 3'-Ende mit einem Phosphat-Rest versehen, sodass eine Extension des 3'-Endes während der PCR vermieden wird. Durch die Nähe des Reporterfarbstoffs zum Quencher während der Hybridisierungsphase wird die Fluoreszenz unterdrückt. Baut die *Taq*-Polymerase, die eine Exonukleaseaktivität besitzt, in der Elongationsphase die Sonde am 5'-Ende ab, wird der Abstand zwischen den beiden Farbstoffen erhöht und das Fluoreszenzsignal nimmt entsprechend zu. Die Messung findet am Ende jedes Zyklus statt. Für die relative Quantifizierung der exprimierten Gene wird in der qRT-PCR die Transkription des Zielgens gegen die eines Referenzgens als endogenes Kontrollgen gemessen. Als endogene Kontrolle (Referenzgen) diente hierbei die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse und wird *ubiquitär* synthetisiert und konstant exprimiert. Aus diesem Grund eignet es sich als Referenzgen für die qRT-PCR. Die Induktion des Referenzgens wurde 1 gesetzt.

Mithilfe der folgenden Formel erfolgte die Bestimmung der relativen Quantifizierung (RQ) des Zielgens in Relation zur endogenen Kontrolle:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzgen (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Behandlung} - \Delta CT \text{ naive Kontrolle}$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Der CT-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert) bezeichnete hierbei die Zyklusanzahl, an der die Fluoreszenz des gemessenen Gens erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. So war eine Messung zu Beginn der exponentiellen Phase möglich.

Bei den verwendeten Primern wurde darauf geachtet, dass sie Intron-überspannend waren, das heißt es konnte eine irrtümliche Amplifikation von genomischer DNA, die das Ergebnis verfälschen würde, ausgeschlossen werden.

3.16 Bestimmung der Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, im Blut und in der Milz

3.16.1 Bakterienlast der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Zur Bestimmung der Bakterienlast in der BALF wurden je 10 µl pur sowie in einer Verdünnung (mit PBS) von 1:10, 1:100, 1:1 000 und 1:10 000 auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und für 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach der anschließenden Auszählung der KbE erfolgte die Berechnung der Bakterienlast unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe.

3.16.2 Bakterienlast der Milz

Die Milz wurde im Anschluss an die Entnahme in einem Probengefäß, gefüllt mit 500 µl PBS, auf Eis gekühlt, bis zur Weiterverarbeitung zwischengelagert. Nachdem das Organ in ein BD Falcon™ Zellsieb (100 µm, BD Biosciences, Heidelberg) gegeben wurde, welches sich auf einem 50 ml-Falcon befand, wurde es mittels eines 2 ml Spritzenkonus durch das Sieb gedrückt. Dabei wurde das Zellsieb mehrfach mit PBS gespült, bis keine Gewebereste mehr sichtbar waren. Anschließend wurde die Suspension auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Aus der so erhaltenen Einzelzellsuspension wurden je 10 µl pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100, 1:1 000 und 1:10 000 auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Die Berechnung der Bakterienlast in der Milz erfolgte nach der Auszählung der KbE unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe.

3.16.3 Bakterienlast des Blutes

Um die Bakterienlast im Blut zu bestimmen, wurden je 10 µl Blut pur sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1 000 und 1:10 000 auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und für 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach der anschließenden Auszählung der KbE erfolgte die Berechnung der Bakterienlast unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe.

3.17 Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität

Zur Quantifizierung der pulmonalvaskulären Permeabilität wurde das murine Serumalbumin (MSA) mittels ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) in BALF und Plasma in geeigneter Verdünnung quantifiziert. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und zügig verarbeitet.

Der erste Antikörper wurde in geeignetem Puffer (*Coating Buffer*: 0,05 M Natrium Carbonat, pH 9,6) verdünnt und in die 96-*well* Platte pipettiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die 96-*well* Platte mehrfach mit Waschpuffer (50mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween20) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt wurde für 30 Minuten ein geeigneter Puffer (*Postcoat Buffer*: 50mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA) aufgetragen, der unspezifische Bindungsstellen blockierte. Im Anschluss wurden Proben und Standards in geeignetem Puffer (*Sample Buffer*: 50mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05 % Tween20) verdünnt, aufgetragen und es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur.

Nach mehrmaligem Waschen wurde der zweite Antikörper in die 96-*well* Platte pipettiert und es wurde wiederum für eine Stunde inkubiert. Anschließend konnte, nach weiteren Waschschritten, das Enzymsubstrat Tetramethylbenzidine *Liquid Substrat* (TMB) aufgetragen werden. Nach erfolgtem Farbumschlag wurde die Reaktion mittels 2 molarer Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der OD erfolgte bei 450 nm im Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos). Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Herstellerangaben sowie unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate aufgetragen und die erhaltenen Werte anschließend gemittelt. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Es konnte anschließend das MSA-BALF/Plasma-Verhältnis berechnet werden, welches eine Aussage über die Schädigung der alveolokapillären Barrierefunktion zuließ.

3.18 Histologische Untersuchungen der entnommenen Organe

Die Lunge wurde im Anschluss an die Präparation mitsamt Herz und Thymus aus dem Kadaver entnommen und in 4-prozentiger Formaldehyd-Lösung fixiert. Abweichend von der unter 3.10.1 genannten Präparation wurde die Lunge für die histologischen Untersuchungen zur Schonung der Strukturen weder gespült noch lavagiert. Zudem wurden jedem Tier die

Leber, der Darm und beide Nieren entnommen und ebenfalls in 4-prozentiger Formaldehyd-Lösung fixiert.

Die Weiterverarbeitung nach histologischen Standards wurde im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Nach der Fixierung für maximal 120 Stunden wurden die Mauslungen in Paraffin eingebettet. Nach Entwässerung und Entparaffinierung wurden Gewebeschnitte angefertigt und diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die Proben wurden freundlicherweise von Frau Dr. Olivia Kershaw, *European College of Veterinary Pathologists* diplomierte Tierpathologin, aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin verblindet analysiert. Bei der histologischen Beurteilung wurden Entzündungszeichen und Veränderungen des Lungengewebes, abhängig von ihrem Ausprägungsgrad differenziert. Dabei wurden jeweils Punkte zwischen 0 (keine Veränderung) und 5 (Veränderung massiv) vergeben (Tab. 8).

Ebenfalls analog histologisch untersucht wurden die Leber, die Nieren sowie der Darm der Tiere.

Tabelle 8: Bewertungsschema der histologischen Untersuchung des murinen Lungengewebes

Ergebnis der histologischen Betrachtung	Bewertung
keine Entzündungszellen sichtbar	0
vereinzelte Entzündungszellen sichtbar	1
wenige Entzündungszellen sichtbar	2
mäßige Anzahl an Entzündungszellen mit wenig multifokal verteiltem Exsudat sichtbar	3
viele Entzündungszellen mit mäßig Exsudat und vereinzelt Zellnekrosen sichtbar	4
viele Entzündungszellen mit reichlich Exsudat und ausgedehnte Zellnekrosen sichtbar	5

3.19 *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*

Das *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing* (ECIS)-Verfahren wurde in dieser Studie genutzt, um das Verhalten eines Zellmonolayers auf verschiedene Stimuli hin zu untersuchen. Dabei wurde der Wechselstromwiderstand (Impedanz) des Zellmonolayers bei einer bestimmten Stromfrequenz bestimmt. Die Veränderungen der Impedanz nach einem externen Stimulus über die Zeit ließen Rückschlüsse auf das Verhalten der zu untersuchenden Zellschicht zu. Hierfür wurden Endothelzellen humaner Nabelstrangvenen (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVEC) isoliert (Schnittler et al. 1990) und auf Goldelektroden kultiviert, bis sich ein konfluenter Endothelzellmonolayer gebildet hatte. Mit zunehmendem Bewuchs der Goldelektroden nahm auch die Impedanz zu, bis sich bei Erreichen einer kontinuierlichen Zellschicht, ein repräsentativer Widerstand eingestellt hatte. Reagierten die Zellen auf einen externen Stimulus mit einer Änderung ihrer Form, sodass die Verbindungen zwischen den Zellen verloren gingen, änderte sich auch die gemessene Impedanz. Daher konnte aus der Verminderung des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER) eine Erhöhung der Permeabilität des Zellmonolayers geschlussfolgert werden (Tiruppathi et al. 1992).

3.19.1 Versuchsaufbau *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing*

Die Isolation und Kultivierung der Zellen auf den Goldelektroden im Rahmen dieser Studie wurde freundlicherweise von Frau Doris Stoll (Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf einem 8W10E Messarray mit 8 Messkammern und jeweils zehn Goldelektroden pro *well* (8W10E, Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA) (Tiruppathi et al. 1992). Dabei wurden die Messkammern vor dem Hinzufügen der Zellen gelatiniert (Gelatine, Sigma, Deisenhofen), damit eine Adhärenz der Zellen gewährleistet werden konnte. Während der Kultivierung inkubierten die Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Ein letzter Mediumswechsel wurde 16 Stunden vor Versuchsbeginn durchgeführt. Dabei wurde jeder Messkammer (nach Entfernung des verbrauchten Mediums) 400 µl Endothel-Basal-Medium (PAA Laboratories GmbH, Österreich) + 2 % FCS (PAA Laboratories GmbH, Österreich) hinzugefügt.

Die eingespannten Goldelektroden befanden sich während der Messung in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO₂). Pro Versuchsdurchgang konnten zwei Messarrays in den Inkubator zwischen eine Arbeits- und eine Gegenelektrode eingespannt werden. Während des Messzeit-

raumes waren die Elektroden an einen PC gesteuerten Impedanz-Analysator (Applied Bio-Physics®, Applied Biophysics Inc., Troy, New York, USA) angeschlossen, der die Messdaten erfasste und verarbeitete. Hierbei wurden die Werte jeder einzelnen Elektrode kontinuierlich erfasst und das Verhältnis zwischen gemessenem Widerstand und Grundwiderstand normallisiert. Bei einer Spannung von 1 V und einer Frequenz von 4 000 Hz wurde ein konstanter Stromfluss erreicht. Zur Applikation der Stimulanzen musste der Impedanz-Analysator vorsichtig geöffnet werden und die jeweilige Substanz zügig und gleichmäßig über die Gold-elektroden der jeweiligen Messkammer pipettiert werden.

3.19.2 Stimulation von humanen umbilikalvenösen Endothelzellen mit Antibiotika und Thrombin

Nach Start der Messung erfolgte eine einstündige Messzeit ohne Stimulation zur Festlegung der Grundwiderstände (baseline). Dabei wurde darauf geachtet, dass vor der Stimulation ein Grundwiderstand von 900 – 1 000 Ω vorlag. Anschließend wurden die Zellen entweder mit Ampicillin oder Moxifloxacin in einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Als Kontrolllösung wurde sterile isotone Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % B.Braun Melsungen AG, Melsungen) verwendet. Nach einer weiteren Stunde erfolgte dann die Stimulation der Zellen mit 0,5 U/ml Thrombin (Sigma, Deisenhofen) oder steriler isotoner Kochsalzlösung als Kontrolle. In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Zellen zeitgleich mit je einem Antibiotikum (Ampicillin oder Moxifloxacin) und Thrombin 0,5 U/ml bzw. Kontrolllösung behandelt. Um zu untersuchen, ob Moxifloxacin im Vergleich zu Ampicillin einen direkten Einfluss auf die basale Integrität der Endothelzellen hatte, wurde in einem Versuchsansatz nur eine Inkubation mit den Antibiotika ohne anschließenden oder zeitgleichen Thrombinstimulus durchgeführt.

Die kontinuierliche Aufzeichnung der Impedanz, *Resistance* und Kapazität erfolgte in jedem der Versuchsansätze anschließend über 6 Stunden.

3.20 Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* unter Zugabe von Antibiotika

Um den Einfluss von Moxifloxacin und Ampicillin auf das *in vitro* Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* zu untersuchen, wurde *S. pneumoniae* wie unter Punkt 3.2 beschrieben angezüchtet. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3 – 0,4) wurde das Kulturmedium mit Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) versetzt und das weitere Wachstum mittels Photometer in 15 – 30 minütigen Abständen bestimmt. Die

Antibiotika wurden dabei zunächst in einer Konzentration von 40 µg/ml und in einem weiteren Versuch in einer Konzentration von 80 µg/ml eingesetzt.

3.21 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung aller Daten wurde mithilfe des Graphik- und Statistikprogramms GraphPad Prism 4.0 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, California, USA) durchgeführt.

Die Daten wurden als arithmetischer Mittelwert (*mean*) ± Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD) angegeben.

Zur statistischen Analyse der Messwerte im humanen Lungenmodell gegeneinander wurde jeweils ein nicht-parametrischer *two-tailed* Mann-Whitney U-Tests herangezogen (Abbildungen 7 - 9).

Die statistische Analyse der Körpertemperatur sowie des Körpergewichts der Tiere erfolgte ebenfalls mit einem nicht-parametrischen *two-tailed* Mann-Whitney U-Test. Dabei wurden die einzelnen Zeitpunkte separat getestet (Abbildungen 10 und 11). Dieser Test wurde darüber hinaus zur Auswertung der Unterschiede zwischen verschiedenen Tierversuchsgruppen verwendet (Abbildungen 12 – 20).

Zur statistischen Analyse des Wachstumsverhaltens von *Streptococcus pneumoniae* unter Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin (Abbildung 24) wurden ebenfalls einzelne Zeitpunkte mit einem nicht-parametrischen *two-tailed* Mann-Whitney U-Test separat getestet.

Dabei wurde ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Moxifloxacin hemmt im Gegensatz zu Ampicillin die Produktion von Entzündungsmediatoren im isolierten humanen Lungengewebe nach TNF- α Stimulation

Um den Einfluss von Moxifloxacin auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 in humanem Lungengewebe genauer zu untersuchen, wurde isoliertes humanes Lungengewebe mit TNF- α oder Lösungsmittel (RPMI-1640) stimuliert und mit Ampicillin (40 $\mu\text{g/ml}$), Moxifloxacin (40 $\mu\text{g/ml}$) oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) behandelt. Die vom Lungengewebe sezernierten Zytokine wurden anschließend in den Überständen gemessen. Die Zytokine wurden jeweils mittels ELISA quantifiziert.

Im Vergleich zur Lösungsmittel-Applikation führte die Stimulation des Lungengewebes mit TNF- α zu einem signifikanten Anstieg der gemessenen Zytokinmenge in allen Gruppen. Dabei war die Sekretion des Zytokins IL-6 nach Stimulation mit TNF- α und Behandlung mit Moxifloxacin im Gegensatz zu der Ampicillin-Behandlung signifikant reduziert. Dagegen wies der Zytokinspiegel von IL-8 lediglich einen Trend hinsichtlich einer stärkeren Reduktion nach Moxifloxacin-Therapie auf (Abb. 7). Interessanterweise erniedrigte Moxifloxacin bereits die basale IL-6 Sekretion signifikant.

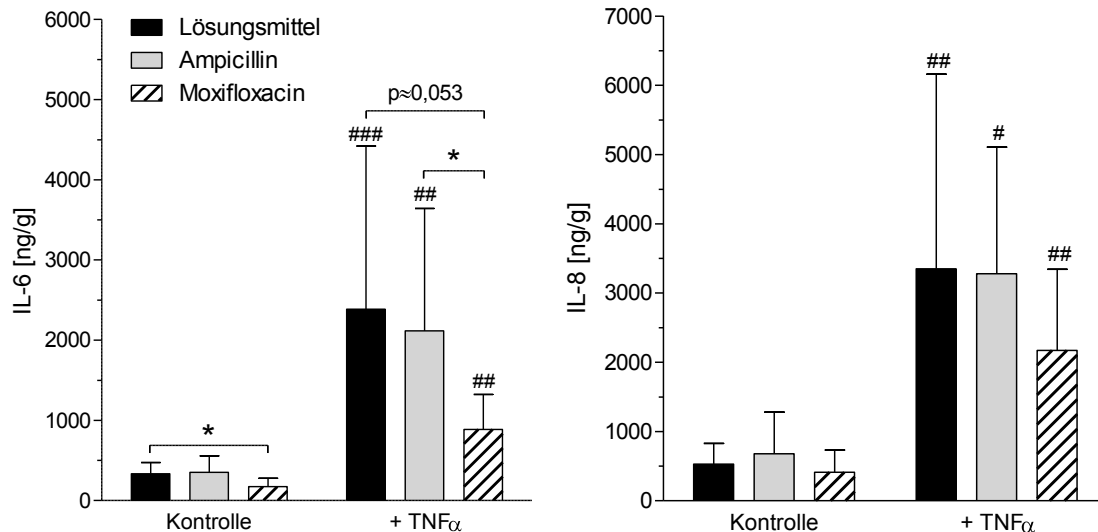


Abbildung 7: **Zytokine im humanen Lungengewebe nach TNF- α Stimulation**: Humanes Lungengewebe wurde 1 h nach Stimulation mit TNF- α oder Lösungsmittel (RPMI-1640) mit Ampicillin (40 μ g/ml), Moxifloxacin (40 μ g/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde Gewebe für Analysen asserviert. Kontrollstimuliertes Gewebe (NaCl 0,9 %) wurde ebenfalls antibiotisch oder mit Lösungsmittel behandelt. Die Zytokine wurden im ELISA aus den Überständen quantifiziert. (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrollgruppe; $n = 7$)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

4.2 Moxifloxacin und Ampicillin reduzieren die bakterielle Last im isolierten humanen Lungengewebe nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Die Infektion der humanen Lungenproben mit *S. pneumoniae* führte zum Zeitpunkt 16 Stunden *p.i.* zu einem Anstieg der bakteriellen Last, die nach der Behandlung mit Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) und weiteren 8 Stunden Inkubation signifikant anstieg. Die Applikation von Ampicillin (40 μ g/ml) oder Moxifloxacin (40 μ g/ml) reduzierte die Bakterienlast signifikant im Vergleich zur infizierten, kontrollbehandelten Gruppe 8 Stunden nach der Behandlung (Abb. 8). Im Gegensatz zu der Moxifloxacin-Behandlung war 24 Stunden *p.i.* die Erregerlast unter Ampicillin-Therapie signifikant niedriger.

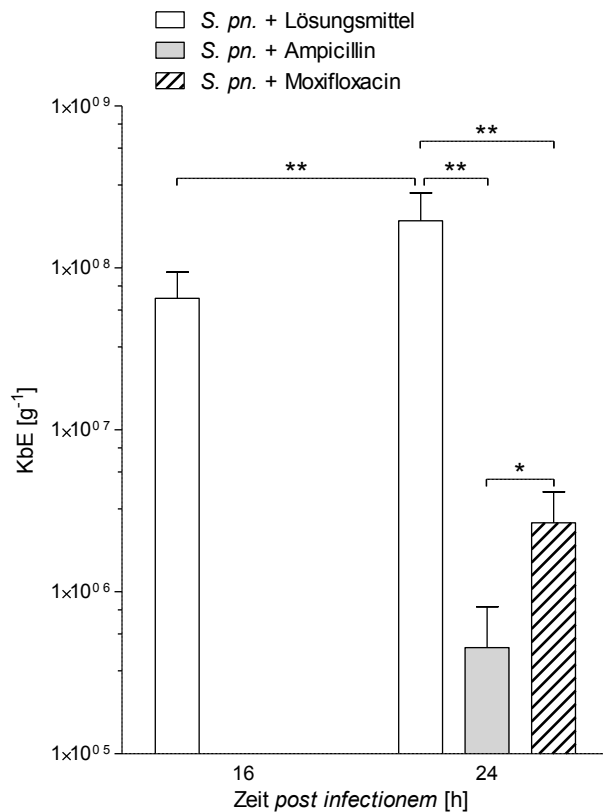


Abbildung 8: **Bakterielle Last im humanen Lungengewebe:** Humanes Lungengewebe wurde mit 1×10^2 KbE/ml *Streptococcus pneumoniae* oder mit Lösungsmittel (RPMI-1640) infiziert. 16 h nach der Infektion wurden die Proben mit Ampicillin (40 μ g/ml), Moxifloxacin (40 μ g/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. Zum Behandlungszeitpunkt sowie nach weiteren 8 h wurden die Gewebeproben homogenisiert und die KbE aus den Überständen bestimmt. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; $n = 6$)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, KbE koloniebildende Einheit

4.3 Moxifloxacin hat ähnlich wie Ampicillin keinen Einfluss auf die Produktion von Zytokinen im isolierten humanen Lungengewebe nach *Streptococcus pneumoniae* Infektion

Die Bestimmung der Zytokinproduktion erfolgte in humanem Lungengewebe, das zuerst mit *Streptococcus pneumoniae* oder Lösungsmittel (RPMI-1640) infiziert und anschließend mit Antibiotikum oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) behandelt wurde. Die Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 erfolgte in den Überständen der Lungenproben mittels ELISA.

Im Vergleich zur Lösungsmittel-Applikation führte die Infektion des Lungengewebes mit *S. pneumoniae* 16 Stunden *p.i.* zu erhöhten Zytokinspiegeln der Zytokine IL-6 und IL-8. Diese stiegen für IL-6 nach weiteren 8 Stunden Inkubation in allen mit *S. pneumoniae* infizierten

Gruppen signifikant an. Die Behandlung mit Ampicillin (40 µg/ml) oder Moxifloxacin (40 µg/ml) führte zu keiner signifikanten Abnahme der IL-6 oder IL-8 Sekretion verglichen mit den kontrollbehandelten Lungenproben (Abb. 9).

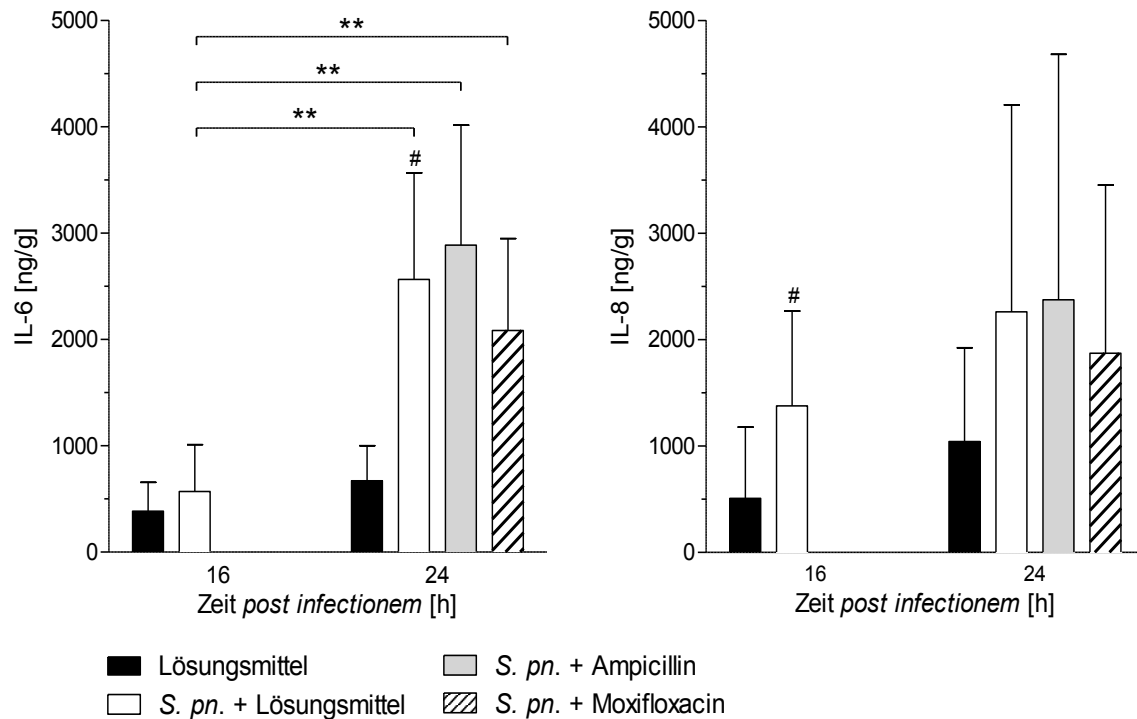


Abbildung 9: Zytokine im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae*: Humanes Lungengewebe wurde mit 1×10^2 KbE/ml *Streptococcus pneumoniae* oder mit Lösungsmittel (RPMI-1640) infiziert. 16 h nach Infektion wurden die Proben mit Ampicillin (40 µg/ml), Moxifloxacin (40 µg/ml) oder NaCl 0,9 % behandelt. Zum Behandlungszeitpunkt sowie nach weiteren 8 h wurden die Zytokine IL-6 und IL-8 aus den Überständen bestimmt. (** $p < 0,01$; # $p < 0,05$, vs. entsprechende Kontrollgruppe $n=6$) Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzung: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

4.4 Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf den klinischen Verlauf der Pneumonie

Zur Bewertung des *status præsens* der Mäuse erfolgte alle 12 Stunden nach Versuchsbeginn die Messung von Körpertemperatur und –gewicht.

Alle mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäuse entwickelten innerhalb von 24 Stunden nach der Infektion eine schwere Pneumonie, die sich klinisch im Abfall von Körpertemperatur

und –gewicht zeigte (Abb. 10 und 11). Mäuse, welche infiziert und mit Lösungsmittel scheinbehandelt wurden, bildeten bis 48 Stunden *p.i.* ein ARDS und eine schwere Sepsis aus. Erfahrungswerte mit dem murinen Pneumokokkenmodell ließen abschätzen, dass über den Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* hinaus die Tiere in solchem Ausmaß belastet und kurzfristig versterben würden, dass die Ausdehnung der Beobachtungsdauer nicht sinnvoll und ethisch nicht zu vertreten wäre. Daher wurden keine späteren Zeitpunkte für diese Gruppe geplant. Im Gegensatz dazu stieg die Körpertemperatur der mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g) behandelten Mäuse innerhalb von 12 Stunden nach Beginn der Behandlung wieder auf das Niveau der uninfizierten Tiere (Abb. 10). Auch das Allgemeinbefinden dieser Tiere verbesserte sich innerhalb der ersten 12 Stunden nach Therapiebeginn. Im Verlaufe des Beobachtungszeitraumes erholten sich die antibiotisch behandelten Tiere fast vollständig vom infektionsbedingten Gewichtsverlust (Abb. 11). Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Ampicillin- und Moxifloxacin-Behandlung bezogen auf die Körpertemperatur und das Körpergewicht.

Die Körpertemperatur lösungsmittelinfizierter Tiere blieb im gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Das Körpergewicht dieser Versuchsgruppe war bis auf Schwankungen, die auf die Narkose sowie die unterschiedlichen Tageszeiten zurückzuführen waren, ebenfalls konstant.

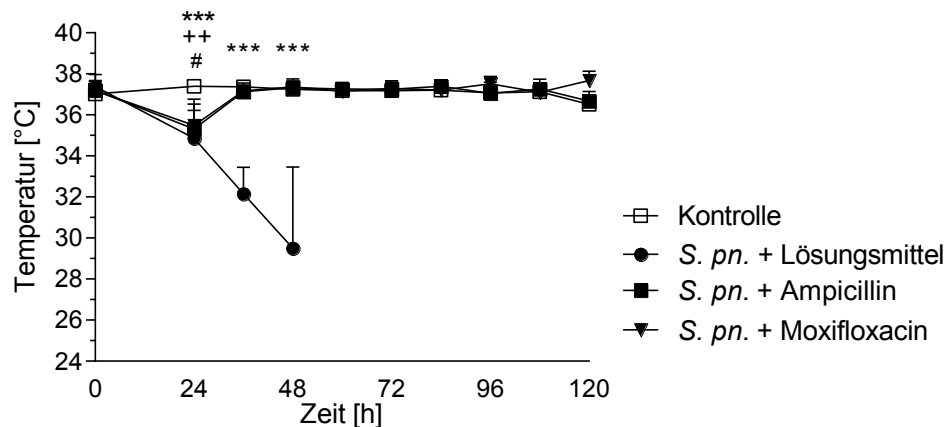


Abbildung 10: **Zeitlicher Verlauf der Temperatur im murinen Pneumoniemodell:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die Körpertemperatur wurde in Abständen von 12 h erfasst. (***) $p < 0,001$ vs. Kontrolle, ++ $p < 0,01$ vs. Moxifloxacin, # $p < 0,05$ vs. Ampicillin; $n = 6$)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzung: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

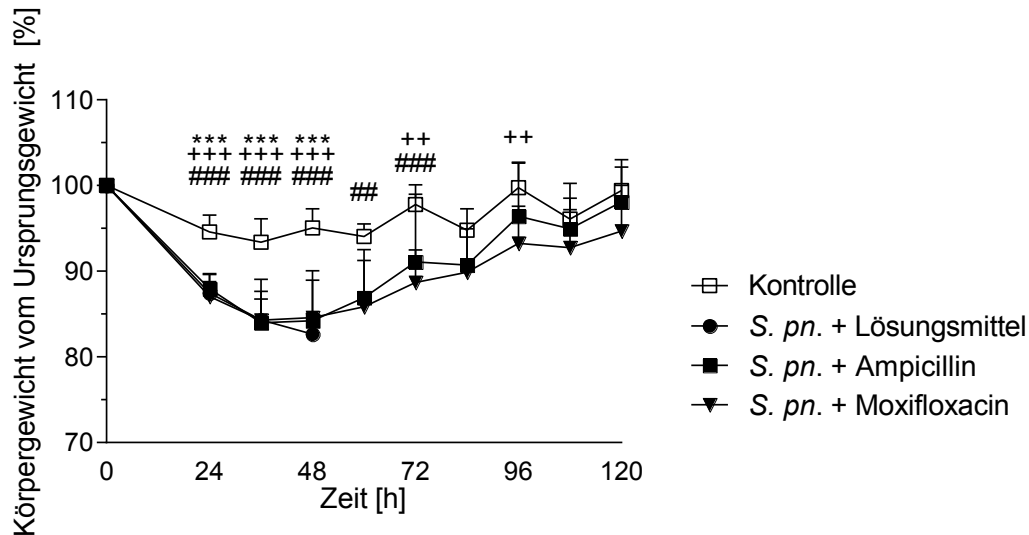


Abbildung 11: **Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts in % im murinen Pneumoniemodell:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Das Körpergewicht wurde in Abständen von 12 h gemessen und als prozentualer Anteil des Ursprungsgewichts aufgetragen. (***) $p < 0,001$ vs. Kontrolle, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs. Moxifloxacin, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ vs. Ampicillin; $n=6$) Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzung: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

4.5 Moxifloxacin reduziert die Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und im Blut effektiver als Ampicillin

Infizierte und mit Lösungsmittel behandelte Tiere wiesen zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* eine erhöhte Anzahl an Bakterien in der BALF sowie eine Bakteriämie und bakterielle Absiedlung in die Milz auf.

Die Bakterienlast in der BALF war nach der Behandlung mit Moxifloxacin (0,1 mg/g) zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* und unter Ampicillin-Therapie (0,02 mg/g) 48 Stunden *p.i.* im Vergleich zur infizierten, kontrollbehandelten Gruppe reduziert. Im Gegensatz zu Ampicillin behandelten Tieren resultierte aus der Behandlung mit Moxifloxacin eine signifikant niedrigere Bakterienlast in der BALF zu allen untersuchten Zeitpunkten (Abb. 12).

Auch Bakteriämien sowie Erregerzahlen in der Milz waren in beiden antibiotisch behandelten Gruppen zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* deutlich reduziert im Vergleich zur infizierten, kontrollbehandelten Gruppe (Abb. 13 und 14). Die Behandlung mit Moxifloxacin führte zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.* ebenfalls zu signifikant weniger Bakteriämien als jene mit Ampicillin. Zudem konnten in der mit Moxifloxacin behandelten Gruppe ab 72 Stunden *p.i.* sowohl im Blut als auch in der Milz keine Bakterien mehr nachgewiesen werden. Obwohl es zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Antibiotikagruppen bezüglich der bakteriellen Last in Blut (48 Stunden) und Milz gab, wiesen bemerkenswerterweise nur die mit Ampicillin behandelten Tiere 72 Stunden *p.i.* noch eine messbare Bakterienzahl in den beiden genannten Kompartimenten auf (Abb. 13 und 14).

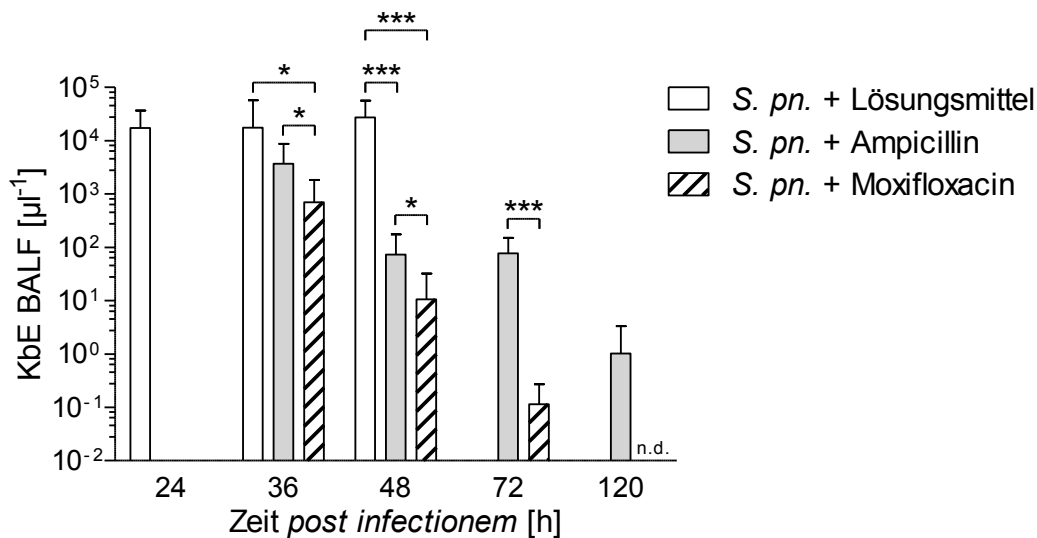


Abbildung 12: **Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die KbE wurden zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* in der BALF bestimmt. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 7 - 8$: 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, BALF bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit, KbE Koloniebildende Einheit, n.d. nicht detektierbar

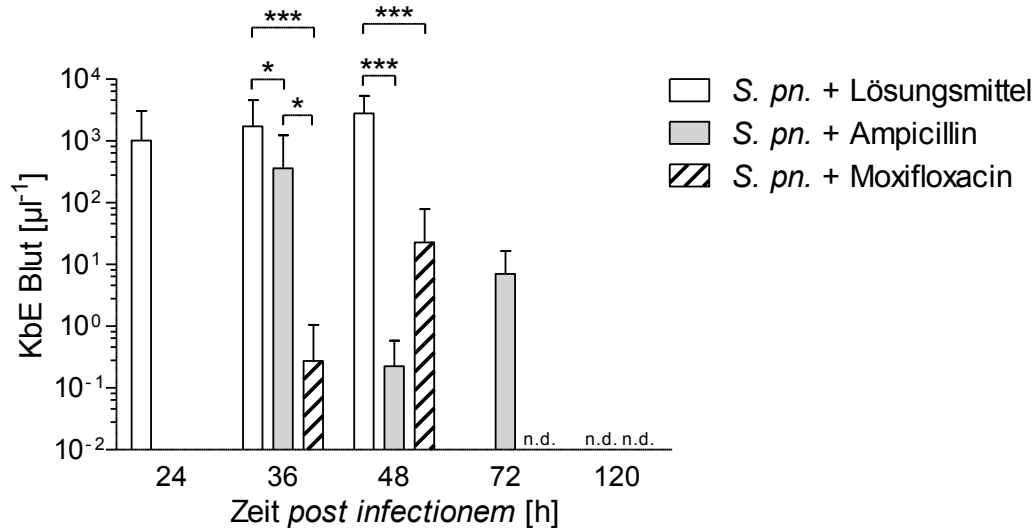


Abbildung 13: **Bakterienlast im Blut:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die KbE wurden zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* im Blut bestimmt. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ $n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, KbE Koloniebildende Einheit, n.d. nicht detektierbar

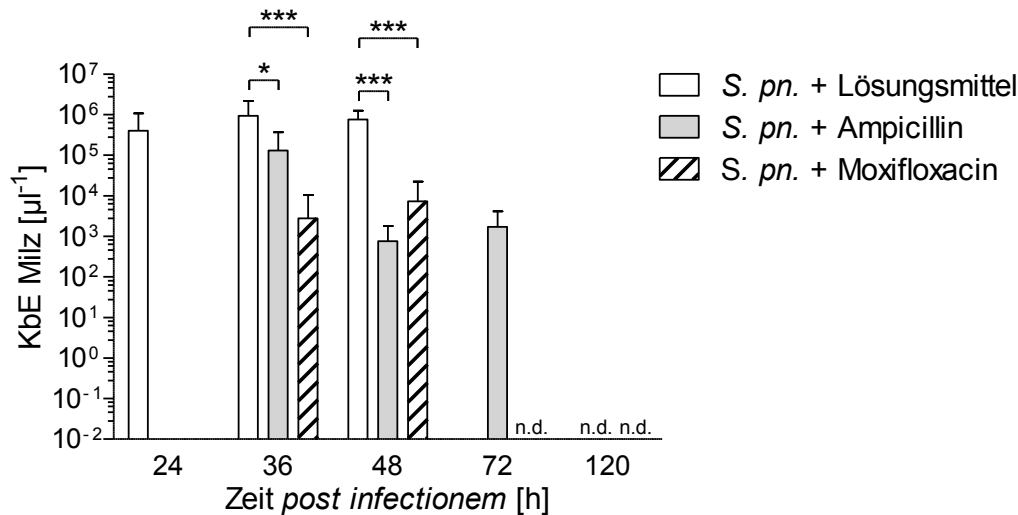


Abbildung 14: **Bakterienlast in der Milz:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die KbE wurden zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* in der Milz bestimmt. (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ $n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, KbE Koloniebildende Einheit, n.d. nicht detektierbar

4.6 Im Gegensatz zu der Behandlung mit Moxifloxacin weisen Mäuse unter Ampicillin-Therapie eine gesteigerte pulmonalvaskuläre Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie auf

Gesteigerte pulmonale (mikrovaskuläre) Permeabilität ist ein zentraler Mechanismus in der Entstehung des akuten Lungenversagens. Pulmonalvaskuläre Permeabilität wurde durch die Messung der Konzentrationen des murinen Serumalbumins (MSA), welches bei erhöhter pulmonaler Permeabilität vermehrt in den Alveolarraum übertreten kann, in der BALF sowie im Plasma mittels ELISA bestimmt. Als Maß für die Permeabilitätserhöhung wurde anschließend der Quotient aus den gemessenen Konzentrationen MSA BALF/ MSA Plasma berechnet.

Bereits 24 Stunden *p.i.* zeigten die infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tiere einen Anstieg der alveolokapillären Permeabilität im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe.

Dieser Anstieg setzte sich an den darauffolgenden Zeitpunkten bis 48 Stunden *p.i.* fort (Abb. 15).

Auch alle antibiotisch behandelten Versuchstiere wiesen in der akuten Phase der Pneumonie (36 Stunden *p.i.*) eine signifikant erhöhte Lungenpermeabilität im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe auf. Im Gegensatz zu der Ampicillin-Behandlung (0,02 mg/g) sowie zur Behandlung mit Lösungsmittel resultierte die alleinige Behandlung mit Moxifloxacin (0,1 mg/g) zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.* in einer signifikant reduzierten pulmonalvaskulären Permeabilität.

Zum Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* kam es zu einer signifikanten Reduktion der pulmonalvaskulären Permeabilität bei allen antibiotisch behandelten Mäusen im Vergleich zu den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren. Zu den Zeitpunkten 48 Stunden, 72 Stunden und 120 Stunden *p.i.* war kein Unterschied mehr zwischen den unterschiedlichen Antibiotikabehandlungen zu erheben. Verglichen mit den nicht infizierten Kontrolltieren war die pulmonalvaskuläre Permeabilität aller infizierter und mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelte Mäuse auch während der beginnenden Regenerationsphase (72 Stunden *p.i.*) weiterhin erhöht. Erst zum Zeitpunkt 120 Stunden *p.i.* lag die Permeabilität aller antibiotisch behandelte Mäuse auf dem Niveau der Kontrolltiere.

Um zu untersuchen, ob die reduzierte pulmonalvaskuläre Permeabilität der mit Moxifloxacin behandelte Tiere zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.* ein Resultat der besseren pulmonalen und systemischen Erregerelimination (vgl. Abb. 12 und 13 zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.*) im Gegensatz zu der Ampicillin-Behandlung zu diesem Zeitpunkt oder ein direkter Effekt von Moxifloxacin war, wurde bei den Permeabilitätsuntersuchungen eine weitere Versuchsgruppe zu den relevanten Zeitpunkten mitgeführt. Diese Tiere wurden simultan sowohl mit Ampicillin als auch mit Moxifloxacin behandelt. Dabei entsprachen die verabreichten Dosierungen jenen der Einzelbehandlungen (Ampicillin 0,02 mg/g, Moxifloxacin 0,1 mg/g). Es zeigte sich bei dieser kombiniert behandelte Gruppe ein Anstieg der Permeabilität, welcher mit jenem von Ampicillin zu den untersuchten Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* vergleichbar war (Abb. 15). Im Gegensatz zu der Ampicillin-Monotherapie war die Erregerlast in der BALF und im Blut der Ampicillin/Moxifloxacin Gruppe zum relevanten Zeitpunkt (36 Stunden *p.i.* Daten nicht gezeigt) erniedrigt, sodass der Effekt auf die pulmonalvaskuläre Permeabilität weder ein direkter Moxifloxacin-Effekt noch Resultat einer verbesserten Erregerelimination war. Die Daten legten nahe, dass Ampicillin im Gegensatz zu Moxifloxacin die Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie kurz nach Beginn der Behandlung erhöhte.

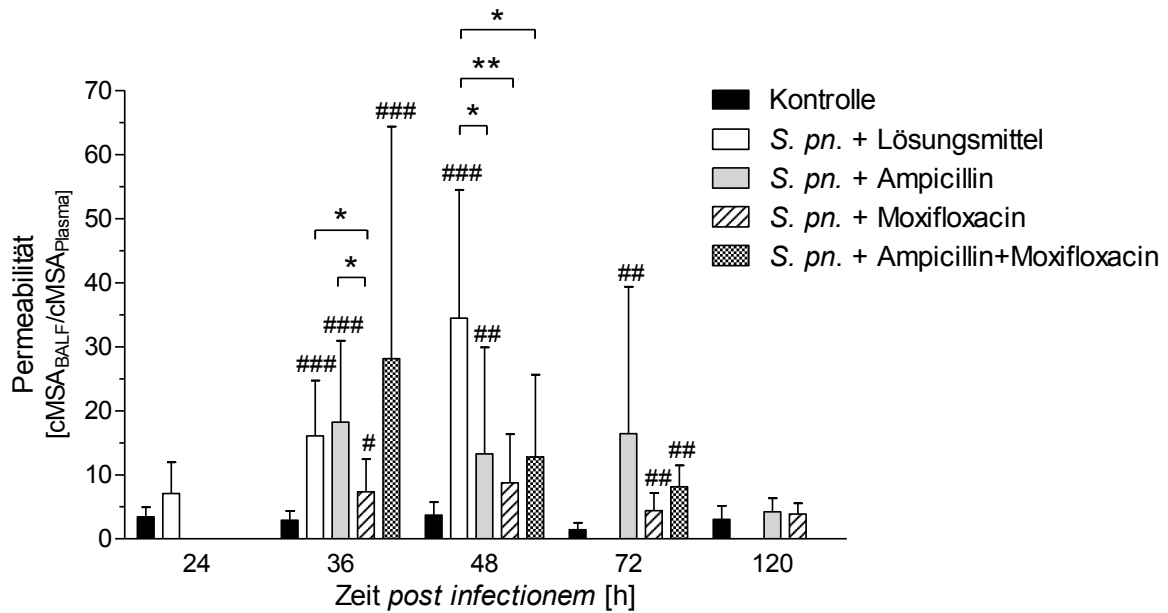


Abbildung 15: **Pulmonalvaskuläre Permeabilität in der Lunge:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g), Moxifloxacin (0,1 mg/g) oder mit beiden Antibiotika (Ampicillin 0,02 mg/g, Moxifloxacin 0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* untersucht. Mäuse, die beide Antibiotika bekamen, wurden bis zum Zeitpunkt 72 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Das murine Serumalbumin (MSA) wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* mittels ELISA in der BALF und im Plasma bestimmt. Der MSA BALF/Plasma Quotient wurde als Marker der pulmonalvaskulären Barrierefunktion berechnet. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; # $p < 0,05$, ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrollen $n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h und 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD. Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, MSA murines Serumalbumin

4.7 Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die Expression oder Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 β und KC

Um den Einfluss von Moxifloxacin auf die Expression und Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren während der schweren Pneumonie zu untersuchen wurden proinflammatorische Zytokine mittels qRT-PCR und Multiplex-ELISA Technik untersucht.

Die Expression der in der qRT-PCR untersuchten Zytokine IL-6, IL-1 β und KC war zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 36 Stunden sowie 48 Stunden *p.i.* in den infizierten und mit Lö-

sungsmittel behandelten Tieren im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren signifikant erhöht (Abb. 16 a und b).

Zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* resultierte die antibiotische Behandlung der Mäuse mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g) in einer verminderten mRNA Expression der Zytokine IL-6, IL-1 β und KC im Vergleich zu den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren. Im Verlauf des Untersuchungszeitraums ging die Expression der untersuchten Zytokine bei den antibiotisch behandelten Tieren weiter zurück, lag jedoch bei IL-6 und KC auch 120 Stunden *p.i.* noch über dem Niveau der uninfizierten Kontrolltiere. Es zeigte sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied zwischen der Therapie mit Ampicillin und Moxifloxacin bezüglich der hier untersuchten Zytokinexpression von IL-6, IL-1 β oder KC (Abb. 16 a und b).

Die Resultate der mittels Multiplex Array gemessenen Proteinmenge in der BALF waren konsistent mit den Ergebnissen der qRT-PCR. Im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren wiesen die infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tiere zu allen untersuchten Zeitpunkten erhöhte Zytokinspiegel der drei untersuchten Zytokine auf. Die Zytokinspiegel aller mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelten Mäuse nahmen im Verlauf des Versuchszeitraums ab (Abb. 16 a und b). Es zeigte sich bei den analysierten proinflammatorischen Mediatoren zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen Ampicillin- und Moxifloxacin-Behandlung. Bemerkenswerterweise lag der IL-1 β Spiegel der mit Ampicillin behandelten Mäuse zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.* tendenziell über dem der nicht antibiotisch behandelten Mäuse sowie über dem der mit Moxifloxacin behandelten Versuchsgruppe. Diese Tendenz war zum Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* nicht mehr vorhanden.

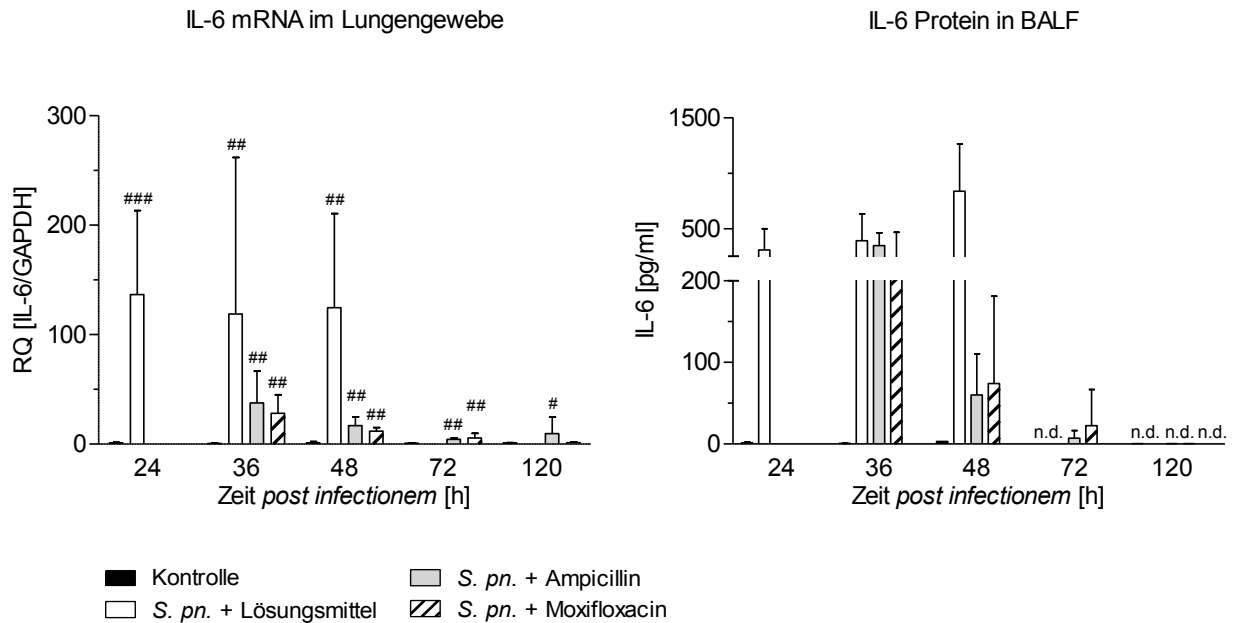


Abbildung 16a: Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und in der Lunge: Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 Stunden Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-6 wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* in der quantitativen PCR aus Lungenhomogenat bestimmt. (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollen; $n = 4 - 6$) Mittels Multiplex-Assay wurden das Zytokin IL-6 in der BALF quantifiziert. ($n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*) Aus technischen Gründen der Zytokinmessung differieren die Gruppengrößen. Statistische Vergleiche zwischen den Kontrollgruppen und den mit *S. pn.* infizierten Tieren wurden nicht durchgeführt, da die Messwerte der Kontrollen größtenteils unterhalb der Detektionsgrenzen lagen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD; Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, RQ relative Quantifizierung, mRNA messenger RNA

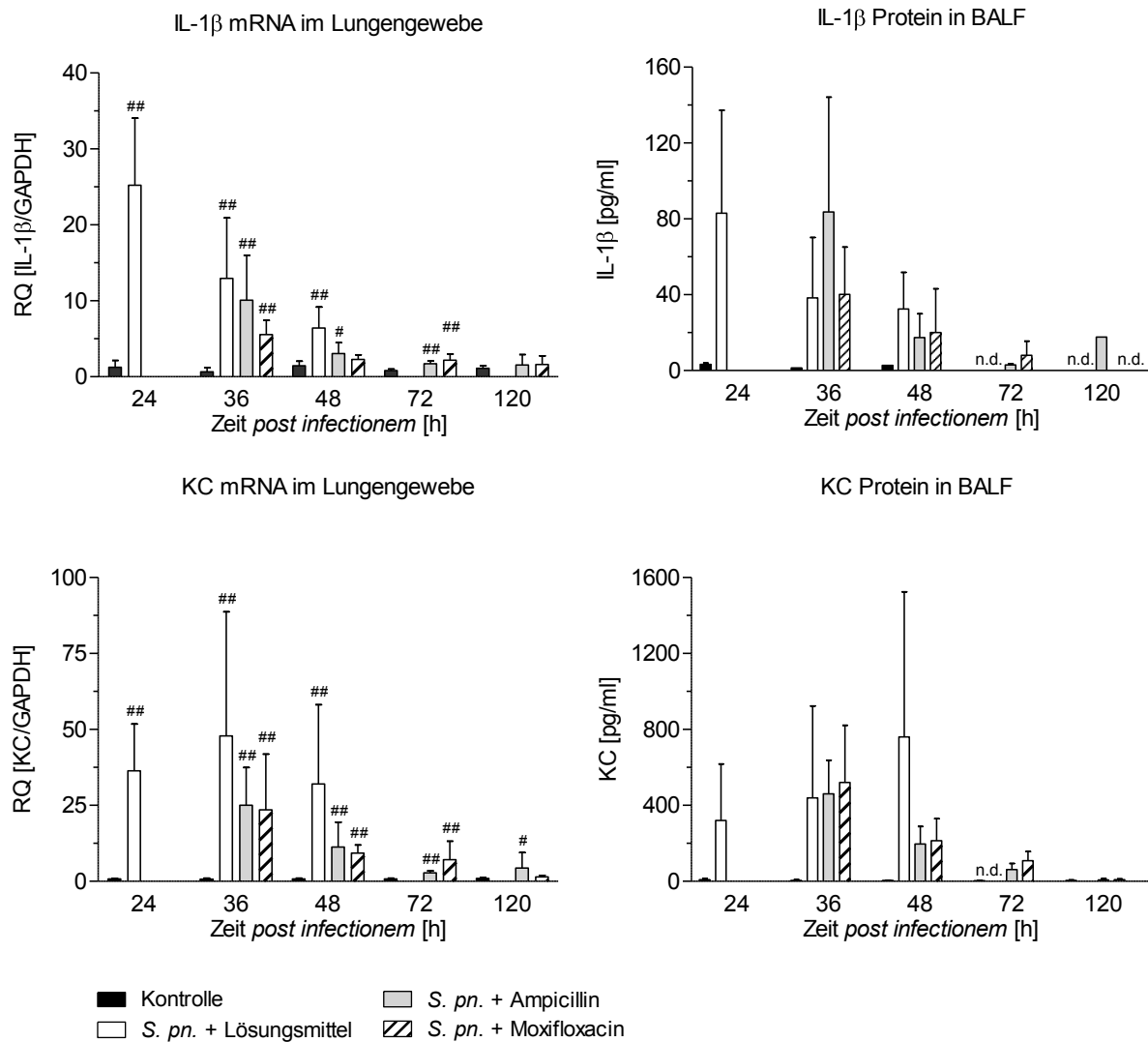


Abbildung 16b: Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und in der Lunge: Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 Stunden Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* und die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht.

Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und KC wurde zu den Zeitpunkten 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 120 h *p.i.* in der quantitativen PCR aus Lungenhomogenat bestimmt. (# $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs. entsprechende Kontrollen; $n = 4 - 6$)

Mittels Multiplex-Assay wurden die Zytokine IL-1 β und KC in der BALF quantifiziert. ($n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*) Aus technischen Gründen der Zytokinmessung differieren die Gruppengrößen. Statistische Vergleiche zwischen den Kontrollgruppen und den mit *S. pn.* infizierten Tieren wurden nicht durchgeführt, da die Messwerte der Kontrollen größtenteils unterhalb der Detektionsgrenzen lagen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD;

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, RQ relative Quantifizierung, mRNA messenger RNA

Um das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion zu untersuchen, wurden zudem die Zytokinkonzentrationen von KC und IL-6 im Blut bestimmt.

Im Blut zeigten sich in den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Mäusen bis einschließlich 48 Stunden *p.i.* erhöhte Spiegel der Zytokine IL-6 und KC verglichen mit den uninfizierten Kontrolltieren. Tiere, die antibiotisch behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu den infizierten scheinbehandelten Tieren sinkende Zytokinspiegel zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* ohne signifikante Unterschiede zwischen den Antibiotikagruppen (Abb. 17). Zu den Zeitpunkten 72 Stunden und 120 Stunden *p.i.* lagen die Zytokinspiegel aller Mäuse, die mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert und antibiotisch behandelt wurden, auf dem Niveau der Kontrolltiere.

Die Infektion der Tiere mit Lösungsmittel hatte weder in der BALF noch im Blut eine erhöhte Sekretion der untersuchten Zytokine zufolge (Abb. 16a/b und 17).

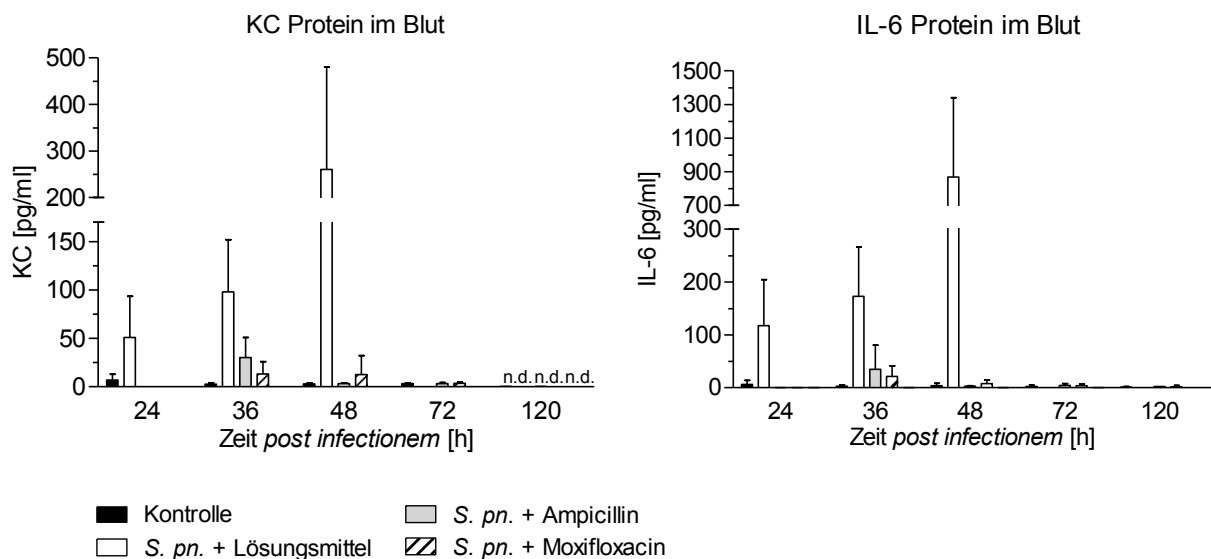


Abbildung 17: **Zytokine im Blut:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KBE *Streptococcus pneumoniae* transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht.

Mittels Multiplex-Assay wurde die Zytokine KC und IL-6 im Plasma quantifiziert. ($n=7-8$ 24 h, 36 h, 48 h, 72 h *p.i.*; $n=6$ 120 h *p.i.*) Aus technischen Gründen der Zytokinmessung differieren die Gruppengrößen. Vergleiche zwischen den Kontrollgruppen und den mit *S. pn.* infizierten Tieren wurden nicht durchgeführt, da die Messwerte der Kontrollen größtenteils unterhalb der Detektionsgrenzen lagen. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD; Abkürzung: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

4.8 Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die lokale und systemische zelluläre Entzündungsantwort

Die Differenzierung der Leukozyten in der BALF wurde zu den dargestellten Zeitpunkten mittels FACS-Analyse durchgeführt. Bereits 24 Stunden *p.i.* zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl in der BALF bei den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren verglichen mit den Kontrolltieren. Die Hauptfraktion bildeten dabei neutrophile Granulozyten. Die Zahl der Leukozyten blieb bei dieser Gruppe zu den darauffolgenden Zeitpunkten stabil (Abb. 18). Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere, die mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g) behandelt wurden, sinkende Leukozytenzahlen in der BALF ab 48 Stunden *p.i.* Es gab dabei keinen Unterschied zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 36 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden *p.i.* zwischen den Antibiotikagruppen, aber signifikant weniger Leukozyten 120 Stunden *p. i.* nach Behandlung mit Moxifloxacin. Die Hauptfraktion der gemessenen Leukozyten bildeten auch hier die neutrophile Granulozyten.

Bei den infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren fand sich bereits 24 Stunden *p.i.* eine signifikante Zunahme der Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF (Abb.18). Bis zum Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* erhöhte sich diese Zahl nur noch geringgradig. Im Verlauf des Beobachtungszeitraums sanken die Zahlen der neutrophilen Granulozyten sowohl unter Ampicillin- als auch unter Moxifloxacin-Therapie ohne signifikanten Unterschied. Aber auch 120 Stunden *p.i.* fanden sich noch gesteigerte Zahlen von neutrophilen Granulozyten in der BALF der antibiotisch behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die Differenzierung der Leukozytenpopulationen ergab weiterhin einen Anstieg der Alveolarmakrophagen (AM) während der bakteriellen Infektion bei allen mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren. Bemerkenswerterweise kam es im Verlauf des Beobachtungszeitraums unter Ampicillin-Therapie zu einem erneuten späten Anstieg von AM in der BALF, sodass sich zum Zeitpunkt 120 Stunden *p.i.* ein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Moxifloxacin und Ampicillin ergab.

Die Lymphozytenzahlen stiegen im späteren Verlauf der Infektion beginnend 36 Stunden *p.i.* bis zum Zeitpunkt 72 Stunden *p.i.* bei allen mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Mäusen im Vergleich zu den mit Lösungsmittel infizierten Tieren an. Im Vergleich zu den uninfizierten Kontrolltieren waren die Leukozytenzahlen auch 120 Stunden *p.i.* bei den antibiotisch behandelten Tieren weiterhin erhöht. Zu diesen Zeitpunkten war kein signifikanter Unterschied zwischen den Antibiotikagruppen zu verzeichnen.

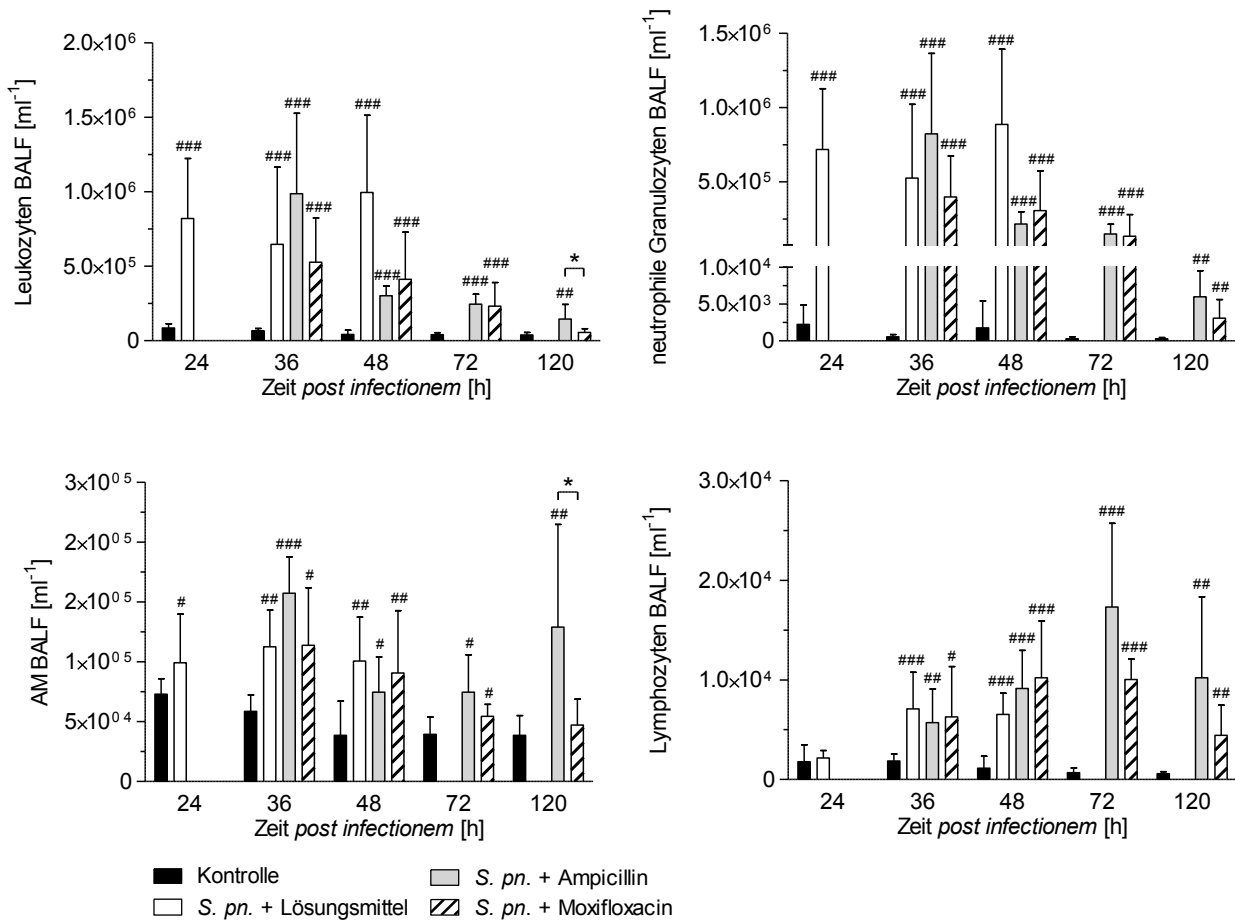


Abbildung 18: Leukozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit: Mäuse wurden mit 5×10^6 KBE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die Leukozyten wurden isoliert und mittels FACS-Analyse differenziert. (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, #### $p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrollen $n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h und 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, AM Alveolarmakrophagen

Zusätzlich erfolgte die Differenzierung und Quantifizierung der zellulären Immunantwort im Blut. Diese wurde ebenfalls mittels FACS-Analyse durchgeführt. Infizierte und mit Lösungsmittel behandelte Tiere zeigten einen Abfall der Gesamtleukozytenzahl des Blutes zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 48 Stunden *p.i.*. Auch die mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelten Tiere wiesen diesen Abfall der Leukozytenzahlen im Blut zu den Zeitpunkten 48 Stunden und 72 Stunden *p.i.* auf. Zum Zeitpunkt 120 Stunden *p.i.* stiegen die Leukozytenzahlen der antibiotisch behandelten Tiere auf das Niveau der Kontrolltiere an. Es gab zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Antibiotikagruppen.

Nach einem initialen Anstieg der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Blut der infizierten und scheinbehandelten Tiere 24 Stunden *p.i.* fiel die Zahl der neutrophilen Granulozyten bis zum Zeitpunkt 48 Stunden *p.i.* unter das Niveau der mit Lösungsmittel infizierten Tiere (Abb. 19). Die Zahlen der neutrophilen Granulozyten wiesen weder nach Behandlung mit Ampicillin noch mit Moxifloxacin zu den untersuchten Zeitpunkten einen signifikanten Unterschied auf. Weiterhin zeigte sich ein Abfall der Lymphozytenpopulation in allen mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Tieren zu den Zeitpunkten 24 Stunden, 36 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden *p.i.* unabhängig von der Therapie. Zum Zeitpunkt 120 Stunden *p.i.* stiegen die Lymphozytenzahlen im Blut aller antibiotisch behandelten Tiere auf das Niveau der Kontrollen. Es gab zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Antibiotikabehandlungen.

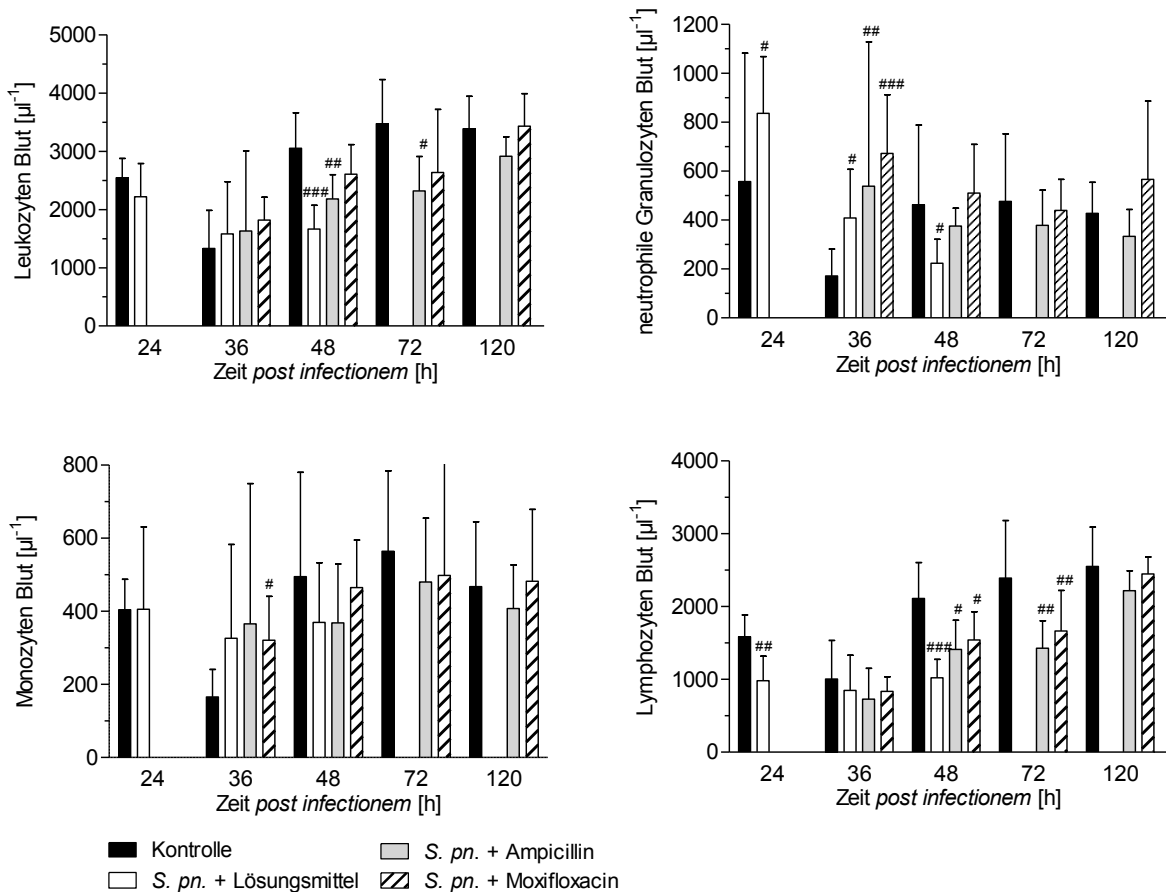


Abbildung 19: **Leukozyten im Blut:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die Leukozyten wurden aus dem Blut isoliert und mittels FACS-Analyse differenziert. ([#] $p < 0,05$, ^{##} $p < 0,01$, ^{###} $p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrollen; $n = 7 - 8$ 24 h, 36 h, 48 h und 72 h *p.i.*; $n = 6$ 120 h *p.i.*)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

4.9 Moxifloxacin hat einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die Ausprägung der histologischen Veränderungen im Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie

Lungengewebe wurde histologisch untersucht und der Grad der Gewebeschädigung semiquantitativ ausgedrückt. Dabei setzte sich der Grad der Gewebeschädigung unter anderem aus dem Ausmaß der vorhandenen Läsionen, der Art und der Anzahl der eingewanderten Zellen sowie der Menge der Bakterien in den Läsionen zusammen.

Infizierte und mit Lösungsmittel behandelte Tiere entwickelten bereits 24 Stunden *p.i.* eine akute katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie, die sich multifokal über die Lunge erstreckte. Zudem zeigte sich ein begleitendes perivaskuläres entzündliches Ödem.

Zu den Zeitpunkten 36 Stunden und 48 Stunden *p.i.* ließ sich semiquantitativ ein signifikanter Unterschied zwischen den infizierten und scheinbehandelten Tieren und der Behandlung mit Moxifloxacin (0,1 mg/g) darstellen (Abb. 20). Bei einzelnen antibiotisch behandelten Tieren zeigten sich bereits zu diesem Zeitpunkt erste Hinweise auf regenerative Veränderungen und es waren deutlich weniger Bakterien in den Läsionen vorhanden. Der Schweregrad und das Ausmaß der sichtbaren Läsionen in den infizierten, kontrollbehandelten Tieren waren zudem deutlich höher als in den antibiotisch behandelten Tieren (semiquantitativ; Abb. 20).

In den infizierten und scheinbehandelten Tieren stellte sich 48 Stunden *p.i.* eine geringgradige Hyperplasie von Typ II Pneumozyten dar. Dagegen zeigten die mit Moxifloxacin oder Ampicillin (0,02 mg/g) behandelten Mäuse bereits eher eine gering- bis mittelgradige Hyperplasie des gleichen Zelltyps als Zeichen der Regeneration. Alle Gruppen wiesen zu diesem Zeitpunkt weiterhin eine multifokale, katarrhalisch-eitrige und nekrotisierende Bronchopneumonie auf, die in ihrem Ausmaß in den infizierten und unbehandelten Tieren weiter voranschritt. Im Gegensatz dazu kam es in den antibiotisch behandelten Mäusen zu keiner Progression der Schäden. Antibiotisch behandelte Tiere zeigten zusätzlich eine zunehmende perivaskuläre Infiltration durch Lymphozyten. Außerdem war die in der HE-Färbung nachweisbare Bakterienzahl in den mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelten Tieren deutlich geringer als in den mit Lösungsmittel behandelten Mäusen.

Im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums zeigte sich bei den infizierten und mit Antibiotika behandelten Mäusen eine mittel- bis hochgradige Hyperplasie von Pneumozyten Typ II und ein Rückgang von Sekretansammlungen in den Alveolen und Bronchien unabhängig vom verwendeten Antibiotikum. Zudem gab es keine Anzeichen mehr von Ödemen. Jedoch persistierte auch 120 Stunden *p.i.* noch eine subakute, interstitielle, vereinzelt katarrhalisch-eitrige Bronchopneumonie in der Lunge aller mit *Streptococcus pneumoniae* infizierter und

mit Antibiotika behandelter Tiere. Die Hyperplasie von Typ II Pneumozyten sowie ein von Lymphozyten dominierter Leukozyteneinstrom ließen sich auch weiterhin finden.

Es ergab sich zu keinem Zeitpunkt ein morphologischer Unterschied zwischen den mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelten Mäusen.

Die Lungen der uninfizierten Kontrolltiere wiesen in der histologischen Untersuchung eine multifokale, geringgradige, akute, interstitielle Pneumonie auf, die sich überwiegend in einer interstitiellen Vermehrung von Histozyten und neutrophilen Granulozyten ausdrückte. Im späteren Verlauf ließ sich vereinzelt eine minimal katarrhalisch-eitrige Komponente bei einigen Tieren erkennen. Zudem waren auch hier regenerative Veränderungen zu finden.

Bei einzelnen Tieren konnte zudem zu den Zeitpunkten 48 Stunden und 72 Stunden *p.i.* eine multifokale, eitrige Hepatitis bzw. multifokale Parenchymnekrosen nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren jedoch nicht spezifisch für eine der untersuchten Gruppen.

Ein einziges mit Moxifloxacin behandeltes Tier wies 120 Stunden *p.i.* Zeichen einer Hepatitis auf.

Die Darmschleimhaut der Tiere war bei allen Gruppen in allen Darmabschnitten unauffällig. Ebenso waren die Nieren der Tiere bei allen Gruppen unauffällig.

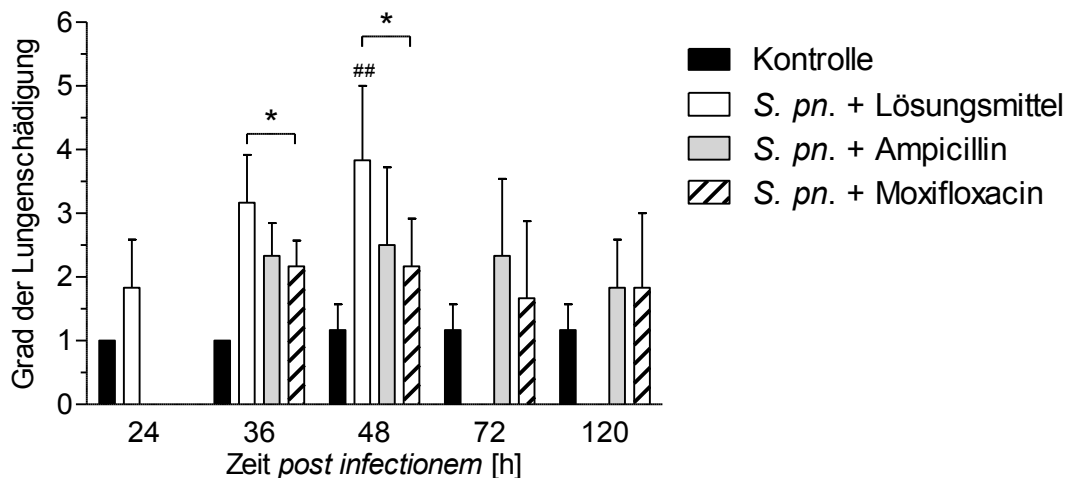


Abbildung 20: **Grad der histopathologischen Veränderungen:** Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *Streptococcus pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 24 h nach der Infektion erhielten die Mäuse alle 12 h eine antibiotische Behandlung entweder mit Ampicillin (0,02 mg/g) oder Moxifloxacin (0,1 mg/g). Kontrollinfizierte und kontrollbehandelte Tiere (Kontrolle) sowie mit *Streptococcus pneumoniae* infizierte und kontrollbehandelte Tiere (*S. pn.* + Lösungsmittel) erhielten Lösungsmittel-Applikationen ebenfalls in 12 h Intervallen. Infizierte und kontrollbehandelte Tiere wurden bis zum Zeitpunkt 48 h *p.i.* die übrigen Gruppen bis 120 h *p.i.* untersucht. Die Lungen wurden den Tieren entnommen und in einer vierprozentigen Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Aus der Bewertung wurde ein quantitativer „Schweregrad-Score“ erstellt. (* $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, vs. entsprechende Kontrolle $n=6$)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

Abkürzung: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*

4.10 Moxifloxacin hat genauso wie Ampicillin keinen Einfluss auf den transzellulären elektrischen Widerstand humaner umbilikalvenöser Endothelzellmonolayer *in vitro*

Um die direkte Auswirkung einer Moxifloxacin-Applikation auf die Barrierefunktion von Endothelzellen bestimmen zu können, wurden Untersuchungen an Monolayern humaner umbilikalvenöser Endothelzellen aus Primärkulturen (HUVEC) durchgeführt und der transzelluläre elektrische Widerstand (TER) als Maß für die endotheliale Barrierefunktion bestimmt.

Zunächst wurde die Auswirkung einer Stimulation mit Ampicillin (40 µg/ml) oder Moxifloxacin (40 µg/ml) auf die basale Integrität des Monolayers untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Applikation von Moxifloxacin oder Ampicillin alleine keinen Einfluss auf den TER hatte (Abb. 21). Des Weiteren wurde der Einfluss einer Vorbehandlung der HUVEC mit Ampicillin (40 µg/ml) oder Moxifloxacin (40 µg/ml) auf die thrombininduzierte Widerstandsveränderung am Monolayer untersucht. Die Applikation der Antibiotika erfolgte eine Stunde vor der Stimulierung mit Thrombin. Thrombin reduzierte den TER durch die Störung der Zellintegrität. Die Vorbehandlung der Zellen mit Ampicillin oder Moxifloxacin in der angewandten Konzentration von jeweils 40 µg/ml hatte keinen Einfluss auf die thrombinvermittelte Widerstandserniedrigung (Abb. 22). Auch bei zeitgleicher Stimulation der Zellen mit Thrombin und Ampicillin oder Moxifloxacin bzw. Kontrollösung (NaCl 0,9 %) kam es zu einer thrombinvermittelten Widerstandserniedrigung, auf die die Antibiotika-Applikation keinen Einfluss zeigte (Abb. 23).

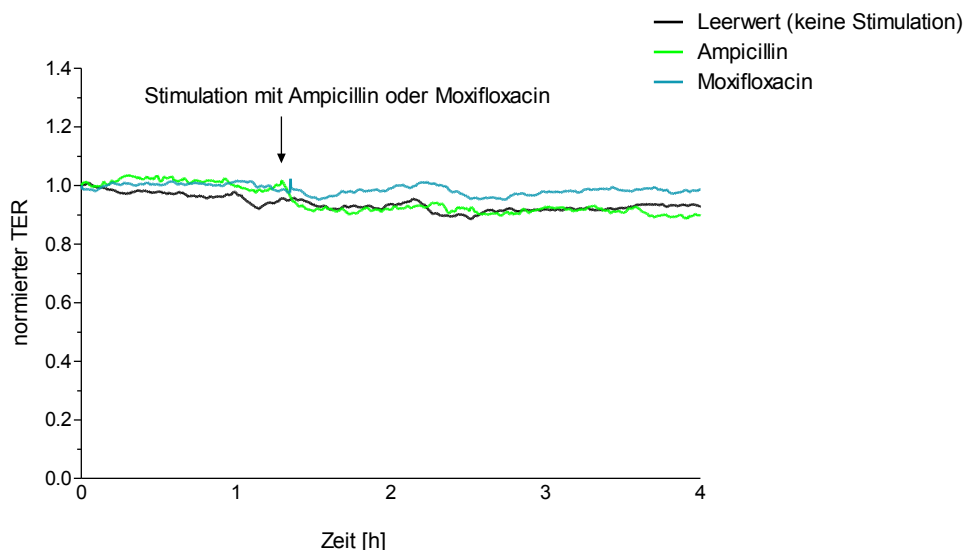


Abbildung 21: **Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Antibiotika und Messung des transzellulären elektrischen Widerstands:** Nach einstündiger Messung des Widerstandes (Baseline) wurde der HUVEC-Monolayer mit Ampicillin (40 µg/ml) oder Moxifloxacin (40 µg/ml) stimuliert. Der Leerwert bezeichnet jene Zellen, die keiner Stimulation unterlagen. (n=2) Die Daten sind angegeben als Mittelwert.

Abkürzungen: TER transzellulärer elektrischer Widerstand, HUVEC *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

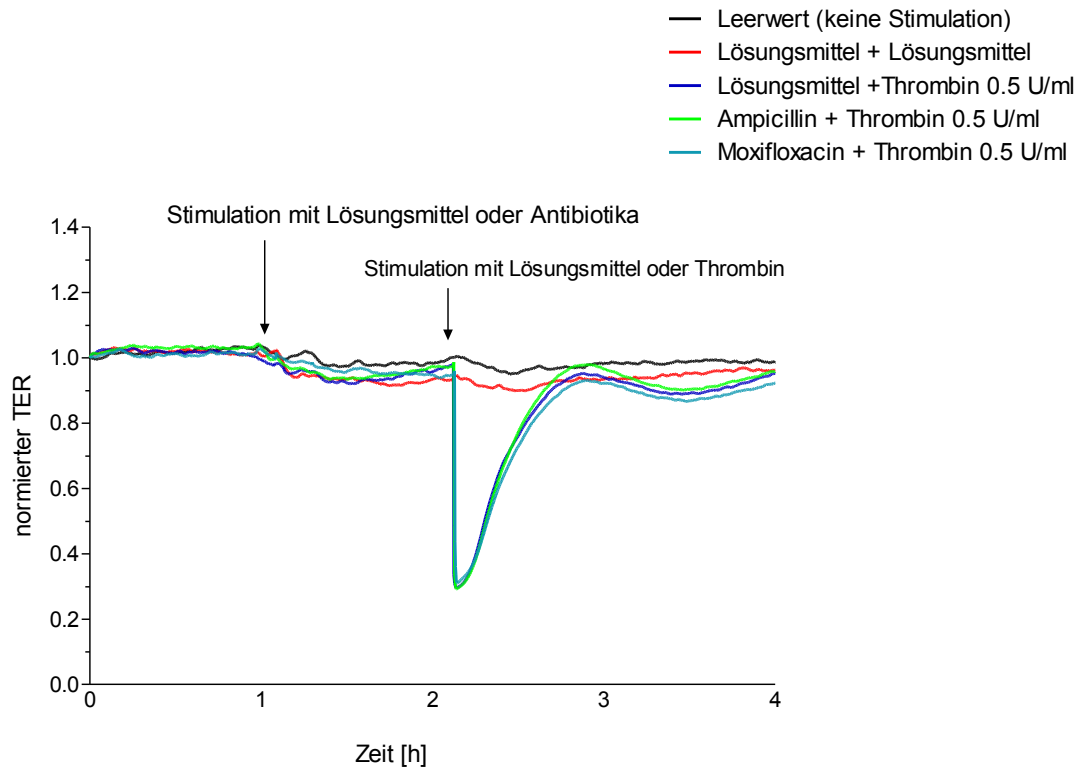


Abbildung 22: **Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Thrombin und Antibiotika sowie Messung des transzellulären elektrischen Widerstands:** Nach einstündiger Messung des Widerstandes (Baseline) wurde der HUVEC-Monolayer mit Ampicillin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Moxifloxacin (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) vorstimuliert. Nach einer weiteren Stunde erfolgte die Zugabe von Thrombin und eine sofortige Minderung des Widerstandes aller Proben wurde sichtbar. Der Leerwert bezeichnet jene Zellen, die keiner Stimulation unterlagen. (n=3)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert.

Abkürzungen: TER transzellulärer elektrischer Widerstand, HUVEC *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

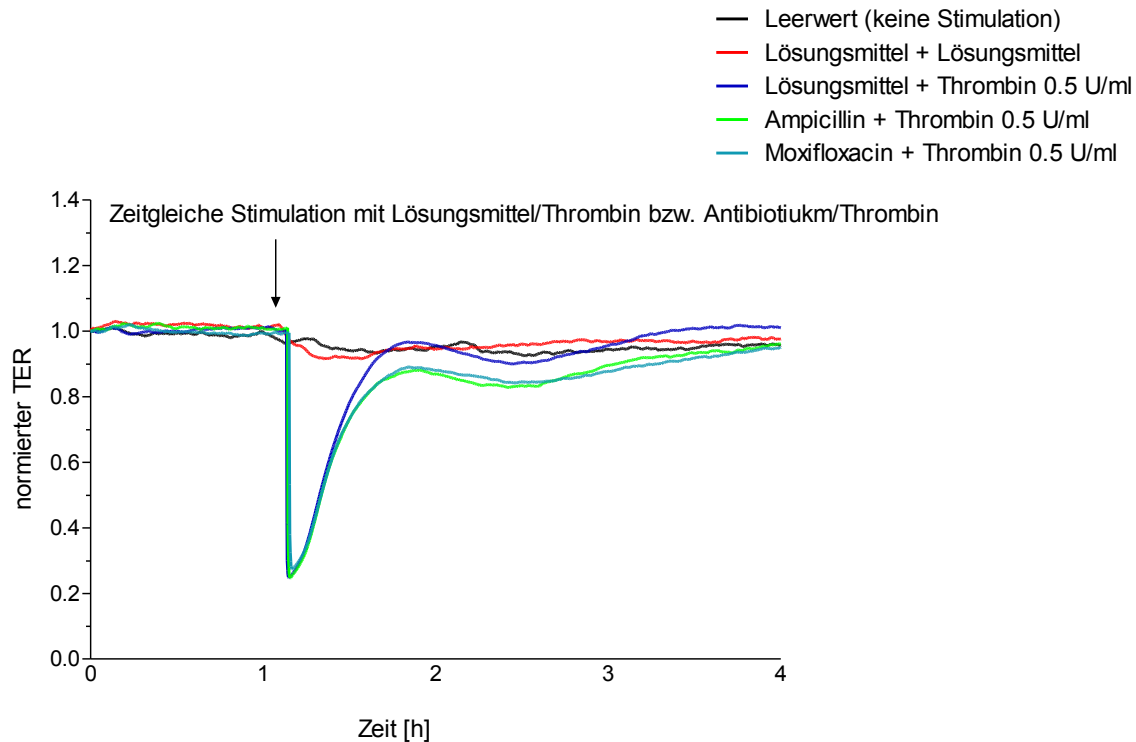


Abbildung 23: **Zeitgleiche Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Thrombin und Antibiotika sowie Messung des transzellulären elektrischen Widerstands:** Nach einstündiger Aufzeichnung des Basiswertes (Baseline) erfolgte die simultane Stimulation mit Thrombin und Ampicillin (40 µg/ml) oder Moxifloxacin (40 µg/ml) oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %). Der Einsatz der Antibiotika hatte keinen Einfluss auf die Widerstandsverminderung. Der Leerwert bezeichnet jene Zellen, die keiner Stimulation unterlagen. (n=3)
Die Daten sind angegeben als Mittelwert.
Abkürzungen: TER transzellulärer elektrischer Widerstand, HUVEC *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

4.11 Ampicillin verlangsamt das Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* *in vitro* effektiver als Moxifloxacin

Das Wachstumsverhalten von *Streptococcus pneumoniae* wurde *in vitro* nach Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin bzw. Lösungsmittel bestimmt. Nach Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} 0,3 – 0,4) wurde mit *Streptococcus pneumoniae* beimpftes Kulturmedium mit Ampicillin (40 µg/ml), Moxifloxacin (40 µg/ml) oder mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) versetzt und das weitere Wachstum mittels Photometer in 15 – 30 minütigen Abständen bestimmt. Dabei zeigte die Probe, welche mit Ampicillin versetzt wurde ein deutlich verlangsamtes Wachstum bis hin zur Abnahme der OD_{600} . Im Gegensatz dazu verlangsamt die Zugabe von Moxifloxacin das Wachstum zwar, allerdings ließ

es sich nicht gänzlich verhindern und es kam nicht zu einer Abnahme der OD_{600} (Abb. 24). Das Wachstum der mit Lösungsmittel behandelten Kontrolle blieb unbeeinflusst.

Auch die Zugabe der doppelten Konzentration der Antibiotika (jeweils 80 $\mu\text{g/ml}$) führte zu einer schnelleren Abnahme des Bakterienwachstums und einer Verminderung der OD_{600} nach Ampicillin-Applikation verglichen mit Moxifloxacin (Abb. 25). Ampicillin schien im Gegensatz zu Moxifloxacin in beiden verwendeten Konzentrationen relevant mehr Bakterien zu lysieren. Daraus resultierte eine Verminderung der OD_{600} nach Zugabe von Ampicillin.

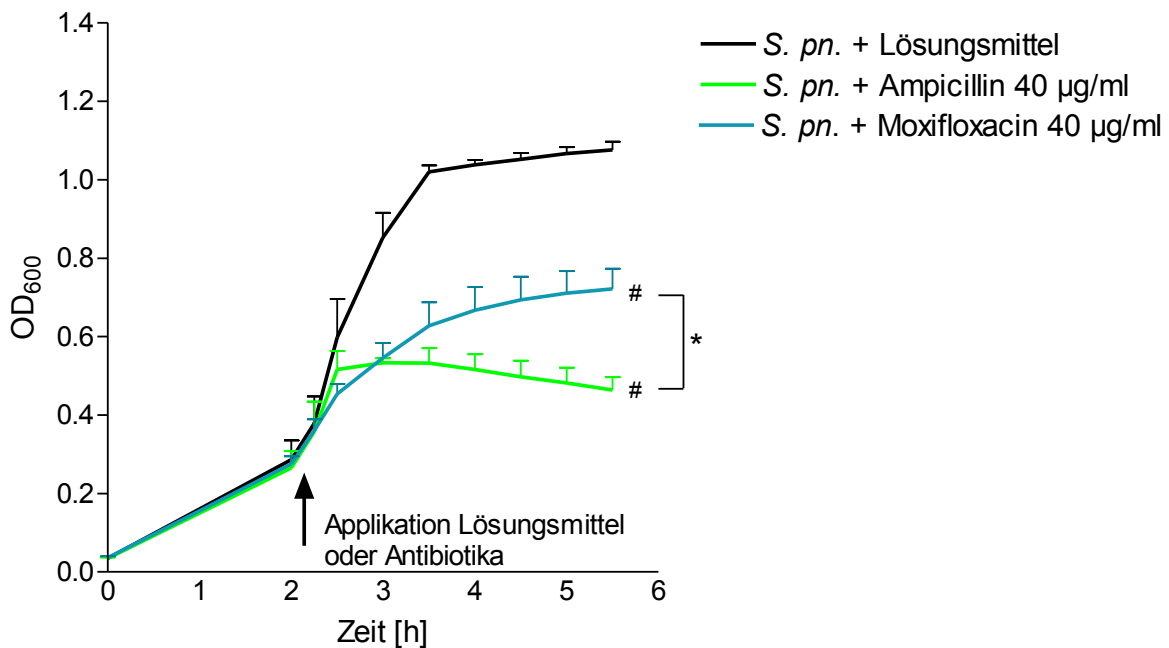


Abbildung 24: **Wachstumsverhalten von *Streptococcus pneumoniae* unter Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin (40 $\mu\text{g/ml}$)**: Nährmedien beimpft mit *S. pneumoniae* wurden nach Erreichen der log-Phasen (OD_{600} 0,3 – 0,4) mit Ampicillin, Moxifloxacin (je 40 $\mu\text{g/ml}$) oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) versetzt. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte beurteilt. Nach Ampicillingabe stellte sich innerhalb von 45 min eine rasche Verminderung des Wachstums ein, wohingegen die Zugabe von Moxifloxacin in einem langsameren Anstieg der Wachstumskurve verglichen mit der Kontrolle resultierte. (* $p < 0,05$, # $p < 0,05$, vs. *S.pn.* + Lösungsmittel; $n=4$).

Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm SD.

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, OD optische Dichte

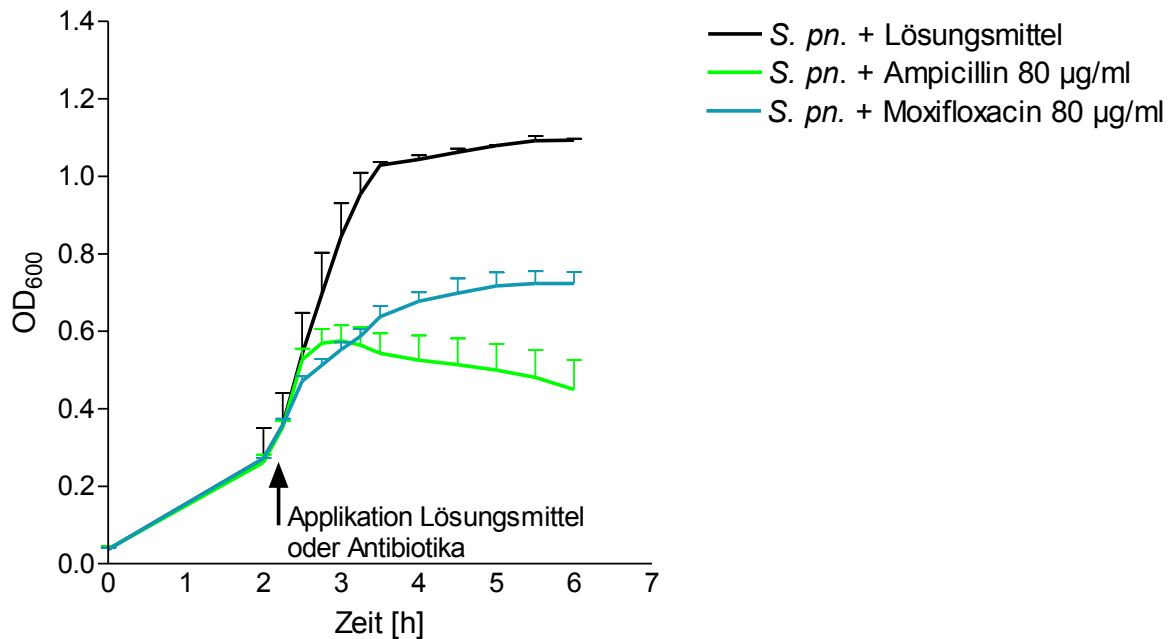


Abbildung 25: **Wachstumsverhalten von *Streptococcus pneumoniae* unter Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin (80 µg/ml)**: Nährmedien beimpft mit *S. pneumoniae* wurden nach Erreichen der log-Phasen (OD₆₀₀ 0,3 – 0,4) mit Ampicillin, Moxifloxacin (je 80 µg/ml) oder Lösungsmittel (NaCl 0,9 %) versetzt. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte beurteilt. Nach Ampicillingabe stellte sich innerhalb von 45 min eine rasche Verminderung des Wachstums ein, wohingegen die Zugabe von Moxifloxacin in einem langsameren Anstieg der Wachstumskurve verglichen mit der Kontrolle resultierte. (n=2). Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD.

Abkürzungen: *S. pn.* *Streptococcus pneumoniae*, OD optische Dichte

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Moxifloxacin im Vergleich zu Ampicillin auf verschiedene Parameter der Entzündungsreaktion in isoliertem humanem Lungengewebe, stimuliert mit TNF- α oder *Streptococcus pneumoniae* und in einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie untersucht.

In vitalem explantiertem humanem Lungenwebe, stimuliert mit TNF- α , reduzierte Moxifloxacin im Gegensatz zu Ampicillin die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-6. Dieses Resultat war in humanem Lungengewebe nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* nicht nachzuweisen. Im murinen Pneumoniemodell resultierte die Behandlung mit Moxifloxacin im Gegensatz zu der Behandlung mit Ampicillin in einer niedrigeren pulmonalen Erregerlast und weniger Bakteriämien. Es gab keine Unterschiede bezüglich der analysierten Parameter der lokalen und systemischen Entzündungsantwort, dem Verlauf der Pneumonie und der histopathologischen Analyse der pulmonalen Gewebeschädigung zwischen den beiden Antibiotikagruppen. Interessanterweise hatten mit Ampicillin behandelte Tiere in der akuten Phase der Pneumonie eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität im Gegensatz zu der Moxifloxacin-Monotherapie und der Kombinationstherapie aus Ampicillin und Moxifloxacin. In zusätzlichen *in vitro* Untersuchungen an Endothelzellmonolayern war kein direkter barriere-stabilisierender Effekt durch Moxifloxacin erkennbar.

Humane Lungenexplantate wurden mit TNF- α stimuliert und dadurch zur Bildung von Zytokinen angeregt. Die daraus resultierende Sekretion von IL-6 wurde durch den Einsatz von Moxifloxacin im Gegensatz zu Ampicillin- und Lösungsmittelbehandlung reduziert. Unter den hier untersuchten Bedingungen ließen sich demnach gewisse immunmodulatorische Eigenschaften von Moxifloxacin nachweisen und reflektierten somit die Erkenntnisse publizierter Untersuchungen an Zellkulturmodellen (Blau et al. 2007; Shalit et al. 2006; Weiss et al. 2004).

Obwohl TNF- α ein potenter Stimulus der proinflammatorischen Zytokinproduktion ist (Szymanski et al. 2012), spiegelt dieser isoliert gesehen die Komplexität einer Infektion mit einem vitalen Pathogen nicht wider. Aus diesem Grund wurde humanes Lungengewebe mit dem gleichen relevanten humanpathogenen Pneumokokkenstamm infiziert, der auch in dem tierexperimentellen Teil dieser Studie verwendet wurde. Moxifloxacin hatte hierbei keinen Einfluss auf die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 nach Infektion des Gewebes mit *Streptococcus pneumoniae*.

Diese auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse können mit der viel komplexeren Immunantwort, die aus der Interaktion eines lebenden Pathogens mit einem Wirtsorganismus

mus resultiert, erklärt werden. Es ist davon auszugehen, dass *Streptococcus pneumoniae* viele parallele, teilweise redundante Signalwege und lokale immunologische Prozesse initiiert (Koppe et al. 2012), welche nicht alle von Moxifloxacin beeinflusst wurden.

Das etablierte Verfahren der Kultivierung von humanem Lungengewebe *ex vivo* bietet vielerlei Vorteile (Weinheimer et al. 2012; Szymanski et al. 2012). Durch den Erhalt der strukturellen Integrität des entnommenen Gewebes war es möglich, Pathogen-Wirts-Interaktionen und Einflüsse von Medikamenten in einem dreidimensionalen Modell zu studieren. So musste nicht auf die Untersuchung einzelner Zelltypen zurückgegriffen werden, sondern es konnten komplexe Signalwege und die Kommunikation zwischen Zellen in ihrem ursprünglichen Gewebeverband analysiert werden. Dabei wurden die Pneumokokken direkt in die Alveolen appliziert und die Applikation der Medikamente und Kontrollsubstanzen erfolgte auf die gleiche Weise (Szymanski et al. 2012).

Dessen ungeachtet gibt es, wie bei allen Untersuchungsmöglichkeiten von komplexen biologischen Systemen, auch in diesem Modell Limitationen. Zwar wird durch die Art der Kultivierung die Architektur des Lungengewebes erhalten, sodass die unterschiedlichen residenten Zelltypen der Lunge gut untersucht werden können. Es fehlt jedoch die Einwanderung von Immunzellen mit dem Blut in das Gewebe. Zudem mangelt es ebenso an einem hämatogenen Zustrom von Mediatoren wie Zytokinen, die auf die Lunge wirken könnten. Daher ist die Erforschung dieser Aspekte der Inflammation nicht möglich.

Auch die Art des Einbringens der Bakterien *via* Injektion direkt in die Alveolen folgt nicht dem natürlichen Infektionsweg. Während im Tiermodell durch die transnasale Applikation der Bakterien der natürliche Infektionsweg *via* Tröpfcheninfektion über Nasengänge und Bronchien bis letztendlich hin zu den Alveolen nachgeahmt wird, ist dies im *ex vivo* Modell nur eingeschränkt möglich.

Des Weiteren ist durch das Fehlen des Blutstroms nicht nur der Einstrom von neuen Zellen und Mediatoren unterbunden, sondern ebenfalls die Sauerstoffzufuhr und der Gasaustausch gehemmt. Das verwendete Zellmedium vermag dieses Defizit nur kurzzeitig zu kompensieren, sodass auch von der Infektion bzw. Stimulation unabhängiger Zelltod und Nekrose auftreten können (Middleton et al. 2003). Aus diesem Grund ist die Dauer der Kultivierung und somit der Untersuchungszeitraum limitiert. Regenerationsprozesse sowie die systemischen Ausdehnung der Infektion ließen sich in diesem Modell nicht untersuchen.

Vor dem Hintergrund dieser Limitationen wurden die Experimente um Untersuchungen in einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie ergänzt.

In dem verwendeten Tiermodell entwickelten die Mäuse nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* innerhalb von 24 Stunden eine schwere Pneumonie und in der Folge ein akutes Lungenversagen mit Sepsis. Unbehandelt hätten diese Veränderungen zum Tod der Tiere

geführt. Die Therapie mit Moxifloxacin oder Ampicillin beginnend 24 Stunden *p.i.* führte zum Überleben der Mäuse und zur fortschreitenden Auflösung der Pneumonie im Beobachtungszeitraum bis 120 Stunden nach der Infektion.

Das hier verwendete Tiermodell der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie wurde in zahlreichen experimentellen Studien dieser Arbeitsgruppe etabliert und validiert (Doehn et al. 2013; Witzenrath et al. 2006). Es bot die Möglichkeit, Ampicillin und Moxifloxacin sowohl in der akuten Phase der Infektion kurz nach Therapiebeginn als auch in der späteren Auflösungs- und Reparaturphase der Pneumonie zu vergleichen.

Um einen potenziellen immunmodulatorischen Einfluss von Moxifloxacin bewerten zu können, musste ein zweites Antibiotikum als Kontrollsubstanz eingesetzt werden, durch das der eigentliche antimikrobielle Effekt kontrolliert werden konnte. Es wurde hierfür Ampicillin, ein Aminopenicillin und gleichzeitig Standardtherapie der CAP, verwendet (Höffken et al. 2009). Für Aminopenicilline sind keine auf das Immunsystem wirkenden Eigenschaften bekannt.

Die Wahl der eingesetzten Konzentrationen der Antibiotika im *ex vivo* Lungenmodell ergab sich unter Berücksichtigung von Daten zur Konzentration von Fluorchinolonen (Schubert et al. 2005; Soman et al. 1999) bzw. β -Laktam Antibiotika (Frank et al. 1990; Valcke et al. 1990) im *epithelial lining fluid* (ELF) des Menschen. Dieses Kompartiment repräsentierte am ehesten das die Lungenproben umgebende Medium. Die verwendeten Konzentrationen der Antibiotika lagen jeweils deutlich über den Daten zur MHK (siehe Punkt 3.2.3) und sollten so einen effektiven antimikrobiellen Effekt garantieren.

Anhand einer früheren Arbeit von Witzenrath *et al.*, in der das Ampicillin-Derivat Amoxicillin verwendet wurde, konnte die Dosierung von Ampicillin auf 0,02 mg/g Maus festgelegt werden (Witzenrath et al. 2009). Mithilfe von Daten zu Pharmakodynamik und -kinetik aus der Entwicklungsphase von Moxifloxacin, die freundlicherweise von der Bayer Vital GmbH zur Verfügung gestellt wurden, wurde die Dosierung für Moxifloxacin gewählt. Die eingesetzte Antibiotikakonzentration von Moxifloxacin (0,1 mg/g) in der Maus überschreitet die entsprechende Dosierung im Menschen, bezogen auf das Körpergewicht (Moxifloxacin 400 mg/Tag). Dies ist dem im Vergleich zum Menschen gesteigerten Metabolismus von Moxifloxacin in der Maus geschuldet. In beiden Behandlungsgruppen war der Krankheitsverlauf vergleichbar und es wurde eine Ausheilung der Pneumonie erreicht.

Der erste Behandlungszeitpunkt mit den Antibiotika 24 Stunden nach der Infektion spiegelte die reale Situation in der Notaufnahme wider, wenn Patienten mit einer schweren Pneumonie eingeliefert werden. Diese leiden häufig bereits an einer manifesten Lungenentzündung mit typischen Symptomen wie Husten, Fieber und Atemnot. Die infizierten Mäuse zeigten zum ersten Behandlungszeitpunkt ebenso bereits Anzeichen einer schweren Pneumonie, die sich im Abfall von Körpertemperatur und -gewicht, pulmonaler Leukozyteninvasion, hoher pul-

monaler Erregerlast sowie lokalem und systemischem Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen zeigte.

Der Allgemeinzustand der Tiere, die mit Ampicillin oder Moxifloxacin behandelt wurden, verbesserte sich während des Beobachtungszeitraums und passte sich vollständig dem der gesunden Kontrolltiere an. Ohne antibiotische Behandlung wäre der Krankheitsverlauf für diese Tiere letal gewesen. Der klinische Verlauf der Erkrankung in den Versuchstieren war bei beiden unterschiedlichen Antibiotikabehandlungen identisch.

Da der Krankheitsverlauf bei unbehandelten Tieren ab dem Zeitpunkt 48 Stunden nach der Infektion kritisch bis letal war, wurden keine Experimente an infizierten und mit Lösungsmittel behandelten Tieren nach dem 48 Stunden Zeitpunkt geplant. Anhand der regelmäßigen Kontrolle von Körpertemperatur und –gewicht sowie des *status praesens* aller Tiere konnte der Krankheitsverlauf zeitnah zu den Experimenten erfasst werden. Mithilfe der Körpertemperatur der Tiere ließ sich der eintretende Behandlungserfolg erkennen. So lag die mittlere Körpertemperatur aller antibiotisch behandelten Tiere im Gegensatz zu den kontrollbehandelten Tieren bereits 12 Stunden nach Behandlungsbeginn wieder im Normbereich. Auch das mittlere Körpergewicht der behandelten Tiere stieg, von tageszeitlich abhängigen Schwankungen abgesehen, nach Behandlungsbeginn kontinuierlich wieder auf Kontrollniveau.

In den durchgeführten *in vivo* Experimenten resultierte die Behandlung mit Moxifloxacin im Gegensatz zu der Ampicillin-Therapie in einer stärkeren Reduktion der Erregerlast in der Lunge und auch Bakteriämien wurden effektiver reduziert. Dieses Ergebnis ließ sich nicht ohne Weiteres auf die Situation im Menschen übertragen. Denn das Ziel der vorliegenden Studie war es wie oben beschrieben ein Modell zu etablieren, in dem die Pneumonie unter verschiedenen Therapien einen vergleichbaren Verlauf nimmt. Daher lag der Fokus nicht darauf, die Effektivität beider Antibiotika hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Wirkung zu vergleichen, sondern potenzielle immunmodulatorische Eigenschaften von Moxifloxacin zu charakterisieren. Die effizientere Erregerelimination in BAL und Blut unter Moxifloxacin-Therapie spiegelte sich allerdings nicht in einer reduzierten pulmonalen oder systemischen inflammatorischen Antwort gemessen an den untersuchten Zytokinen wider. Auch die pulmonale und systemische zelluläre Immunantwort wies keine Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlichen Antibiotikabehandlungen auf. Diese Resultate waren konsistent mit den Ergebnissen aus den mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten humanen Lungenproben und zeigten, dass Moxifloxacin in den hier angewandten Modellen keine immunmodulatorischen Eigenschaften besaß. So hatte Moxifloxacin im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie einen ähnlichen Einfluss wie Ampicillin auf die Spiegel der untersuchten Zytokine in BALF und Blut sowie auf deren Genexpression. Jedoch standen die Ergebnisse der vorliegenden Studie im Widerspruch zu den Ergebnissen der Untersuchungen einiger *in vitro* Studien, die

eine Beeinflussung der Zytokinsekretion durch Moxifloxacin zeigen konnten (Blau et al. 2007; Choi et al. 2003; Donnarumma et al. 2007). Ein Grund für diese widersprüchlichen Resultate könnte der verwendete Stimulus in den unterschiedlichen Studien sein. Während in den vorliegenden Untersuchungen mit *Streptococcus pneumoniae* ein vitales Bakterium und somit ein komplexer Stimulus für die Infektion der Mäuse und der humanen Lungenproben genutzt wurde, untersuchten andere Autoren zumeist den Einfluss von Moxifloxacin nach Stimulation mit LPS (Araujo et al. 2002; Blau et al. 2007; Choi et al. 2003; Donnarumma et al. 2007; Weiss et al. 2004) oder hitzeinaktivierten Bakterien (Choi et al. 2003) *in vitro*. Auch in der vorliegenden Studie konnte lediglich nach Stimulation des humanen Lungengewebes mit TNF- α , jedoch nicht nach bakterieller Stimulation, eine verminderte Zytokinproduktion nach Moxifloxacin-Behandlung gezeigt werden.

Interessanterweise war die Lungenpermeabilität in den mit Ampicillin behandelten Tieren 36 Stunden *p.i.* im Gegensatz zu der Moxifloxacin-Behandlung erhöht. Für Moxifloxacin ist bisher noch kein direkter barriestabilisierender Effekt beschrieben worden, und auch die Resultate der hier durchgeführten Widerstandsmessungen an HUVEC im ECIS lieferten keinen Hinweis auf eine direkte barriestabilisierende Eigenschaft von Moxifloxacin. Moxifloxacin verstärkte weder direkt die basale Integrität des Zellmonolayers noch reduzierte es die Störung der Zellkontakte durch Thrombin.

Bemerkenswerterweise war die Proteinmenge des Zytokins IL-1 β unter Moxifloxacin-Behandlung zum Zeitpunkt 36 Stunden *p.i.* in der BALF der Mäuse tendenziell erniedrigt, nicht aber die Expression der IL-1 β mRNA in der murinen Lunge verglichen mit der Ampicillin-Therapie. IL-1 β kann zu einer gestörten pulmonalen Barrierefunktion beitragen (Frank et al. 2007). Die Expression der IL-1 β mRNA ist NF- κ B abhängig (Opitz et al. 2010). Allerdings wird für die Produktion von IL-1 β ein zweiter Stimulus benötigt, welcher vom Inflammasom Caspase-1 abhängig generiert wird (Opitz et al. 2010). Für die niedrigere Lungenpermeabilität unter Moxifloxacin könnte daher sowohl (i) die IL-1 β Reduktion durch Caspase-1 Inhibition als auch (ii) ein bisher unentdeckter antiinflammatorischer Mechanismus von Moxifloxacin oder (iii) die reduzierte bakterielle Last in den mit Moxifloxacin behandelten Tieren oder (iv) die Abwesenheit des β -Laktam Antibiotikums in der akuten Phase der Pneumonie ursächlich sein.

Um diese Möglichkeiten näher einzugrenzen wurde eine weitere Mausgruppe untersucht, welche beide Antibiotika verabreicht bekam und zu den Zeitpunkten untersucht wurde, an denen eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität zu beobachten war (36 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden *p.i.*). In dieser kombiniert behandelten Gruppe war überraschenderweise trotz verminderter Erregerlast in Lunge und Blut 36 Stunden *p.i.* im Gegensatz zu der Ampicillin-Monotherapie, eine mit der Ampicillin-Monotherapie-Gruppe vergleich-

bar erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität messbar. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die niedrigere pulmonalvaskuläre Permeabilität kein direkter Effekt von Moxifloxacin war. Es scheint eher so zu sein, dass die Behandlung mit einem β -Laktam Antibiotikum in der frühen Phase der Pneumonie eine gesteigerte pulmonalvaskuläre Permeabilität zur Folge haben könnte. Eine Erklärung könnte in den unterschiedlichen Wirkungsweisen der beiden Antibiotika liegen, was die hier erhobenen Daten aus zusätzlich durchgeführten *in vitro* Versuchen untermauert. In diesen Versuchen wurde dem mit *Streptococcus pneumoniae* beimpften Wachstumsmedium in der log-Phase Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel hinzugefügt. Die anschließende Beurteilung des Wachstumsverhaltens zeigte, dass es nach Zugabe von Ampicillin zu einer schnelleren Reduktion des Bakterienwachstums im Gegensatz zu Moxifloxacin kam. Der Angriffspunkt des β -Laktam Antibiotikums könnte eine Erklärung für diese Ergebnisse liefern. Während das Ampicillin direkt an der Zellwand des Bakteriums angreifen kann und zur Zellyse führt, muss der Gyrasehemmer zunächst von der Bakterienzelle aufgenommen werden und anschließend an die Topoisomerase II binden. Bei der Lyse der Bakterien durch Ampicillin werden verstärkt Lipopeptide sowie andere Pathogenitätsfaktoren freigesetzt. Demgegenüber führt der Einsatz von Moxifloxacin letztlich zum Stillstand der Proteinbiosynthese, sodass dadurch weitaus weniger Pathogenitätsfaktoren freigesetzt werden (Nau und Eiffert 2002). Diese Vermutung konnte von Nau *et al.* in einer experimentellen Studie bereits 1997 belegt werden. Teil dieser Studie war die Behandlung der durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten Meningitis bei Kaninchen mit Hilfe von Ceftriaxon und Trovafloxacin. Dabei stellten die Autoren fest, dass die initiale inflammatorische Reaktion im Subarachnoidalraum nach der Gabe von Trovafloxacin, einem Gyrasehemmer, verglichen mit Ceftriaxon, einem β -Laktam, verzögert auftrat (Nau *et al.* 1997). Die Autoren folgerten, dass dieser Unterschied durch die verschiedenen Angriffspunkte der Antibiotika zustande gekommen sein könnte. Ein vergleichbares Ergebnis konnte in einem ähnlichen Modell auch nach Verabreichung von Moxifloxacin erzielt werden (Schmidt *et al.* 1998). Dem Pneumolysin als wichtigem Pathogenitätsfaktor von *Streptococcus pneumoniae* kommt bezüglich der Entwicklung pulmonalvaskulärer Hyperpermeabilität eine besondere Bedeutung zu. Dieses Exotoxin führt über Cholesterolbindung an der zytoplasmatischen Membran der Wirtszelle zu deren Lyse und induziert unabhängig von Zytolyse Proinflammation. Somit trägt Pneumolysin multimodal zur Schädigung der alveolokapillären Membran bei (Tilley *et al.* 2005; Witzernath *et al.* 2006). Die vermehrte Freisetzung von Pneumolysin unter Ampicillin-Therapie könnte zur Hyperpermeabilität der mit Ampicillin behandelten Mäuse beigetragen haben, wohingegen die langsamere Lyse der Bakterien unter der Moxifloxacin-Behandlung einer gesteigerten pulmonalvaskulären Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie entgegenwirkte. Allerdings lieferten die vorliegenden Untersuchungen keine Ergebnisse, die diese These direkt beweisen.

Die unterschiedlichen Angriffspunkte der beiden verschiedenen Antibiotika könnten ebenfalls erklären, warum Ampicillin in den *ex vivo* Versuchen in der Eliminierung der Bakterienzahl effektiver als Moxifloxacin war. Während in den *in vitro* und *ex vivo* Untersuchungen die Antibiotika direkt mit den Bakterien in Kontakt kamen und somit eine schnellere Lyse der Bakterienzelle durch Ampicillin erfolgen konnte, müssen die Antibiotika *in vivo* zunächst in das Gewebe penetrieren, bevor eine antimikrobielle Wirkung eintreten kann. Moxifloxacin könnte Ampicillin hierbei überlegen sein. Aufgrund seiner hohen Lipophilie und aktiver Transportprozesse, die an der Aufnahme von Moxifloxacin in das Lungengewebe beteiligt sind (Brillault et al. 2009), könnte schneller ein höherer Wirkspiegel im Vergleich zu Ampicillin erreicht werden. Das hydrophile Ampicillin (Wise und Honeybourne 1999) hingegen wird seinem Konzentrationsgradienten folgend *via* passiver Diffusion in die Lunge aufgenommen (Maddocks 1975). Dieser Prozess dauert länger als eine aktive Aufnahme.

Eine retrospektive Studie an hospitalisierten Patienten mit CAP legte einen protektiven Effekt von Moxifloxacin nahe. Die Studie hat retrospektiv die Auswirkung einer Therapie mit Moxifloxacin oder einem β -Laktam Antibiotikum oder einer Kombinationstherapie aus β -Laktam- und Chinolon- bzw. Makrolid-Antibiotikum auf den Verlauf der Pneumonie und das Überleben der Patienten untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Therapie mit Moxifloxacin bei moderater CAP mit einer verringerten Mortalität im Gegensatz zu einer β -Laktam Behandlung einher ging. Im Vergleich mit der Kombinationstherapie wurden durch die Moxifloxacin-Behandlung keine Vorteile erzielt (Ewig et al. 2011). Es ist zu betonen, dass es sich dabei um eine retrospektive Analyse von Registerdaten handelte. In einer prospektiven, randomisierten doppelblinden Studie hingegen verglichen Brunkhorst *et al.* unterschiedliche Therapieformen der schweren Sepsis. Der überwiegende Teil der Patienten litt an einer pneumogenen Sepsis (Brunkhorst et al. 2012). Gegenübergestellt wurden die Behandlung mit Meropenem und die Kombinationstherapie aus Meropenem und Moxifloxacin. Meropenem zählt zu den Carbapenemen, die wiederum eine Untergruppe der β -Laktame sind. Dabei fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich der Mortalität, der Dauer einer eventuell benötigten mechanischen Beatmung, sowie hinsichtlich Organversagen zwischen beiden Behandlungsgruppen. Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Behandlung mit Moxifloxacin keinen positiven zusätzlichen Nutzen, insbesondere keine klinisch relevanten immunmodulatorischen Effekte auf eine bereits bestehende schwere Erkrankung hat und stehen im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit.

Die Experimente der vorliegenden Studie sind bis *dato* die ersten *in vivo* Versuche, welche das immunmodulatorische Potenzial von Moxifloxacin in einer durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten Pneumonie untersucht haben. Selbstverständlich kann trotz der vorliegenden Ergebnisse ein positiver Effekt von Moxifloxacin auf das Immunsystem nicht gänzlich

ausgeschlossen werden, da experimentelle Studien stets nur einige Aspekte dieser facettenreichen Erkrankung beleuchten können. Ferner lassen sich die in den Tierexperimenten erhobenen Daten trotz des hohen translationalen Potentials des verwendeten Modells nicht bedingungslos auf die Situation im Menschen übertragen, sodass es durchaus einen Einfluss von Moxifloxacin auf das Immunsystem im Menschen geben könnte, der hier nicht erfasst wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde Moxifloxacin im Hinblick auf potenzielle antiinflammatorische Eigenschaften in einem humanen Lungenmodell und in der Behandlung einer schweren murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. Zusammenfassend ist festzustellen, dass Moxifloxacin die TNF- α -induzierte Inflammation in humanem Lungengewebe im Gegensatz zu Ampicillin reduzierte. Jedoch verfügte Moxifloxacin genauso wie Ampicillin über keine antiinflammatorischen Eigenschaften in mit *Streptococcus pneumoniae* infiziertem humanem Lungengewebe und in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie. Im Gegensatz zu Moxifloxacin wiesen mit Ampicillin behandelte Tiere allerdings eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie auf. Moxifloxacin war Ampicillin bezüglich der Eliminierung pulmonaler Erregerlast und Bakteriämien in Mäusen mit Pneumokokkenpneumonie überlegen.

6 Zusammenfassung

Untersuchung einer potenziell immunmodulatorischen Wirkung von Moxifloxacin in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie ist die häufigste tödlich verlaufende Infektionskrankheit weltweit. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ist der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Trotz spezifischer antimikrobieller Therapien und stetiger Bemühungen, die Behandlung von Risikopatienten zu verbessern, wird die Mortalität bei immunkompetenten, antibiotisch adäquat therapierten Patienten mit schwerer Pneumonie auf Intensivstationen weiterhin mit über 20 % angegeben. Die unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems scheint bei der schweren Pneumonie eine zentrale Rolle in der Entstehung eines akuten Lungenversagens sowie von Sepsis und Multiorganversagen zu spielen. Daher könnte die gezielte Limitierung überschießender Entzündungsreaktionen kombiniert mit einer effektiven antimikrobiellen Therapie den Verlauf der schweren Pneumonie begünstigen.

Chinolone könnten neben ihren gut untersuchten antimikrobiellen Eigenschaften auch antiinflammatorisch wirksam sein. Besonders Moxifloxacin, das unter anderem in der Behandlung der Pneumonie eingesetzt wird, hemmte *in vitro* die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus humanen Monozyten und humanen Alveolarepithelzellen nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken oder Lipopolysacchariden, jedoch gibt es wenig Evidenz aus Untersuchungen mit lebenden Bakterien. Klinische Untersuchungen zeichnen ein weniger eindeutiges Bild. Während in einer retrospektiven klinischen Studie ein besseres Überleben von Patienten mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie unter Moxifloxacin-Therapie, verglichen mit β -Laktam-Monotherapie, beobachtet wurde, konnte prospektiv kein klinischer Nutzen für Patienten mit Sepsis nachgewiesen werden, die zusätzlich zu einer Carbapenem-Therapie Moxifloxacin erhielten. Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es daher experimentell zu prüfen, ob für Moxifloxacin immunmodulatorische Eigenschaften in Modellen der Pneumokokkenpneumonie nachweisbar sind. Hierfür wurden in einem *ex vivo* Modell vitale humane Lungenproben mit TNF- α oder *S. pneumoniae* stimuliert und mit Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel behandelt und der Einfluss von Moxifloxacin im Vergleich zu Ampicillin, einer der Standardtherapien der ambulant erworbenen Pneumonie, auf die ausgelöste Entzündungsreaktion bestimmt. Für Ampicillin sind keine auf das Immunsystem wirkenden Eigenschaften bekannt. Nach der Stimulation mit TNF- α wurde vermehrt IL-6 und IL-8 produziert. Die Behandlung mit Moxifloxacin resultierte in einer verminderten Bil-

derung von IL-6 im Gegensatz zur Behandlung mit Ampicillin. Die Infektion mit *S. pneumoniae* führte ebenfalls zu einer gesteigerten Produktion der untersuchten Zytokine, die jedoch durch Behandlung mit Moxifloxacin oder Ampicillin nicht reduziert wurde.

Darüber hinaus wurde die Moxifloxacin-Therapie in der murinen Pneumokokkenpneumonie im Vergleich zu einer Behandlung mit Ampicillin hinsichtlich Parametern der Entzündungsreaktion, der Erregerelimination, pulmonalvaskulärer Schrankenstörung, histopathologischer Lungenveränderungen und klinischem Verlauf der Infektion untersucht. Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* infiziert und beginnend 24 Stunden nach der Infektion in 12 Stunden-Intervallen mit Ampicillin, Moxifloxacin oder Lösungsmittel behandelt. Zusätzlich dienten Mäuse als Kontrolltiere, die mit Lösungsmittel scheininfiziert und behandelt wurden. Die infizierten Mäuse entwickelten innerhalb von 24 Stunden eine schwere Pneumonie. Alle antibiotisch behandelten Tiere erholten sich im Beobachtungszeitraum fast vollständig von klinischen Zeichen der Pneumonie. Die Behandlung mit Moxifloxacin führte zu einer effektiveren pulmonalen Erregerelimination ab 36 Stunden nach der Infektion sowie zu einer besseren Reduktion von Bakteriämien im Gegensatz zu Ampicillin. Mit Ampicillin behandelte Mäuse zeigten eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität 36 Stunden nach der Infektion im Gegensatz zu Moxifloxacin behandelten Mäusen. Dabei war die verminderte Erregerlast in den mit Moxifloxacin behandelten Tieren nicht ursächlich für die niedrigere pulmonalvaskuläre Permeabilität, was durch Untersuchungen an einer zusätzlichen Versuchsgruppe gezeigt werden konnte, die gleichzeitig mit Ampicillin und Moxifloxacin behandelt wurde. Die kombinierte Behandlung führte zu einer mit der Ampicillin-Monotherapie vergleichbaren Permeabilität. Auch die Effekte beider Antibiotika bezüglich aller weiteren untersuchten Parameter waren vergleichbar. Insbesondere war die pulmonale und systemische Inflammation trotz geringerer Erregerdichte unter Moxifloxacin-Therapie im Gegensatz zur Ampicillin-Therapie nicht reduziert. Zusätzlich wurde der direkte Einfluss von Moxifloxacin und Ampicillin auf die Integrität eines Endothelzellmonolayers mit oder ohne Thrombin-Stimulation durch Messung des transzellulären elektrischen Widerstands getestet. Moxifloxacin erhöhte *in vitro* weder die basale Integrität des Monolayers, noch reduzierte es die durch Thrombin verursachte Störung der interzellulären Kontakte. Auch Ampicillin hatte keinen Einfluss auf die Stabilität der Barriere.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass Moxifloxacin die TNF- α -induzierte Inflammation in humanem Lungengewebe im Gegensatz zu Ampicillin reduzierte. Jedoch ließen sich weder in humanem Lungengewebe, noch in der schweren murinen Pneumonie nach Infektion mit *S. pneumoniae* antiinflammatorische Eigenschaften von Moxifloxacin im Vergleich zu Ampicillin nachweisen. Moxifloxacin war Ampicillin bezüglich der Eliminierung pulmonaler Erregerlast und Bakteriämien überlegen. Ampicillin-behandelte Tiere wiesen allerdings eine erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität in der akuten Phase der Pneumonie auf und diese Beobachtung war unabhängig von Effekten des Moxifloxacin.

7 Summary

Investigation of potential immunomodulatory effects of moxifloxacin in severe murine pneumococcal pneumonia

Sandra-Maria Wienhold

With regard to causes of morbidity and mortality worldwide, community-acquired pneumonia holds the highest significance and *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) is the most prevalent causative pathogen of community-acquired pneumonia. Despite adequate antibiotic therapy and constant endeavour to improve the clinical outcome of high risk patients, existing treatment and drug regimens are still insufficient, considering the high mortality (above 20 %) for immunocompetent patients in intensive care units hospitalized for severe community-acquired pneumonia. The main contributing factor to an adverse outcome of patients suffering from severe pneumonia is an excessive activation of the innate immune system, which leads to the development of acute respiratory failure, sepsis and multiple organ failure. Thus, limitation of exaggerated inflammatory reactions, combined with an effective antibiotic treatment might improve the outcome of affected patients.

Efficient therapeutic protocols of various respiratory infections utilize Quinolones. Apart from their well described antimicrobial characteristics, Quinolones were suggested to exert anti-inflammatory effects. Particularly moxifloxacin has been shown to inhibit the release of proinflammatory cytokines in *in vitro* experiments, using human monocytes and human alveolar epithelial cells stimulated with heat-inactivated pneumococci or lipopolysaccharides. However, clinical studies demonstrated a less clear picture. In a retrospective study, patients with severe community-acquired pneumonia were treated with moxifloxacin, which resulted in improved outcome as compared to monotherapy with β -lactam antibiotics. It was hypothesized that potential immunomodulatory features of moxifloxacin were responsible for this improvement of patient survival. In contrast, a prospective study showed no clinical benefit for patients with sepsis, who were treated with moxifloxacin in addition to carbapenem antibiotics. This study aimed at analysing the impact of moxifloxacin on the inflammatory host response in *ex vivo* cultured intact human lung tissue and in a murine model of severe pneumococcal pneumonia. Therefore, *ex vivo* cultured human lung tissue was stimulated with TNF- α or infected with *S. pneumoniae*, treated with ampicillin, moxifloxacin or solvent and proinflammatory cytokines were quantified in the supernatant. For ampicillin which is one standard treatment in community-acquired pneumonia, anti-inflammatory effects have not been described so far. Therefore, it was used as reference antibiotic in this study. Upon stimulation with TNF- α , human lung tissue produced IL-6 and IL-8, which was reduced by

moxifloxacin but not by ampicillin. Infection with *S. pneumoniae* also induced IL-6 and IL-8 production in human lung tissue which was not influenced by treatment with moxifloxacin or ampicillin. Additionally, a murine model was established, in which antibiotic treatment with ampicillin or moxifloxacin was applied in severe pneumococcal pneumonia to mimic the clinical treatment initiated in the emergency department. Mice infected with a lethal dosage of *S. pneumoniae* were treated in 12-hour intervals with ampicillin, moxifloxacin or solvent, starting 24 hours post infection. In addition, sham infected and solvent treated animals were investigated. At specified time points post infection, the bacterial burden in lung, blood and spleen was analysed. Cytokine levels were measured in bronchoalveolar lavage fluid and blood plasma. Furthermore, proinflammatory gene regulation in murine lung tissue was investigated by real-time polymerase chain reaction. Bronchoalveolar lavage fluid and blood leukocytes were differentiated and pulmonary vascular permeability was determined. Additionally, lung tissue from infected mice was histologically analysed. Upon infection with *S. pneumoniae*, mice developed severe pneumonia within 24 hours post infection. Antibiotic treated mice were rescued from developing acute respiratory distress syndrome and sepsis, and recovered from clinical signs of pneumonia within the observation period. Pulmonary bacterial burden was lower in moxifloxacin treated mice in contrast to ampicillin from 36 hours post infection on, and fewer cases with bacteraemia were observed when compared with ampicillin treated mice. At 36 hours post infection, ampicillin treated mice showed increased pulmonary vascular permeability, which could not be attributed to the lower bacterial burden in moxifloxacin treated mice. This was shown by an additionally investigated group of mice treated with moxifloxacin and ampicillin simultaneously. Animals in this group displayed equally high permeability as mice with ampicillin monotherapy. Bronchoalveolar lavage fluid and blood cytokine levels, proinflammatory gene expression, blood leukocytes and morphologic lung injury scores were similar in mice treated with moxifloxacin or ampicillin. To estimate a potential effect of moxifloxacin on the integrity of the cellular monolayer, transcellular electrical resistance of human umbilical vein endothelial cell monolayers was measured in the presence of moxifloxacin or ampicillin with or without thrombin stimulation. Moxifloxacin exerted no direct stabilising effects on the endothelial barrier, and it also did not reduce thrombin-induced disruption of integrity. The same applied to ampicillin.

In summary, in human lung tissue moxifloxacin treatment reduced TNF- α induced inflammation in contrast to ampicillin. However, ampicillin and moxifloxacin showed similar effects in pneumococci-induced inflammation of human lung tissue and in severe murine pneumococcal pneumonia. Nevertheless, treatment with moxifloxacin reduced pulmonary bacterial load and bacteraemia in contrast to ampicillin. Pulmonary vascular permeability in the acute phase of murine pneumococcal pneumonia was enhanced by ampicillin in contrast to moxifloxacin treatment, which was independent from effects of moxifloxacin.

8 Literaturverzeichnis

Aldrige KE, Ashcraft DS (1997) Comparison of the in vitro activities of Bay 12-8039, a new quinolone, and other antimicrobials against clinically important anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother* 41:709–711.

AlonsoDeVelasco E, Verheul AFM, Verhoef J, Snippe H (1995) Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 59:591–603.

Amsden GW (2004) Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *J Antimicrob Chemother* 55:10–21.

Andersson MI, MacGowan AP (2003) Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother* 51:1–11.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon J (2005) Septic shock. *Lancet* 365:63–78.

Araujo FG, Slifer TL, Remington JS (2002) Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect* 8:26–30.

ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS (2012) Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA (The Journal of the American Medical Association)* 307:2526–2533.

Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE (2002) Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 70:2526–2534.

Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE (2001) The autolytic enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol* 183:3108–3116.

Balfour JA, Wiseman LR (1999) Moxifloxacin. *Drugs* 57:363-373;

Bauer T (2006) CAPNETZ: competence network for community acquired pneumonia in Germany. *Pneumologie* 60:111–113.

Bayer Vital GmbH MED-Information Leverkusen (2008) Wichtige Information zur Arzneimittelsicherheit Moxifloxacin (AVALOX® und ACTIMAX®).

Bein T, Pfeifer M (2010) Intensivbuch Lunge. Von der Pathophysiologie zur Strategie der Intensivtherapie. 2., aktualis. u. erw. Auflage. Berlin MWV (Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft): 157-175.

Beisswenger C, Bals R (2005) Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem Immunol Allergy* 86:55–71.

Beiter K, Wartha F, Albiger B, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B (2006) An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16:401–407.

- Belkaid Y (2007) Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 7:875–888.
- Bersten AD, Edibam C, Hunt T, Moran J, Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group (2002) Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med* 165:443–448.
- Bienenstock J (1980) Bronchus-associated lymphoid tissue and the source of immunoglobulin-containing cells in the mucosa. *Environ Health Perspect* 35:39–42.
- Blau H, Klein K, Shalit I, Halperin D, Fabian I (2007) Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azithromycin selectively inhibits IL-8, IL-6, ERK1/2, JNK, and NF- κ B activation in a cystic fibrosis epithelial cell line. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L343–L352.
- Blondeau JM, Zhao X, Hansen G, Drlica K (2001) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:433–438.
- Bondi T, Canessa C, Lippi F, Iacopelli J, Nieddu F, Azzari C (2012) *Streptococcus pneumoniae*: elusive mechanisms of the body's defense systems. *J Prev Med Hyg* 53:89–93.
- Boulnois GJ (1992) Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 138:249–259.
- Brillault J, de Castro WV, Harnois T, Kitzis A, Olivier J, Couet W (2009) P-glycoprotein-mediated transport of moxifloxacin in a calu-3 lung epithelial cell model. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1457–1462.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532–1535.
- Brunkhorst FM, Oppert M, Marx G, Bloos F, Ludwig K, Putensen C, Nierhaus A, Jaschinski U, Meier-Hellmann A, Weyland A, Gründling M, Moerer O, Riessen R, Seibel A, Ragaller M, Büchler MW, John S, Bach F, Spies C, Reill L, Fritz H, Kiehntopf M, Kuhnt E, Bogatsch H, Engel C, Loeffler M, Kollef MH, Reinhart K, Welte T, German Study Group Competence Network Sepsis (SepNet) (2012) Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis a randomized trial. *JAMA (The Journal of the American Medical Association)* 307:2390–2399.
- Burkhardt O, Köhnlein T, Pap T, Welte T (2004) Recurrent tendinitis after treatment with two different fluoroquinolones. *Scand J Infect Dis* 36:315–316.
- Chaplin DD (2010) Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 125:S3–S23.
- Choi JH, Song MJ, Kim SH, Choi SM, Lee DG, Yoo JH, Shin WS (2003) Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3704–3707.
- Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Helkkila I, Tuomanen EI (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377:435–438.
- Dalhoff A (2005) Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 33:55–70.
- Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Bauer T, Baum H von, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, Gatermann S, Gerlach H, Grabein B, Höffken G, Kern WV, Kramme E, Lange C, Lorenz J, Mayer K, Nachtigall I, Pletz M, Rohde G, Rosseau S, Schaaf B, Schaumann R, Schreier D,

Schütte H, Seifert H, Sitter H, Spies C, Welte T (2012) Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie. S-3 Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin e.V., der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V., der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. *Pneumologie* 66:707–765.

Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, de Groot D (1992) Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 215:356–362.

Delclaux C, Azoulay E (2003) Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *European Respiratory Journal* Suppl 42:10s–14s.

Dinarello CA (2009) Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27:519–550.

Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzgen M (2013) Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 68:2111–2117.

Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Austgulen R (1998) Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr* 132:295–299.

Donkor ES (2013) Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. *Front Cell Infect Microbiol* 3:1–5.

Donnarumma G, Paoletti I, Buommino E, Iovene MR, Tudisco L, Cozza V, Tufano MA (2007) Anti-inflammatory effects of moxifloxacin and human beta-defensin 2 association in human lung epithelial cell line (A549) stimulated with lipopolysaccharide. *Peptides* 28:2286–2292.

El Garch F, Lismond A, Piddock LJV, Courvalin P, Tulkens PM, van Bambeke F (2010) Fluoroquinolones induce the expression of patA and patB, which encode ABC efflux pumps in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 65:2076–2082.

Emmerson AM, Jones AM (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother* 51:13–20.

Esteban A, Fernández-Segoviano P, Frutos-Vivar F, Aramburu JA, Nájera L, Ferguson ND, Alía I, Gordo F, Ríos F (2004) Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann Intern Med* 141:440–445.

Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G (2009) New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* 64:1062–1069.

Ewig S, Hecker H, Suttorp N, Marre R, Welte T (2011) Moxifloxacin monotherapy versus β -lactam mono- or combination therapy in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *J Infect* 62:218–225.

Fahy JV, Dickey BF (2010) Airway mucus function and dysfunction. *N Engl J Med* 363:2233–2247.

Fernandez EJ, Lolis E (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:469–499.

- File TM (2004) Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med* 117:39–50.
- Fine DP (1975) Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12:772–778.
- Frank JA, Pittet J, Wray C, Matthay MA (2007) Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax* 63:147–153.
- Frank U, Schmidt-Eisenlohr E, Joos-Württemberger A, Hasse J, Daschner E (1990) Concentrations of sulbactam/ampicillin in serum and lung tissue. *Infection* 18:307–309.
- Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA (1998) The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin. Immunol.* 10:363–372.
- Guaní-Guerra E, Santos-Mendoza T, Lugo-Reyes SO, Terán LM (2010) Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135:1–11.
- Hahn H, Kaufmann SH, Schulz T, Suerbaum S, (Hrsg) (2009) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 6., komplett überarb. Aufl. Heidelberg *Springer* (Springer-Lehrbuch).
- Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M (2005) Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73:4653–4667.
- Havarstein LS, Martin B, Johnsborg O, Granadel C, Claverys JP (2006) New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* 59:1297–1037.
- Heyder J (2004) Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 1:315–320.
- Hippenstiel S, Suttorp N (2003) Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* 89:18–24.
- Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, Dietrich E, Ewig S, Gastmeier P, Grabein B, Halle E, Kolditz M, Marre R, Sitter H (2009) S3-Leitlinien zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen. Kurzfassung. 2. Aufl. Stuttgart, New York, NY *Thieme*: 31-54.
- Hol J, Wilhelmsen L, Haraldsen G (2010) The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol* 87:501–508.
- Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ (1994) Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-13 by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62:1501–1503.
- Huang S, Paulauskis JD, Godleski JJ, Kobzik L (1992) Expression of macrophage inflammatory protein-2 and KC mRNA in pulmonary inflammation. *Am J Pathol* 141:981–988.
- Imöhl M, Reinert RR, Mutscher C, van der Linden M (2010) Macrolide susceptibility and serotype specific macrolide resistance of invasive isolates of Streptococcus pneumoniae in Germany from 1992 to 2008. *BMC Microbiol* 10:299.

- Imöhl M, Reinert RR, Tulkens PM, van der Linden M (2014) Penicillin susceptibility break-points for *Streptococcus pneumoniae* and their effect on susceptibility categorisation in Germany (1997–2013). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.
- Irvin CG, Bates JHT (2003) Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4:1–9.
- James L, Cacalano G, Camerato T, Toy K, Moore MW, Wood WI (1995) Chemokine binding and activities mediated by the mouse IL-8 receptor. *J Immunol* 155:2158–2164.
- Jedrzejewski MJ (2001) Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:187–207.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Micro* 6:288–301.
- Kanoh S, Rubin BK (2010) Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev* 23:590–615.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* 11:373–384.
- Kieninger AN, Lipsett PA (2009) Hospital-acquired pneumonia: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Surg Clin North Am* 89:439–461.
- Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Gomi K, Kobayashi T, Takahashi H, Tokue Y, Watanabe A, Nukiwa T (2002) Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- κ B transcription factors. *J Antimicrob Chemother* 49:745–755.
- Kingma PS, Whitsett JA (2006) In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol* 6:277–283.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A (2008) HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med* 14:476–484.
- Koppe U, Suttorp N, Opitz B (2012) Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol* 14:460–466.
- Lai Y, Gallo RL (2009) AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30:131–141.
- Lancefield RC (1928) The antigenic complex of *Streptococcus haemolyticus*. I. Demonstration of a type specific substance in extracts of *Streptococcus haemolyticus*. *J Exp Med* 47:91–103.
- Leaver SK, Evans TW (2007) Acute respiratory distress syndrome. *BMJ* 335:389–394.
- Linsel G (2001) Bioaerosole - Entstehung und biologische Wirkungen. "Sicherer Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen und Zytostatika", Braunschweig, 12.03. - 13.03.2001.
- Maddocks JL (1975) Absorption of ampicillin from the human lung. *Thorax* 30:68–71.
- Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT (2003) Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1966–1971.

- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG (2007) Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 44:S27–S72.
- Mariathasan S, Monack DM (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:31–40.
- Martin-Loeches I, Lisboa T, Rodriguez A, Putensen C, Annane D, Garnacho-Montero J, Restrepo MI, Rello J (2010) Combination antibiotic therapy with macrolides improves survival in intubated patients with community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med* 36:612–620.
- Matthay MA, Zimmerman GA (2005) Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:319–327.
- McGavin MD, Zachary JF (2009) Pathologie der Haustiere. 1. Aufl. München Elsevier, Urban & Fischer: 433-520.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173:89–97.
- Middleton AM, Keig P, Wilson R (2003) In vitro models of infection I--human respiratory tissue organ culture. *Methods Mol Med* 71:277–295.
- Miravittles M (2005) Moxifloxacin in respiratory tract infections. *Expert Opin Pharmacother* 6:283–293.
- Mitchell AM, Mitchell TJ (2010) Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect* 16:411–418.
- Miyazaki E, Miyazaki M, Chen JM, Chaisson RE, Bishai WR (1999) Moxifloxacin (Bay 12-8039), a new 8-methoxyquinolone, is active in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 43:85–89.
- Mizgerd JP (2008) Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 358:716–727.
- Müller-Redetzky H, Suttorp N, Witzenrath M (2012) Experimental models of pneumonia-induced sepsis. *Drug Discov Today Dis Models* 9:23–32.
- Müller-Redetzky HC, Suttorp N, Witzenrath M (2014) Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res* 355:657–673.
- Murphy KM, Travers P, Walport M (2009) Janeway Immunologie. 7. Aufl. Heidelberg Spektrum, Akad. Verl: 407-530.
- Nau R, Eiffert H (2002) Modulation of release of proinflammatory bacterial compounds by antibacterials: potential impact on course of inflammation and outcome in sepsis and meningitis. *Clin Microbiol Rev* 15:95–110.
- Nau R, Zysk G, Schmidt H, Fischer FR, Stringaris AK, Stuert K, Brück W (1997) Trovafloxacin delays the antibiotic-induced inflammatory response in experimental pneumococcal meningitis. *J Antimicrob Chemother* 39:781–788.
- Nelson AL, Roche AM, Gould JM, Chim K, Ratner AJ, Weiser JN (2006) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* 75:83–90.

- Neufeld F (1902) Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorie der Agglutination. *Z Hyg Infektionskr* 40:54–72.
- Oliphant CM, Green GM (2002) Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician* 65:455–464.
- Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N (2010) Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 181:1294–1309.
- Ott SR, Hauptmeier BM, Ernen C, Lepper PM, Nuesch E, Pletz MW, Hecht J, Welte T, Bauer TT (2012) Treatment failure in pneumonia: impact of antibiotic treatment and cost analysis. *European Respiratory Journal* 39:611–618.
- Pabst R (1992) Is BALT a major component of the human lung immune system? *Immunol Today* 13:119–122.
- Pack RJ, Al-Ugaily LH, Morris G (1980) The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132:71–84.
- Pascual A, García I, Ballesta S, Perea EJ (1999) Uptake and intracellular activity of moxifloxacin in human neutrophils and tissue-cultured epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43:12–15.
- Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47:89–115.
- Pletz MWR (2005) Ambulant erworbene Pneumonie. *Pneumologe* 2:17–27.
- Pletz MWR, Rohde G, Schütte H, Bals R, Baum H von, Welte T (2011) Epidemiologie und Erreger bei ambulant erworbener Pneumonie (CAP). *Dtsch med Wochenschr* 136:775–780.
- Reinert RR (2009) The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 15:7–11.
- Reinert RR, Al-Lahham A, Lemperle M, Tenholte C, Briefs C, Haupts S, Gerards HH, Lütticken R (2002) Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 49:61–68.
- Reinert RR, Muckel S, Al-Lahham A, Spratt BG, Brueggemann AB, Hakenbeck R, Lütticken R (2003) Characterization of German penicillin non-susceptible serotype 23F pneumococci using multilocus sequence typing. *J Med Microbiol* 52:981–987.
- Reinert RR, Schlaegel JJ, Lütticken R (1998) Moxifloxacin: a comparison with other antimicrobial agents of in-vitro activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 42:803–806.
- Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzzenrath M (2009) Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:474–481.
- Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI (1998) Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102:347–360.
- Robert Koch-Institut (RKI) Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut/Stand August 2013. Epidemiologisches Bulletin 34/2013.

- Rodriguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Solé-Violan J, Mendoza D de, Rello J (2009) Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med* 35:430–438.
- Roson B, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Tubau F, Manresa F, Gudiol Francesc (2004) Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 164:502–508.
- Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW, Janoff EN (1995) Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* 95:142–150.
- Sagy M, Al-Qaqa Y, Kim P (2013) Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 43:260–263.
- Schaberg T, Bauer T, Castell S, Dalhoff K, Detjen A, Diel R, Greinert U, Hauer B, Lange C, Magdorf K, Loddenkemper R (2012) Empfehlungen zur Therapie, Chemoprävention und Chemoprophylaxe der Tuberkulose im Erwachsenen- und Kindesalter. *Pneumologie* 66:133–171.
- Schmidt H, Dalhoff A, Stuertz K, Trostdorf F, Chen V, Schneider O, Kohlsdorfer C, Brück W, Nau R (1998) Moxifloxacin in the therapy of experimental pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1397–1401.
- Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D (1990) Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431:379–401.
- Schubert S, Dalhoff A, Stass H, Ullmann U (2005) Pharmacodynamics of moxifloxacin and levofloxacin simulating human serum and lung concentrations. *Infection* 33:15–21.
- Schultz MJ, Speelman P, Hack CE, Buurman WA, van Deventer SJH., van der Poll, T (2000) Intravenous infusion of erythromycin inhibits CXC chemokine production, but augments neutrophil degranulation in whole blood stimulated with *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 46:235–240.
- Selbitz H, Trujen U, Valentin-Weigand P, (Hrsg.) (2011) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart *Enke*: 256-270.
- Shalit I, Halperin D, Haite D, Levitov A, Romano J, Osherov N, Fabian I (2006) Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1 β and TNF- α secretion and NF κ B and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 57:230–235.
- Shalit I, Horev-Azaria L, Fabian I, Blau H, Kariv N, Shechtman I, Alteraz H, Kletter Y (2002) Immunomodulatory and protective effects of moxifloxacin against *Candida albicans*-induced bronchopneumonia in mice injected with cyclophosphamide. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2442–2449.
- Soman A, Honeybourne D, Andrews J, Jevons G, Wise R (1999) Concentration of moxifloxacin in serum and pulmonary compartment following a single 400 mg dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *J Antimicrob Chemother* 44:835–838.
- Stahlmann R, Lode HM (2013) Risks associated with the therapeutic use of fluoroquinolones. *Expert Opin Drug Saf* 12:497–505.

Stass H, Dalhoff A, Kubitz D., Schühly U (1998) Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a New 8-methoxy quinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2060–2065.

Stass H, Kubitz D (2001) Profile of moxifloxacin drug interactions. *Clin Infect Dis Suppl* 32:S47–S50.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2013a) Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle) - Fachserie 12 Reihe 6.2.1 - 2012.

Statistisches Bundesamt (Destatis) (2013b) Todesursachen in Deutschland - Fachserie 12 Reihe 4 - 2012.

Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW, Boulnois GJ, Cole PJ (1989) Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun* 57:2006–2013.

Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'Guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rueckert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Dromann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC (2012) *Streptococcus pneumoniae*-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *European Respiratory Journal* 40:1458–1467.

Tan TQ (2003) Antibiotic resistant infections due to *Streptococcus pneumoniae*: impact on therapeutic options and clinical outcome. *Curr Opin Infect Dis* 16:271–277.

Tango M, Suzuki E, Gejyo F, Ushiki T (2000) The presence of specialized epithelial cells on the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) in the mouse. *Arch Histol Cytol* 63:81–89.

Tauber SC, Nau R (2008) Immunomodulatory properties of antibiotics. *Curr Mol Pharmacol* 1:68–79.

Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, Saibil HR (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* 121:247–256.

Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I (1992) Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7919–7923.

Tolle LB, Standiford TJ (2013) Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *J Pathol* 229:145–156.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ (2014) Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1843:2563–2582.

Umeki S (1993) Anti-inflammatory action of erythromycin. Its inhibitory effect on neutrophil NADPH oxidase activity. *Chest* 104:1191–1193.

Valcke YJ, Rosseel MT, Pauwels RA, Bogaert MG, van der Straeten, ME (1990) Penetration of ampicillin and sulbactam in the lower airways during respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother* 34:958–962.

van der Sluijs KF, van der Poll, T, Lutter R, Juffermans NP, Schultz MJ (2010) Bench-to-bedside review: bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications. *Crit Care* 14:219.

- van Snick J (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8:253–278.
- Walden AP, Clarke GM, McKechnie S, Hutton P, Gordon AC, Rello J, Chiche J, Stueber F, Garrard CS, Hinds CJ (2014) Patients with community acquired pneumonia admitted to European intensive care units: an epidemiological survey of the GenOSept cohort. *Crit Care* 18:R58.
- Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 324:1334–1349.
- Weinheimer VK, Becher A, Tonnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, Hocke AC (2012) Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis* 206:1685–1694.
- Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A, Fabian I (2004) Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF- κ B and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1974–1982.
- Welte T, Köhnlein T (2009) Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med* 30:127–135.
- Welte T, Torres A, Nathwani D (2012) Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 67:71–79.
- Werber S, Shalit I, Fabian I, Steuer G, Weiss T, Blau H (2005) Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF- κ B activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. *J Antimicrob Chemother* 55:293–300.
- WHO (2013) The top 10 causes of death. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. Online verfügbar unter <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, zuletzt geprüft am 12.09.2014.
- Wise R (2003) Maximizing efficacy and reducing the emergence of resistance. *J Antimicrob Chemother* 51:37–42.
- Wise R, Honeybourne D (1999) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluorquinolones in the respiratory tract. *European Respiratory Journal* 14:221–229.
- Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H (2006) Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 34:1947–1954.
- Witzenrath M, Gutbier B, Owen JS, Schmeck B, Mitchell TJ, Mayer K, Thomas MJ, Ishii S, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H (2007) Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 35:1756–1762.
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B (2011) The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 187:434–440.
- Witzenrath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S (2009) Systemic

use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37:642–649.

Woodcock JM, Andrews JM, Boswell FJ, Brenwald NP, Wise R (1997) In vitro activity of Bay 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 41:101–106.

Woodhead M (2002) Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *European Respiratory Journal Suppl* 36:20S–27s.

Woodhead M (2009) The European vision of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 30:136–145.

Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ (2002) Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 23:291–296.

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S (2000) Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 173:39–51.

Zimmermann GS, Neurohr C, Villena-Hermoza H, Hatz R, Behr J (2009) Anti-inflammatory effects of antibacterials on human Bronchial epithelial cells. *Respir Res* 10:89.

Zipfel PF (2009) Complement and immune defense: From innate immunity to human diseases. *Immunol Lett* 126:1–7.

9 Anhang

9.1 Versuchsdesign

Versuchsteil 1 und 2: Differenzialzellbild in der bronchoalveolären Lavage / Bestimmung pulmonalvaskulärer Permeabilität / Bestimmung Bakterienlast

Versuchsgruppen	Zeit nach Infektion				
	24 h	36 h	48 h	72 h	120 h
Lösungsmittel+ Lösungsmittel	8	8	8	8	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Lösungsmittel	8	8	/	/	/
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Ampicillin	/	8	8	8	8
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Ampicillin+ Moxifloxacin	/	8	8	8	/
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Moxifloxacin	/	8	8	8	8

Versuchsteil 3: Bestimmung der Regulation ausgewählter proinflammatorischer und antiinflammatorischer Gene in der Lunge

Versuchsgruppen	Zeit nach Infektion				
	24 h	36 h	48 h	72 h	120 h
Lösungsmittel+ Lösungsmittel	6	6	6	6	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Lösungsmittel	6	6	/	/	/
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Ampicillin	/	6	6	6	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Moxifloxacin	/	6	6	6	6

Versuchsteil 4: Histologische Analyse der Lunge

Versuchsgruppen	Zeit nach Infektion				
	24 h	36 h	48 h	72 h	120 h
Lösungsmittel+ Lösungsmittel	6	6	6	6	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Lösungsmittel	6	6	/	/	/
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Ampicillin	/	6	6	6	6
<i>Streptococcus pneumoniae</i> + Moxifloxacin	/	6	6	6	6

9.2 Materialien

Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen

2-Propanol, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	ratiopharm GmbH (Ulm)
Aqua ad iniectabilia (10ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bio-Plex Pro™ Assay	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Bio-Plex® Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Kalifornien, USA)
Blutagarplatten (5% Schafblut)	BD Biosciences (Heidelberg)
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Braunol®	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
Chloroform, stabilisiert	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Essigsäure 5 %	Merck (Darmstadt)
Etest®	bioMérieux Deutschland GmbH (Nürtingen)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
FACS™ <i>Lysing Solution</i>	BD Biosciences (Heidelberg)
Heparin 25000 I.E., 5 ml	ratiopharm GmbH (Ulm)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (USA)
Human IL-1β ELISA # E09322-1639	eBioscience (Frankfurt)
Human IL-6 ELISA # 555220	BD Bioscience (Heidelberg)
Human IL-8 ELISA # 555244	BD Bioscience (Heidelberg)
Isopropanol molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml	Pfizer Deutschland GmbH (Berlin)
Methanol >99,5 %, reinst	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Mouse Albumin ELISA	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA)
Moxifloxacin	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Natriumchloridlösung (große Flasche)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
Natriumchloridlösung, 0,9% 10ml	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)

Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Protease-Inhibitor complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Rompun Injektionslösung 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
RPMI 1640 500ml •PAA•E15-039	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems® (USA)
Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH(Freiburg im Breisgau)
TMB soluble	Merck (Darmstadt)
Tris Pufferan® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Rekombinantes humanes TNF- α	R&D Systems GmbH (Wiesbaden)
TRizol Reagent	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

Nährmedien und Zusätze

Bacto™ Technischer Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Todd Hewitt Bouillon	BD Biosciences (Heidelberg)
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)

Verbrauchsmaterialien

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems® (USA)
BD Falcon™ 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 μ m)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount™ Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Biopsiestanze, Standard, (8 mm)	pfm medical AG (Köln)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Einbettkassetten	Rotilabo, Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 μ l)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Falcon Blue Max™ (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ (26 G)	BD Biosciences (Heidelberg)

Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742 10 x 4 x 45mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Lysing Matrix G Tube RNase/DNase-frei) # 6913-500 (500x2ml)	MP Biomedicals LLE (Ohio) (Germany: Eschwege)
Mehrzweckbecher 100 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Platte 6 Multiwell Falcon #3046	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Platte 96 Micro F-Form #82.1581	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Platte 96 Micro U-Form #650101	Th. Geyer Berlin GmbH (Berlin)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Röhrchen Kryo Plus steril 2ml #72.379	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Skalpell, Einweg, steril	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd.(Osaka ,Japan)
Spritzen BD Discardit™ II 2 ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipak™ 1 ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Tube, 12 ml, PP, Round Bottom, Two-Position Vent Stopper (Item-No. 184261)	Greiner bio-one (Frickenhausen)

Geräte

AB 7300-Real Time PCR System	Applied Biosystems® (USA)
Analysewaage (Sartorius, MC 5(-OCE))	Sartorius AG (Göttingen)
Anthos ht2 Mikroplatten Photometer	Anthos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Biometra®T1 Thermocycler	Biomedizinische Analytik (Göttingen)
Bio-Plex™ Workstation	Bio-Rad Laboratories, Inc (Kalifornien, USA)
Bio-Plex™ Millipore	Bio-Rad Laboratories, Inc (Kalifornien, USA)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
BD FACSCalibur™ (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
FastPrep-24 Homogenisator	MP Biomedicals (Heidelberg)

Gradient Cycler PTC-200	MJ Research (Quebec)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
KERN 440-33N, Laborpräzisionswaage	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern)
Kühlschrank (4 °C) / Gefrierschrank (-80 °C)	Kühlsysteme GmbH (Mannheim)
Mastercycler gradient Eppendorf	Eppendorf (Hamburg)
Megafuge 1.0R (Heraeus) Variomag®	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit Axiocam und LSM 5 Pascal)	Axioskop, Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
MiniVent Beatmungspumpe Maus	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH IDEX Health & Science GmbH Wertheim
pH-Meter	Mettler-Toledo FiveEasy pH
Photometer Uvikon XS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Pulmonalkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Rektalsonde physitemp Model BAT-12	physitemp Instruments, Inc. (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Trachealkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Ultra-Turrax T 8	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Schweiz)
Variomag® Electronicrührer Mono	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (USA)
Waage Model CS 200	Ohaus Corporation (USA)
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

Materialien für ECIS

ECGM (10 %)	PromoCell GmbH (Heidelberg)
ECIS Cultureware™ Disposable Electrode Array (8W10E)	Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation (Carlsbad, California, USA)
ECIS™ Model 1600R	Applied BioPhysics®, Applied Biophysics Inc. (Troy, New York, USA)
Endothel-Basal-Medium	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Gelatine	Sigma (Deisenhofen)
HAM'S F12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Österreich)

Kollagenase (Typ CLS II)	Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA)
Penicillin	Boehringer (Mannheim)
Streptomycin	Boehringer (Mannheim)
Thrombin	Sigma (Deisenhofen)
Trypsin	Sigma (Deisenhofen)
Zellkulturflaschen T75	Nunc (Wiesbaden)

Antikörper

rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated (panleukocyte marker; clone: 30-F11)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD16/CD32 (Fc γ II/IIIreceptor block; clone:2.4G2)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C, PE conjugated (GR-1) (neutrophil marker; cloneRB6-8C5)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, APC conjugated (alveolar macrophage marker; clone: BM8)	Caltag Laboratories (Buckingham, UK)

PCR Primer

Name des Amplifikats	Primersequenz
mIL-6	forward 5'-CCACGGCCTTCCTACTTC-3' reverse 5'-TGCACAACCTTTTTCTCATTTC-3' probe 5'-FAM-TCACAGAGGATACTCCCAACAGACCTG-TAMRA-3'
mKC	forward 5'-CCGAAGTCATAGCCCACTCAA-3' reverse 5'-ATTTTCTGAACCAAGGGAGCTT-3' probe 5'-FAM-TCGCGAGGCTTGCTTGACCC-TAMRA-3'
mGAPDH	forward 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' reverse 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' probe 5'-FAM-CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-TAMRA-3'
mIL-1 β	erworben bei Applied Biosystems® Assay no.: Mm00434228

Gen	Länge des Produkts	accession number
mIL-6	147 bp	NM_031168
mKC	74 bp	J04596
mGAPDH	76 bp	NM_008084
mIL-1 β	Applied Biosystems® Assay no.: Mm00434228	NP_032387

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Versuchsgruppen TNF- α Stimulation der humanen Lungenproben	29
Tabelle 2:	Versuchsgruppen der Infektion des humanen Lungengewebes mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
Tabelle 3:	Versuchsgruppen der tierexperimentellen Untersuchungen.....	35
Tabelle 4:	Handlungsanweisungen	38
Tabelle 4 (fortgeführt):	Handlungsanweisungen	39
Tabelle 5:	<i>Master Mix</i> Zusammensetzung für die reverse Transkription der RNA in cDNA	47
Tabelle 6:	Reaktionsschritte der reversen Transkription	48
Tabelle 7:	<i>Master Mix</i> Zusammensetzung für die quantitative PCR.....	48
Tabelle 8:	Bewertungsschema der histologischen Untersuchung des murinen Lungengewebes	52

9.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Grundstruktur der Chinolone modifiziert nach Andersson und MacGowan (Andersson und MacGowan 2003).....	22
Abbildung 2: Versuchsablauf TNF- α Stimulation der humanen Lungenproben	29
Abbildung 3: Versuchsablauf der Infektion des humanen Lungengewebes mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
Abbildung 4: Versuchsablauf der Infektionsversuche an Mäusen	37
Abbildung 5: Differenzierung der Gesamtleukozytenzahl der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	43
Abbildung 6: Quantifizierung und Differenzierung der Gesamtleukozytenzahl des Blutes	44
Abbildung 7: Zytokine im humanen Lungengewebe nach TNF- α Stimulation	57
Abbildung 8: Bakterielle Last im humanen Lungengewebe	58
Abbildung 9: Zytokine im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der Temperatur im murinen Pneumoniemodell.....	60
Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf des Körpergewichts in % im murinen Pneumoniemodell	61
Abbildung 12: Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	62
Abbildung 13: Bakterienlast im Blut.....	63
Abbildung 14: Bakterienlast in der Milz.....	64
Abbildung 15: Pulmonalvaskuläre Permeabilität in der Lunge	66
Abbildung 16a:Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und in der Lunge.....	68
Abbildung 16b:Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und in der Lunge.....	69
Abbildung 17: Zytokine im Blut.....	70
Abbildung 18: Leukozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	72

Abbildung 19: Leukozyten im Blut	74
Abbildung 20: Grad der histopathologischen Veränderungen.....	76
Abbildung 21: Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Antibiotika und Messung des transzellulären elektrischen Widerstands.....	77
Abbildung 22: Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Thrombin und Antibiotika sowie Messung des transzellulären elektrischen Widerstands.....	78
Abbildung 23: Zeitgleiche Stimulation des HUVEC-Monolayers mit Thrombin und Antibiotika sowie Messung des transzellulären elektrischen Widerstands.....	79
Abbildung 24: Wachstumsverhalten von <i>Streptococcus pneumoniae</i> unter Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin (40 µg/ml)	80
Abbildung 25: Wachstumsverhalten von <i>Streptococcus pneumoniae</i> unter Zugabe von Ampicillin oder Moxifloxacin (80 µg/ml)	81

10 Förderung / Interessenkonflikt

Die vorliegende Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als Teil des Sonderforschungsbereichs Transregio 84 (SFB TR84) unterstützt:

Teilprojekt A1 an Herrn Univ.-Prof. Dr. Bastian Opitz; Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Teilprojekte B1, Z2 an Herrn Univ.-Prof. Dr. Norbert Suttrop; Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Teilprojekte C2, C5 an Herrn Univ.-Prof. Dr. Stefan Hippenstiel; Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Teilprojekte C3, C6 an Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzenrath; Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Teilprojekte C5, Z1a an Herrn Dr. med. Andreas Hocke; Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Teilprojekt Z1b an Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber, Ph.D.; Institut für Tierpathologie, Freie Universität Berlin

Zudem wurde die Arbeit durch einen inhaltlich unbeschränkten Forschungszuschuss der Bayer Vital GmbH finanziert.

11 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

Originalartikel:

- 1) Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, Gutbier B, Opitz B, Neudecker J, Rückert J, Gruber AD, Kershaw O, Mayer K, Suttorp N, Witzenrath M
Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia
J Antimicrob Chemother 2015 Mar;70 (3):830-840. doi: 10.1093/jac/dku446
first published online November 17, 2014

Vorträge:

- 1) Müller-Redetzky H, Wienhold S, Hellwig K, Suttorp N, Witzenrath M (2011)
Eigenschaften von Moxifloxacin bei schwerer Pneumokokkenpneumonie der Maus
8. Forschungswerkstatt Moxifloxacin, 17.–18. November 2011, Leverkusen
- 2) Müller-Redetzky HC, Wienhold S, Berlinghoff R, Hellwig K, Gruber A, Suttorp N, Witzenrath M (2012)
Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von Moxifloxacin in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie
Herbsttagung der Sektion Zellbiologie und der Sektion Infektiologie und Tuberkulose in der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 16. - 17. November 2012 Institut für Anatomie, Universitätsklinikum Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- 3) Müller-Redetzky H, Wienhold S, Berlinghoff R, Hellwig K, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M (2013)
Untersuchung des immunmodulatorischen Potentials von Moxifloxacin in der Pneumokokkenpneumonie
54. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. 2013, Hannover, 20. - 23. März 2013, (V222)

Poster:

- 1) Müller-Redetzky HC, Wienhold S, Berlinghoff R, Hellwig K, Kershaw O, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M, (2013)

Investigation of potential immunomodulatory effects of moxifloxacin in severe murine pneumococcal pneumonia

American Thoracic Society International Conference, Philadelphia, 17. – 22. Mai 2013

[Publication Page: A4546]

12 Danksagung

Viele liebe Menschen haben auf die eine oder andere Weise zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen. An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen ganz besonders für ihre Hilfe und Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzzenrath, Arbeitsgruppenleiter der AG Witzzenrath, Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und Bereitstellung der Ressourcen, die ich zur erfolgreichen Bearbeitung des Themas nutzen durfte. Auch für die sehr engagierte Betreuung und die fachlichen Gespräche möchte ich Ihm danken.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D., Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, für die Betreuung meiner Dissertation unter veterinärmedizinischen Gesichtspunkten und der Möglichkeit zur Einreichung dieser Arbeit über das Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Holger Müller-Redetzky danke ich in besonderem Maße für die häufigen Gespräche und Diskussionen, die unermüdliche Beantwortung vieler Fragen und seine Geduld.

Frau Dr. Roswitha Berlinghoff und Frau Dr. Gisela Korfmann von der Bayer Vital GmbH danke ich für die Bereitstellung des Moxifloxacins.

Frau Dr. Olivia Kershaw, Institut für Tierpathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, danke ich für Ihren Einsatz bei der Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate im Rahmen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Andreas Hocke und Frau Johanna Berg, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, möchte ich für Ihre Unterstützung bei den Experimenten mit den humanen Lungen danken.

Für Ihre Unterstützung bei der Isolierung der HUVEC und bei den ECIS-Versuchen sowie für Ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft möchte ich Frau Doris Stoll, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Birgitt Gutbier und Frau Dr. Katrin Reppe vor allem für die engagierte und gründliche Einarbeitung, die Beantwortung unzähliger Fragen und

für die Hilfe bei Problemen zu jeder Tageszeit bedanken. Auch für die vielen motivierenden Gespräche während der Erstellung dieser Dissertationsschrift gilt Ihnen mein Dank.

Auch das tolle Arbeitsklima, der Zusammenhalt des Laborteams sowie der Austausch untereinander haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vor allem die vielen aufmunternden Gespräche während so mancher Tiefphase waren unerlässlich. Daher möchte ich mich ganz herzlich beim gesamten Laborteam und insbesondere bei Julia Herbert, Elena Noe, Katharina Hellwig, Dr. Jasmin Lienau, Denise Barthel, Carolin Ehrler, Anne-Kathrin Neuhauß, Maria Spelling, Katja Fischer, Dr. Jan-Moritz Doehn, Carla Rosa Gonzalez Calera, Dr. Christoph Tabeling, Ute Kellermann und Jan Naujoks für Ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinem langjährigen Partner Herrn Martin Baeker danke ich aus tiefstem Herzen für seine Unterstützung und Geduld. Ohne Ihn hätte ich das Vorhaben „Dissertation“ vielleicht doch aufgegeben.

Besonders möchte ich mich auch bei meiner Freundin und Kollegin Frau Julia Herbert bedanken. Für den notwendigen Rückhalt in schweren Zeiten und die gemeinsame Freude in erfolgreichen Zeiten. Sie hatte stets ein offenes Ohr für Probleme und Sorgen alle Lebenslagen betreffend und hat mich zum Durchhalten motiviert.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die auch auf die eine oder andere Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich der Bayer Vital GmbH für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts danken.

13 Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 2014

Sandra-Maria Wienhold