

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

DISSERTATION

Streptococcus pneumoniae und Influenza A Virus induzierte Immunantwort in
kultiviertem, humanem Lungengewebe und Zellkulturen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kolja Szymanski

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

1	ABSTRACT	1
2	ABSTRAKT	2
3	EINLEITUNG.....	3
4	METHODIK	4
4.1	HUMANES LUNGENGeweBE.....	4
4.2	BAKTERIENSTÄMME	5
4.3	STREPTOKOKKENWACHSTUM	5
4.4	IMMUNHISTOCHEMIE UND KONFOKALE IMMUNFLUORESZENZ.....	5
4.5	WESTERN BLOT	6
4.6	PGE ₂ ELISA.....	6
4.7	HBD-2 UND 3 ELISA.....	6
4.8	ZYKLISCHES ADENOSINMONOPHOSPHAT (cAMP) ELISA.....	6
4.9	MASSENSPEKTROMETRIE	6
4.10	QUANTITATIVE PCR.....	6
4.11	HBD-2 UND 3 UND TOLL-LIKE-REZEPTOR 2 (TLR-2) POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR).....	6
4.12	RNS INTERFERENZ IN BEAS-2B ZELLEN	7
4.13	BIOPLEX PROTEIN ARRAY SYSTEM.....	7
4.14	CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION (ChIP)	7
4.15	<i>S. PNEUMONIAE</i> REPLIKATIONSVERSUCHE	7
4.16	ZYTOKINBESTIMMUNG NACH INFLUENZA A VIRUSINFEKTION	7
4.17	TRANSMISSIONSELEKTRONENMIKROSKOPIE	7
4.18	STATISTISCHE AUSWERTUNG	7
5	ERGEBNISSE.....	8
5.1	EINFLUSS VON <i>S. PNEUMONIAE</i> AUF DIE REGULATION DER ZYKLOOXYGENASE-2 IN HUMANEM LUNGENGeweBE (PUBLIKATION 1, EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, 2012).....	8
5.2	INFLUENZA A VIREN INFIZIEREN TYP II PNEUMOZyTEN IN HUMANEM LUNGENGeweBE (PUBLIKATION 2, THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, 2012).....	9
5.3	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT HUMANES β -DEFENSIN-2 UND 3 IN HUMANEN LUNGENEPIHELZELLEN (PUBLIKATION 3, EXPERIMENTAL LUNG RESEARCH, 2011).....	10
6	DISKUSSION	11
6.1	EINFLUSS VON <i>S. PNEUMONIAE</i> AUF DIE REGULATION DER ZYKLOOXYGENASE-2.....	12
6.2	INFLUENZA A VIREN INFIZIEREN TYP II PNEUMOZyTEN.....	16
6.3	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT ANTIMIKROBIELLE PEPTIDE IN BRONCHIALEPIHELZELLEN	18
7	FAZIT UND AUSBLICK	19
8	REFERENZEN.....	20
9	ANTEILSERKLÄRUNG.....	26
10	DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	28
10.1	PUBLIKATION 1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE INDUCED REGULATION OF CYCLOOXYGENASE-2 IN HUMAN LUNG TISSUE	28
10.2	PUBLIKATION 2 INFLUENZA A VIRUSES TARGET TYPE II PNEUMOCYTES IN THE HUMAN LUNG	39
10.3	PUBLIKATION 3 <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> INDUCES HUMAN BETA-DEFENSIN-2 AND -3 IN HUMAN LUNG EPITHELIUM.....	50
11	LEBENS LAUF	62
12	PUBLIKATIONS LISTE.....	64
13	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	65
14	DANKSAGUNG	66

1 Abstract

Pneumonia is one of the most common causes of death worldwide. In order to improve the understanding of the disease, both a streptococcal and an Influenza A virus infection model were developed using fresh and intact human lung tissue. *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoanie*) and Influenza A viruses belong to the most important lung pathogens. The streptococcal infection model was established to study the regulation of cyclooxygenase (COX) and the induction of cytokines during lung inflammation, while the influenza infection model was developed to characterise different Influenza A viruses in relation to their replication, cellular tropism and ability to induce cytokines in human lung tissue. Additionally, the role of human β -defensins (hBD) -2 and 3 was investigated during streptococcal infection of bronchial epithelial cells.

S. pneumoniae efficiently replicated and induced expression of COX-2, but not COX-1 in human lung tissue. Immunohistochemical staining of lung tissue revealed COX-2 expression in alveolar macrophages, endothelial cells and type II, but not type I pneumocytes. The infection led to the release of prostaglandin E₂ (PGE₂) into the supernatant which was repressed when COX-2 was inhibited prior to infection. Inhibition of p38 mitogen activated kinase as well as extracellular regulated kinases 1 and 2 during infection prevented COX-2 expression and subsequent PGE₂ formation. Moreover, the infection of lung tissue resulted in COX-2 dependant increase of prostanoids 6-keto-prostaglandin F_{1 α} and thromboxane B₂. Among a variety of other cytokines, *S. pneumoniae* induced the release of platelet derived growth factor which was further augmented by inhibition of COX-2.

The highly pathogenic avian H5N1 as well as the seasonal H1N1 and H3N2 influenza viruses replicated efficiently in human lung tissue when compared to the classic porcine and low pathogenic avian viruses, which replicated poorly. All viral strains investigated exclusively infected type II pneumocytes and also, to a much lesser extent, alveolar macrophages. The infection of lung tissue with low and highly pathogenic avian viruses resulted in strong cytokine induction, whereas infection with porcine, human and pandemic viruses only caused a weak cytokine induction.

Infection of bronchial epithelial cells with *S. pneumoniae* induced the expression of hBD-2 and 3. The induction of both defensins was toll-like receptor-2 mediated. Additionally, hBD-2 and 3 showed antimicrobial activity towards *S. pneumoniae*. The formation of hBD-2 was dependant on the activity of phosphoinositide-3-kinase and the transcription factor NF- κ B, whereas the synthesis of hBD-3 was controlled by the c-Jun N-terminal kinase - AP1 pathway.

The successful establishment of both infection models using human lung tissue provides a useful tool to simulate pneumonia in humans, allowing valuable data about the interaction of these important lung pathogens with the human host to be gathered. The induction of hBD-2 and 3 in bronchial epithelial cells and their antimicrobial activity implies a potential importance to innate immunity.

2 Abstrakt

Eine der häufigsten Todesursachen weltweit ist die Pneumonie. Um das Verständnis der Infektionen im Menschen zu verbessern, wurden im Zusammenhang mit dieser Arbeit jeweils ein Streptokokken- und ein Influenza-Infektionsmodell in humanem, kultiviertem Lungengewebe etabliert. Beide Erreger zählen zu den bedeutendsten Lungenpathogenen. Das Streptokokken-Infektionsmodell diente der Untersuchung des Einflusses der Streptokokkeninfektion auf die Regulation der Zyklooxygenase (COX) und der induzierten Zytokinantwort im Lungengewebe. Im Influenza-Infektionsmodell fokussierte die Analyse auf verschiedene Influenzastämme hinsichtlich ihres Replikationsverhaltens, des zellulären Tropismus und der induzierten Zytokinantwort. Weiterhin sollte mit Hilfe von Zellkulturversuchen die Rolle der humanen β -Defensine (hBD)-2 und 3 im Zusammenhang mit einer Streptokokkeninfektion genauer erforscht werden.

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) vermehrte sich stark im Lungengewebe und induzierte die Bildung von COX-2, während COX-1 konstitutiv exprimiert wurde. Immunhistologische Versuche definierten die zelltypspezifische Induktion der COX-2: Dabei war die COX-2 Expression in Alveolarmakrophagen, Endothelzellen und Typ II Pneumozyten, nicht jedoch Typ I Pneumozyten, nachweisbar. Im Überstand des infizierten Gewebes fand sich ein Anstieg des Prostaglandin E₂ (PGE₂), welcher sich durch selektive Inhibition der COX-2 unterdrücken ließ. Blockade sowohl der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase, als auch der extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 während der Infektion unterdrückte die COX-2 Expression sowie die PGE₂ Bildung. Außerdem führte die Infektion zu einem COX-2 abhängigen Anstieg der Prostanoid 6-keto-Prostaglandin F_{1 α} und Thromboxan B₂. Pneumokokken induzierten im Lungengewebe eine Reihe von Zytokinen, von denen der Plättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor COX-2 abhängig reguliert war.

Das hoch-pathogene aviäre H5N1 Virus sowie die saisonalen H1N1 und H3N2 Viren replizierten im Vergleich zum klassischen porzinen und niedrig-pathogenen aviären Virus sehr stark im Lungengewebe. Alle untersuchten Viren infizierten ausschließlich Typ II Pneumozyten und zu einem sehr geringen Anteil Alveolarmakrophagen. Die Infektion mit niedrig- und hoch-pathogenen aviären Viren führte zu einer teils starken Zytokinbildung, während die Infektion mit porzinen, humanen und pandemischen Viren nur eine schwache Induktion bewirkte.

Die Infektion von Bronchialepithelzellen mit *S. pneumoniae* hatte die Expression von hBD-2 und 3 zur Folge. Die Induktion beider Defensine vermittelte der Toll-like-Rezeptor 2. Darüber hinaus verfügten hBD-2 und 3 über antimikrobielle Eigenschaften gegenüber *S. pneumoniae*. Weiterhin war die Bildung von hBD-2 abhängig von der Phosphoinositid-3-Kinase und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die hBD-3 Bildung wurde über den c-Jun N-terminale Kinase - AP1 Signalweg reguliert.

Die Verwendung von humanem Lungengewebe und die Etablierung beider Infektionsmodelle ermöglicht die Simulation wesentlicher Aspekte der Pneumonie im Menschen. Dadurch können in Zukunft wertvolle Beiträge zur Erforschung der bakteriellen und viralen Pneumonie gewonnen werden. Die Induktion von hBD-2 und 3 in Bronchialepithelzellen und deren antimikrobielle Aktivität implizieren ihre potenzielle Bedeutung in der angeborenen Immunantwort.

3 Einleitung

Die Pneumonie ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit [1]. Insgesamt stellt die Therapie der Pneumonie in der westlichen Welt eine hohe finanzielle Belastung für die Gesundheitssysteme dar [2]. Je nach Studie ist in 20 - 40 % der Fälle eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) Auslöser der Erkrankung. Damit stellt dieser Erreger die häufigste Ursache der Pneumonie dar. Die häufigsten viralen Erreger sind Influenzaviren [3]. Während die schwere primäre virale Pneumonie durch Influenza A Viren eher selten auftritt, begünstigt diese Infektion häufig eine konsekutive bakterielle Pneumonie [3-5]. Obwohl Impfstoffe, Antibiotika und antivirale Mittel gegen Streptokokken bzw. Influenzaviren verfügbar sind, führen beide Erkrankungen nach wie vor zu hoher Mortalität weltweit [6, 7]. Des Weiteren bieten Impfstoffe nur gegen die entsprechenden Bakterien serotypen bzw. Influenzastämme Schutz [8, 9]. Bedingt durch die genetische Variabilität sowohl von Streptokokken als auch von Influenzaviren entwickeln sich außerdem immer wieder bakterielle Resistenzen gegen Antibiotika bzw. virale Resistenzen gegen z.B. Neuraminidasehemmer [10-12]. Um diesen Problemen entgegenzuwirken und letztendlich auch neue Behandlungsmöglichkeiten zu ermöglichen, ist es von großer Bedeutung, die Interaktion von Pathogen und Wirt genauer zu verstehen. Diese Untersuchungen können eine rationale Basis zur Entwicklung supportiver, wirtsbasierter Therapien legen. Viele Versuchsmodelle verwenden immortalisierte Zelllinien oder Tiere [13]. Die gewonnenen Erkenntnisse tragen in hohem Maße zum besseren Verständnis des Verlaufs einer Pneumonie bei. Allerdings gibt es zahlreiche Limitationen [14, 15], so können Zellkulturmodelle die komplexe Situation in Geweben nur begrenzt simulieren und Ergebnisse aus Tierversuchen können nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Um diese Probleme zu adressieren, wurde humanes Lungengewebe von Patienten akquiriert, die sich aufgrund eines Lungentumors einer Lungenteilresektion unterzogen. In diesem Lungengewebe konnte jeweils ein Streptokokken- und Influenza-Infektionsmodell etabliert werden.

Durch die Zykllooxygenase (COX) synthetisierten Prostaglandine (PG) spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen Immunantwort [16]. PGE₂, eines der am besten untersuchten PG, wirkt über die Aktivierung von vier verschiedenen G-Protein gekoppelten E Prostanoid Rezeptoren (EP₁₋₄) [16]. Des Weiteren hat PGE₂ in verschiedenen Zelltypen einen Einfluss auf die Regulation der Inflammation [17-20]. Während die COX-1 in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert ist, kann die COX-2 durch Bakterien, Zytokine und andere Stimuli induziert werden [21-24]. Das Streptokokken-Infektionsmodell diente der Untersuchung der Rolle der COX und ihrer Metabolite während der Infektion.

Die Replikation der meisten aviären Influenzaviren ist im humanen Respirationstrakt stark eingeschränkt [25, 26]. Dennoch gibt es immer wieder hoch-pathogene aviäre Influenzaviren, die im Menschen zu schweren Infektionen mit hoher Mortalität führen [27]. Aviäre Influenzaviren binden über ihr Hämagglutinin bevorzugt an Sialinsäuren mit einer α -2,3 Bindung zu Galaktose (α -2,3SA),

während humane Influenzaviren an α -2,6SA binden [28]. Beide Rezeptoren sind auf pulmonalen Epithelzellen präsent und ermöglichen eine Bindung von aviären und humanen Viren [29, 30]. Daher müssen über die Rezeptorexpression hinaus weitere restringierende Mechanismen in Betracht gezogen werden. In diesem Zusammenhang werden z.B. der Endozytosemechanismus [31], der Zelltropismus [32] oder die unterschiedlich starke Induktion von Zytokinen diskutiert [33-35].

Die humanen β -Defensine (hBD) gehören einer Gruppe kleiner kationischer, antimikrobieller Peptide an [36]. Die bisher bekannten β -Defensine 1-4 werden alle in Epithelzellen der Lunge exprimiert. hBD-1 ist konstitutiv exprimiert, während die Expression von hBD-2,3 und 4 durch proinflammatorische Zytokine induzierbar ist [37-39]. Aufgrund der antimikrobiellen Eigenschaften tragen Defensine selbst zur Abwehrreaktion der Lunge bei. Des Weiteren regulieren sie die Zytokinantwort und können Effektorzellen mittels Chemotaxis zu Inflammationsherden führen [40-42].

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe von frischem, humanem Lungengewebe ein Streptokokken-Infektionsmodell zu etablieren. Während der Infektion sollte die Regulation der Zyklooxygenase und deren Metabolite sowie die Streptokokken induzierte Zytokinantwort analysiert werden. Ein weiteres Ziel war es, das Lungengewebe auch für ein Influenza A-Infektionsmodell zu verwenden. Dieses Modell sollte der Untersuchung der Replikation, des Zelltropismus und der induzierten Zytokinantworten verschiedener Influenzaviren dienen. Des Weiteren sollte in Bronchialepithelzellen der Einfluss einer Streptokokkeninfektion auf die Expression von antimikrobiellen Peptiden analysiert werden.

4 Methodik

4.1 Humanes Lungengewebe

Im Rahmen der Lungentumor Chirurgie fallen für die weitere Feindiagnostik unbenötigte Anteile von tumorfreiem Gewebe an. Aus diesem Gewebe wurden kleine zylindrische Fragmente (ca. 8x8x8 mm) präpariert und kultiviert. Die Aufklärung der Patienten sowie die Unterzeichnung der Einverständniserklärung zur Verwendung des Gewebes fanden vor dem chirurgischen Eingriff statt. Die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin hat die Studien genehmigt (Protokollnummer EA2/050/08 und EA2/023/07).

4.1.1 Verwendung der Lungenproben im Streptokokken-Infektionsmodell

Die Kultivierung der Lungenproben erfolgte für 24 h in mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS supplementiertem RPMI 1640 Medium. Um eine möglichst gleichmäßige und vollständige Stimulation des Gewebes zu gewährleisten, wurden 200 μ l des Kontroll- oder Infektionsmediums pro 100 mg Gewebe an verschiedenen Stellen in das Gewebe injiziert. Die anschließende Kultivierung der Lungenproben fand für die jeweils angegebenen Zeitwerte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ statt.

4.1.2 Verwendung der Lungenproben im Influenza-Infektionsmodell

Die Lungenproben wurden für 24 h in mit 0,3 % BSA, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiertem RPMI 1640 kultiviert. Der Infektion der Proben mit 4×10^5 PFU für 1 h folgte ein Waschschrift um überschüssige Viren zu entfernen. Virustiterbestimmungen für die Wachstumskurven erfolgten mittels MDCK Assay nach bereits beschriebener Methode [43]. Die folgende Virenstämme fanden Verwendung: A/Thailand/1(Kan-1)/2004(Thai/04(H5N1)), A/Bayern/63/2009 (Bay/09(H1N1pdm)), A/New Caledonia/20/1999 (NC/99(H1N1)), A/Panama/2007/1999 (Pan/99(H3N2)), A/duck/Alberta/60/76 (Dk/Alb(H12N5)) und A/swine/Wisconsin/1/67 (Sw/Wis(H1N1)). Die Anzucht aller humanen Stämme erfolgte in MDCK Zellen, während die aviären und porzinen Stämme in 11 Tage alten befruchteten Hühnereiern vermehrt wurden.

4.2 Bakterienstämme

Der bekapselte Stamm *S. pneumoniae* D39 Serotyp 2 (NCTC7466) und die aus diesem Stamm entwickelte unbekapselte Variante *S. pneumoniae* R6X sowie die Pneumolysin negative Doppelmutante R6X Δ ply wurden, wie bereits beschrieben, kultiviert [44]. Nach Zentrifugation und Resuspendierung im jeweiligen Infektionsmedium erfolgte die Verdünnung der Suspension bis zum Erreichen der gewünschten Infektionsdosis.

4.3 Streptokokkenwachstum

Um das Wachstumsverhalten von *S. pneumoniae* genauer zu untersuchen, wurde humanes Lungengewebe infiziert und direkt nach der Infektion bzw. nach 8 h Infektionsdauer mittels Fast Prep Homogenisator aufgeschlossen. Dem Aufschluss folgte ggf. eine Verdünnung des Überstandes und die Ausplattierung auf Agarplatten. Nach Inkubation über Nacht und Auszählung der Kolonien erfolgte die Bestimmung der Keimlast.

4.4 Immunhistochemie und konfokale Immunfluoreszenz

Nach Infektion der Lungenproben mit Influenzaviren oder Streptokokken wurden diese in Formaldehyd fixiert und anschließend automatisiert für die Histologie vorbereitet. Nach der Entparaffinierung diente das Kochen der Schnitte in Natrium-Citrat Puffer der Antigendemaskierung. Der Permeabilisierung folgte eine Inkubation mit auf den Sekundärantikörper angepasstem Serum zur Blockade unspezifischer Bindungen. Die anschließende Inkubation der Primärantikörper geschah über Nacht. In der Immunhistochemie erfolgte die Detektion des Primärantikörpers mittels mit alkalischer Phosphatase gekoppeltem Sekundärantikörper. Der durch die Phosphatase umgesetzte Farbstoff FastRed diente der Visualisierung der Antikörperbindung. Dieser Farbstoff fand ebenfalls Verwendung in der Lektinfärbung, welche an α -2,3SA und α -2,6SA gebundene Lektine darstellt. Die Inkubation mit Mayers Hämalaun Lösung ermöglichte die Gegenfärbung der Zellkerne. Um Doppelfärbungen mittels konfokaler Immunfluoreszenz untersuchen zu können, kamen

Sekundärantikörper zum Einsatz, die an verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Als Typ I und II Epithelzellmarker wurden anti-caveolin 1 bzw. anti-pro-surfactant protein C Antikörper verwendet. Anti-CD68 Antikörper dienten der Visualisierung von Alveolarmakrophagen. Zur Dokumentation aller Hellfeld Färbungen kam ein Zeiss Pascal 5 Mikroskop zum Einsatz. Jegliche Fluoreszenzfärbungen wurden mit einem konfokalen Zeiss LSM 780 Mikroskop untersucht.

4.5 Western Blot

Western Blot Analysen erfolgten wie zuvor beschrieben [45]. BEAS-2B Zellysate oder Lungenhomogenate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose Membranen transferiert. Nach Blockade der Membran erfolgte die Inkubation der Primärantikörper über Nacht. Nach Inkubation des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers diente der Odyssey Infrarot Scanner der Detektion der Proteine.

4.6 PGE₂ ELISA

Die PGE₂ Konzentration im unbehandelten Überstand infizierter Lungenproben wurde mittels ELISA bestimmt.

4.7 hBD-2 und 3 ELISA

Überstände von infizierten BEAS-2B Zellen wurden zunächst mittels Ultrafiltration 10-fach konzentriert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels hBD-2 und 3 ELISA.

4.8 Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ELISA

Lungengewebe wurde nach der Stimulation gewogen und in ein 8-faches Volumen Trichloressigsäure überführt. Nach dem Zellaufschluss durch den FastPrep Homogenisator erfolgte die Bestimmung der cAMP Konzentration mittels ELISA.

4.9 Massenspektrometrie

Überstände von infiziertem Lungengewebe wurden hinsichtlich freier und lipidgebundener Prostanoiden nach bereits beschriebener Methode untersucht [46].

4.10 Quantitative PCR

RNA wurde aus Lungengewebe mittels TRIZOL Extraktion gewonnen und revers transkribiert. Danach erfolgte eine quantitative PCR. Um die Anzahl an EP-Rezeptor Kopien exakt bestimmen zu können, wurden Plasmide mit klonierten EP-Rezeptor und GAPDH cDNAs zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Die genauen Primer Sequenzen können dem Supplement von Publikation 1 entnommen werden.

4.11 hBD-2 und 3 und Toll-like-Rezeptor 2 (TLR-2) Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Aus BEAS-2B Zellen isolierte und revers transkribierte RNA wurde mittels semi-quantitativer PCR amplifiziert und durch Agarose Gelelektrophorese visualisiert. Die Sequenzen für die spezifischen

Primer für die Amplifikation von GAPDH, hBD-2 und 3 und TLR-2 können der Publikation 3 entnommen werden.

4.12 RNS Interferenz in BEAS-2B Zellen

Kontrol siRNA und TLR-2 spezifische siRNA wurden mittels siRNA-lipoplexen nach bereits beschriebener Methode in BEAS-2B Zellen transfiziert [47]. Die jeweiligen Sequenzen der Primer können Publikation 3 entnommen werden.

4.13 Bioplex Protein Array System

In den Überständen von Streptokokken infizierten Lungenproben wurden die Konzentrationen von folgenden Zytokinen mittels Bioplex Protein Array System bestimmt: Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), IL-1 Rezeptorantagonist (ra), Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Makrophagen inflammatorisches Protein (MIP)-1 α , Interleukin (IL-)-1 β , IL-17, IL-10, IL-15, IL-6 und IL-8.

4.14 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die ChIP erfolgte wie beschrieben [48, 49]. Die verwendeten Sequenzen der Primer sind aus der Publikation 3 ersichtlich.

4.15 *S. pneumoniae* Replikationsversuche

Die Kultivierung von D39 und R6X erfolgte in Keratinozyten SFM mit 1 % FCS und steigenden Konzentrationen von rekombinantem hBD-2 und 3. Ausplattierung der jeweiligen Bakteriensuspension und Bestimmung der Keimzahl ermöglichte die Beurteilung der antimikrobiellen Wirkung.

4.16 Zytokinbestimmung nach Influenza A Virusinfektion

Nach Inaktivierung des Virus wurden Interferon gamma-induziertes Protein 10 (IP-10) und MIP-1 β mittels Procarta Cytokine Assay Kit in Überständen infizierter Lungenproben detektiert. Die Bestimmung von Interferon (IFN)- β und IL-1 β Konzentrationen erfolgte mittels ELISA.

4.17 Transmissionselektronenmikroskopie

Mit Influenzaviren infizierte Lungenproben wurden zunächst fixiert und anschließend dehydriert. Die durch ein Ultramikrotom angefertigten Gewebeschnitte wurden gegenfärbt und mit einem TEM 902 Mikroskop untersucht. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer slow-scan CCD Kamera.

4.18 Statistische Auswertung

Die jeweils angewandten statistischen Methoden sind aus den einzelnen Veröffentlichungen ersichtlich.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von *S. pneumoniae* auf die Regulation der Cyclooxygenase-2 in humanem Lungengewebe (Publikation 1, European Respiratory Journal, 2012)

Diese Studie untersuchte den Einfluss einer Infektion mit dem Pneumonieerreger *S. pneumoniae* auf die Regulation der COX-1 und 2 in humanem Lungengewebe. Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist ein gleichmäßiges und kontrolliertes Erregerwachstum in der Gewebeprobe. Innerhalb von 8 h nach der Infektion stieg die Erregerzahl um bis zu 3 logarithmische Stufen. Weiterhin führte die Infektion zeitabhängig zur Induktion des COX-2 Proteins, wohingegen kein Einfluss auf die im Lungengewebe konstitutiv exprimierte COX-1 feststellbar war. In der Immunhistochemie zeigte sich in infizierten Lungenproben eine zelltypspezifische Induktion der COX-2 in Alveolarmakrophagen, im vaskulären Endothel sowie in den alveolaren Epithelzellen (AEC). Diese *ex vivo* Befunde fanden Bestätigung in Lungengewebe von Patienten mit florider Pneumonie in welchem die COX-2 ebenfalls in AEC detektiert werden konnte. Mittels Doppelfärbung in der Immunfluoreszenz konnte dokumentiert werden, dass nur Typ II Pneumozyten, nicht jedoch Typ I Pneumozyten, die COX-2 exprimieren. Bei Verwendung eines proinflammatorischen Stimulus (TNF- α /IL-1 β) anstelle des Erregers war ein gleiches Expressionsschema zu beobachten.

Um Rückschlüsse auf die enzymatische Aktivität der COX-2 ziehen zu können, wurde das durch COX-2 synthetisierte PGE₂ im Überstand von infiziertem Lungengewebe quantifiziert. 16 h nach Infektion stieg die PGE₂ Konzentration signifikant an. Die selektive Inhibition der COX-2 blockierte den Konzentrationsanstieg von PGE₂. Da frühere *in vitro* Studien in immortalisierten Lungenepithelzelllinien eine Abhängigkeit der COX-2 Expression von der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Aktivität zeigten [23], sollte dieser Zusammenhang auch im Lungenmodell untersucht werden. Die Streptokokkeninfektion führte zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der p38 MAPK, wohingegen die extrazellulär regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK) bereits in unstimuliertem Gewebe phosphoryliert und aktiviert waren. Dennoch hatte sowohl die Inhibition der p38 MAPK als auch der ERK während der Infektion die Unterdrückung der COX-2 Expression und damit konsekutiv die Verhinderung der PGE₂ Bildung zur Folge. *In vitro* Studien, in denen Lungenfibroblasten von Mäusen verwendet wurden, zeigten einen positiven Feedback Loop des produzierten PGE₂ auf die COX-2 Expression [50]. Im humanen Lungenmodell hatte jedoch weder die Inhibition der COX-2 noch die alleinige Stimulation mit PGE₂ einen Einfluss auf die COX-2 Expression.

Die Aktivität der COX-2 führt neben der PGE₂ Sekretion zur Bildung einer Reihe anderer biologisch aktiver Metabolite [51]. Deren Synthese ist abhängig von weiteren Synthesen, deren Expression sich von Gewebe zu Gewebe unterscheidet [52]. Daher kann es zu unterschiedlichen Mediatorprofilen in verschiedenen Geweben kommen. Um ein Metabolitenprofil in der Lunge nach Infektion zu ermitteln, wurden die Konzentrationen von 6-keto PGF_{1 α} , Thromboxan B₂ (TXB₂), PGE₂, PGH₂, PGE₂-Ethanolamid, PGF_{2 α} , und 8-iso-PGE₁ bestimmt. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg nach der

Infektion und eine signifikante Abnahme nach vorheriger selektiver COX-2 Inhibition für den Metabolit PGE₂ gemessen. Für die Metabolite 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ zeigte sich ein gleicher, jedoch nicht signifikanter Trend. Die Konzentrationen der anderen Metabolite zeigten keine Tendenz oder waren nicht nachweisbar.

Die Wirkung von PGE₂ wird hauptsächlich durch die EP-Rezeptoren₁₋₄ vermittelt [16]. Die Expression der EP-Rezeptoren_{1,3} ist im Lungengewebe auf ähnlichem Niveau, im Vergleich zur EP₄-Rezeptor Expression jedoch deutlich geringer. Die spezifische Aktivierung des EP₄-Rezeptors führte zum Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration.

Verschiedene Studien haben den Einfluss von PGE₂ auf die Regulation von Zytokinen nachgewiesen [17-20]. Um diesen Zusammenhang im humanen Lungenmodell näher zu untersuchen, wurden unbehandelte sowie COX-2 inhibierte Lungenproben infiziert. Die Verwendung des BioPlex Protein Arrays ermöglichte die Quantifizierung einer Vielzahl von Zytokinen in den entsprechenden Überständen. Die Pneumokken-Infektion verursachte einen Anstieg von TNF-α, IL-1β, PDGF, GM-CSF, IL-17, IL-10, IL-1ra und IL-15, während die Konzentrationen von IL-6, IL-8 und MIP-1α unverändert blieben. Bei vorheriger Inhibition der COX-2 führte die Infektion zu einem signifikanten Anstieg von PDGF und einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg von TNF-α ($p < 0.09$) und GM-CSF ($p < 0.15$). Alle anderen durch die Infektion induzierten untersuchten Zytokine wurden durch die COX-2 Inhibition nicht beeinflusst.

5.2 Influenza A Viren infizieren Typ II Pneumozyten in humanem Lungengewebe (Publikation 2, The Journal of Infectious Diseases, 2012)

In dieser Studie wurde das Infektionsverhalten von Influenza A Viren in humanem Lungengewebe untersucht. Dazu wurde zunächst das Wachstum verschiedener Influenza A Viren über einen Zeitraum von 48 h verglichen. Im Vergleich zum saisonalen Pan/99(H3N2) und dem hoch-pathogenen Thai/04(H5N1) Virus, welche sich beide stark vermehrten, erhöhte sich der Virustiter des niedrig-pathogenen aviären Dk/Alb(H12N5) Virus nur geringfügig. Des Weiteren replizierten die saisonalen und pandemischen NC/99(H1N1) und Bay/09(H1N1pdm) Viren in ähnlich hohem Maße, während die Replikation des klassischen porzinen Sw/Wis(H1N1) Virus im Vergleich stark eingeschränkt war. Um die mögliche Ursache für das unterschiedliche Wachstumsverhalten zu ermitteln, wurde der zelluläre Tropismus der Viren mittels Immunhistochemie untersucht. Trotz der schwachen Vermehrung der niedrig pathogenen aviären und klassischen porzinen Viren konnte virales Antigen in der humanen Lunge nachgewiesen werden. Doppelfärbungen demonstrierten, dass alle eingesetzten Virusstämme gleichermaßen primär Typ II Pneumozyten infizierten. Es konnte kein virales Antigen in Typ I Pneumozyten detektiert werden, obwohl durch spezifische Lektinfärbungen Rezeptoren für aviäre und humane Viren sowohl auf Typ II als auch auf Typ I Pneumozyten nachweisbar waren. Durch weitere Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Stämme ebenfalls Alveolarmakrophagen infizieren. Die Quantifizierung von infizierten Zellen in Gewebeschnitten zeigte, abhängig vom Virusstamm, etwa 4 %-11 % infizierte Makrophagen und 89 %-96 % infizierte Typ II Pneumozyten. Die exklusive Typ II Pneumozyten-Infektion konnte zudem auch in mit

Pan/99(H3N2) Virus infizierten Lungenproben in der Transmissions Elektronen Mikroskopie verifiziert werden. Zellen, an denen knospende Viruspartikel erkennbar waren, wurden durch das Vorhandensein von multilamellären Körperchen eindeutig als Typ II Pneumozyten identifiziert.

Um die induzierte Immunantwort nach Infektion mit verschiedenen Influenzaviren im Lungengewebe zu vergleichen, wurden im Überstand mehrere Zytokinkonzentrationen bestimmt. Die Infektion mit den saisonalen Pan/99(H3N2) und NC/99(H1N1) Virusstämmen als auch mit pandemischem Bay/09(H1N1pdm) Virus führte lediglich zu einem geringen Anstieg der Zytokine IP-10, MIP-1 β , IFN- β und IL-1 β . Dahingegen bewirkte das hoch-pathogene Thai/04(H5N1) Virus eine starke Induktion der gemessenen Zytokine. Besonders auffällig ist, dass das niedrig-pathogene aviäre Dk/Alb(H12N5) Virus weitaus höhere Zytokinkonzentrationen hervorrief als die saisonalen Pan/99(H3N2) und NC/99(H1N1) Virusstämme. Das klassische porcine Sw/Wis(H1N1) Virus hingegen provozierte eine schwache Zytokinantwort. Im Vergleich zu Infektionen mit saisonalen Viren induzierte es jedoch höhere IP-10 Konzentrationen.

5.3 *S. pneumoniae* induziert humanes β -Defensin-2 und 3 in humanen Lungeneithelzellen (Publikation 3, Experimental Lung Research, 2011)

Diese Studie untersuchte den Einfluss einer Streptokokkeninfektion auf die Regulation von antimikrobiellen Peptiden in humanen Lungeneithelzellen. Zunächst konnte ein konzentrationsabhängiger antimikrobieller Effekt von hBD-2 und 3 sowohl gegenüber dem bekapselten Stamm D39 als auch gegenüber der unbekapselten Variante R6X nachgewiesen werden. Die antimikrobielle Wirkung war dabei ausgeprägter gegenüber D39. In der Bronchiepithelzelllinie BEAS-2B konnte demonstriert werden, dass die Infektion mit D39 und R6X zu einer erhöhten Freisetzung von hBD-2 und 3 in den Überstand führt. Die Infektion von kultivierten, primären humanen Eithelzellen (SAEC) mit D39 zeigte den gleichen Befund.

Weiterhin sollte geklärt werden, welche Faktoren für die Induktion der Peptide essenziell sind. Zunächst wurde die Rolle der bakteriellen Viabilität und des Exotoxins Pneumolysin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Infektion mit hitzeinaktivierten als auch mit Pneumolysin-negativen Streptokokken zur Induktion beider Defensine führt. Um die Funktion des TLR-2 hinsichtlich der hBD-2 und 3 Induktion zu untersuchen, wurde dessen Expression mittels spezifischer siRNA in BEAS-2B Zellen gehemmt. In Kontrollzellen, die mit unspezifischer siRNA transfiziert wurden, führte eine Streptokokkeninfektion zur Induktion von hBD-2 und 3, wohingegen Zellen mit geringer TLR-2 Expression während der Infektion signifikant weniger hBD-2 und 3 bildeten.

Da die Aktivierung des TLR-2 zur Aktivierung von MAPK führen kann [53], wurde untersucht, ob die Infektion von BEAS-2B Zellen mit Streptokokken zur MAPK Aktivierung führt. Es zeigte sich eine Aktivierung der MAPK ERK, p38 und c-Jun N-terminale Kinase (JNK) nach Infektion. Des Weiteren hatte die Inhibition dieser aktivierten MAPK keinen Einfluss auf die Streptokokken induzierte Bildung von hBD-2. Dahingegen reduzierte die Inhibition der JNK die Bildung von hBD-3. Andere Studien zeigten eine wichtige Rolle der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) in der hBD-2 Regulation [54]. Dieser Befund konnte in dieser Studie im Zusammenhang mit der Streptokokkeninfektion von BEAS-

2B Zellen bestätigt werden. Eine Blockade der PI3K vor der Infektion reduzierte die hBD-2 Bildung durch BEAS-2B Zellen.

Der hBD-2 Promoter wie auch der hBD-3 Promoter besitzen Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Da diese bereits mit der transkriptionellen Aktivierung von hBD-2 und 3 in Zusammenhang gebracht wurden [55-57], sollte deren Rolle im Kontext der Streptokokkeninfektion untersucht werden. Es zeigte sich, dass die Inhibition des Proteasoms und der Aktivierung von NF- κ B die Streptokokken abhängige hBD-2 Bildung in BEAS-2B Zellen reduzierte. Die Expression von hBD-3 hingegen blieb unverändert. Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von NF- κ B an der hBD-2 Bildung konnte mittels Chromatin Immunopräzipitation erbracht werden. Während der Infektion zeigte sich eine erhöhte Bindung der NF- κ B Untereinheit p65/Rel A an den hBD-2 Promoter. Die gleichzeitig gemessene verstärkte Rekrutierung der RNA Polymerase an den Promoter spricht für die gesteigerte Transkription des hBD-2 Gens. Es gibt Evidenz, dass JNK den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren kann [58]. Mittels Chromatin Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass die AP-1 Untereinheit c-Jun während der Infektion verstärkt zum hBD-3 Promoter rekrutiert wird. Außerdem kam es ebenfalls zur gesteigerten Bindung der RNA-Polymerase an den Promoter, was eine transkriptionelle Aktivierung des Gens vermuten lässt.

6 Diskussion

Ein elementares Problem der Grundlagenforschung ist die Übertragbarkeit von Versuchsergebnissen aus Zellkultur- oder Tierversuchen auf die Situation im Menschen. Im Gegensatz zur primären Gewebekultur basieren klassische Zellkulturversuche in der Regel auf immortalisierten Zelllinien eines einzigen Zelltyps. Weiterhin kann das häufige Passagieren der Zelllinien im Laufe der Zeit zu signifikanten genetischen Veränderungen führen. So demonstrierte eine Studie beispielsweise die unterschiedliche Expression von MHC-II Molekülen auf frisch isolierten Typ II Pneumozyten und A549 Zellen [59]. Ein weiteres tragisches Beispiel für die begrenzte Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen ist eine klinische Studie der Phase 1 aus dem Jahr 2006, in welcher ein therapeutischer Antikörper erstmalig im Menschen erprobt werden sollte. Obwohl 500-fach niedriger dosiert als in den erfolgreichen Tierversuchen, kam es bei den Probanden zu einem lebensbedrohlichen Multiorganversagen [60]. Deshalb ist es von großer Bedeutung, Ergebnisse aus Zellkultur- und Tiermodellen nach Möglichkeit in humanen Proben zu verifizieren. Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde humanes Lungengewebe verwendet um ein *ex vivo* Infektionsmodell zu etablieren, welches die genauere Erforschung sowohl der Streptokokken- als auch der Influenza A Virusinfektion an lebendem Gewebe ermöglicht. Der große Vorteil dieses Modells liegt im Erhalt der komplexen dreidimensionalen Lungenstruktur. Dies erlaubt eine differenzierte Untersuchung der unterschiedlichen Zelltypen und deren Wechselwirkung im nativen Gewebeverband der Lunge. Außerdem gewährleistet das Modell bedingt durch die relativ kurze Kultivierungszeit eine sehr hohe genetische Authentizität der Zellen im Vergleich zu häufig passagierten Zellkulturen. Auch Alveolarmakrophagen befinden sich in diesen Gewebekulturen und können die inflammatorische

Antwort erheblich beeinflussen [61]. Weiterhin bietet dieses Modell die Möglichkeit Patientenproben aufgrund von spezifischen Merkmalen wie Vorerkrankungen, Rauchen, Alter oder Geschlecht zu gruppieren um so deren Einfluss auf die immunologische Antwort zu bestimmen. Nicht zuletzt können derartige Modelle dazu beitragen die Anzahl an ethisch umstrittenen Tierversuchen zu reduzieren. Wie alle Modelle besitzt auch dieses Einschränkungen. Das Gewebe liegt isoliert vor, wodurch zum einen keine Immunzellen mehr aus dem Blutkreislauf rekrutiert werden können und zum anderen ist die nutritive Ver- und Entsorgung stark eingeschränkt. Zudem ist die natürliche Sauerstoffzufuhr über die Atmung nicht mehr vorhanden und es erfolgt keine Ventilation der Alveolen und Perfusion der Kapillaren. Dadurch könnten Prozesse wie Apoptose oder Nekrose ausgelöst werden, die möglicherweise die Inflammationsantwort beeinflussen. Nicht publizierte Daten zeigen jedoch, dass es nach 24 stündiger Kultur nur zu einem geringfügigen Anstieg der Laktatdehydrogenase kommt, welcher ein Indikator für Zellschädigung ist. Außerdem konnte auf Proteinebene keine Aktivierung der für die Apoptose benötigten Effektorcaspasen 3 oder 6 nachgewiesen werden. Daher ist der Zelluntergang in diesem zeitlichen Rahmen unter den gewählten Bedingungen vermutlich von geringerer Relevanz. Weiterhin unterscheidet sich der natürliche Infektionsweg von dem des Modells. Die Erreger gelangen direkt ins Lungengewebe und umgehen damit den Weg von der Trachea bis zum alveolären Kompartiment. Diese Einschränkungen reduzieren andererseits die Komplexität des Modells, da die Immunantwort hier lediglich innerhalb der Gewebeprobe betrachtet wird und nicht als Teil des Gesamtorganismus. Die Aussage, die dieses Modell liefern kann, ist dadurch auf kleine Wissenseinheiten beschränkt, diese haben jedoch eine hohe analytische Aussagekraft. Auf diesem Wege kann die direkte Interaktion der Pathogene mit im Lungengewebe vorhandenen alveolären Epithelzellen, Endothelzellen oder Alveolarmakrophagen untersucht werden.

6.1 Einfluss von *S. pneumoniae* auf die Regulation der Cyclooxygenase-2

Im Streptokokken-Infektionsmodell zeigten Wachstumsversuche, dass sich der Erreger in der Lunge innerhalb von wenigen Stunden um mehrere logarithmische Stufen vermehrte. Die Infektion führte zu einer hohen Induktion der COX-2, während die COX-1 konstitutiv exprimiert war. Immunhistologische Untersuchungen demonstrierten eine durch *S. pneumoniae* induzierte COX-2 Expression in Alveolarmakrophagen sowie in Epithel- und Endothelzellen. Dieser Befund konnte in alveolären Epithelzellen in Lungenschnitten von Pneumoniepatienten verifiziert werden. Bei genauerer Untersuchung der Epithelzellen stellte sich heraus, dass ausschließlich Typ II Pneumozyten, nicht jedoch Typ I Pneumozyten, die COX-2 vermehrt exprimierten. Ein gleiches Expressionsschema zeigte sich auch bei einer Stimulation des Gewebes mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β . Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, welche die Induktion der COX-2 durch Streptokokken und/oder TNF- α /IL-1 β in Bronchialepithel- sowie glatten Muskelzellen beschreiben [22-24, 62]. Die exklusive Expression der COX-2 in Typ II Pneumozyten deckt sich mit einer Studie von Khan et al. die diesen Befund im Zusammenhang mit einer schweren Pneumonie beim Affen beschreibt [63]. Es befanden sich Erreger in Arealen, in denen keine COX-2 Induktion

detektierbar war. Umgekehrt existierten ebenfalls Areale mit induzierter COX-2 und keinen Erregern in der unmittelbaren Umgebung. Dies lässt darauf schließen, dass kein direkter Kontakt der Streptokokken mit den Zielzellen erforderlich ist, um die COX-2 Induktion auszulösen. Vielmehr scheinen sekretierte Metabolite, entweder der Lunge selbst oder des Erregers, zur COX-2 Induktion zu führen. Dafür spricht ebenfalls die COX-2 Induktion durch alleinige Stimulation des Gewebes mit Zytokinen.

Über die COX-2 und weitere Synthesen wie z.B. die Prostacyclin und Thromboxan Synthase können eine Reihe von Prostanoiden synthetisiert werden [51]. In infizierten Lungenproben stieg die Konzentration von PGE₂, 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂. Dieser Anstieg ließ sich durch selektive Inhibition der COX-2 unterdrücken. Eine Konzentrationszunahme weiterer Prostanoiden war nicht messbar. Wie bereits in anderen Studien beschrieben [64, 65], scheint PGE₂ eines der Hauptprodukte von humanen Lungenzellen zu sein, welches Einfluss auf die proinflammatorischen Eigenschaften von neutrophilen Granulozyten besitzt [66]. Hinweise aus Experimenten mit Bronchialepithelzellen indizieren, dass MAPK die Induktion der COX-2 vermitteln [23]. Im Streptokokken-Infektionsmodell kam es während der Infektion zur Aktivierung der p38 MAPK, wohingegen die ERK bereits vor der Infektion aktiviert waren. Die p38 MAPK Aktivierung wurde ebenfalls in einem *ex vivo* Streptokokken-Infektionsmodell von Xu et al. gezeigt [61]. Selektive Inhibition der Kinasen p38 und ERK im Lungengewebe unterdrückte die *S. pneumoniae* induzierte COX-2 Expression, sowie es bereits in Bronchialepithelzellen beschrieben wurde [23]. Im Unterschied zum Lungengewebe sind die ERK Kinasen nicht aktiviert in unbehandelten Bronchial – sowie Alveolarepithelzellen [22, 24]. Die ERK ist bereits direkt nach Entnahme des Gewebes aktiviert. Mögliche Ursache dafür könnte der durch den chirurgischen Eingriff ausgelöste Stress bzw. das weitere Zuschneiden des Gewebes sein. In einer anderen Studie konnte ebenfalls eine erhöhte ERK Aktivierung in Kontrollschnitten von humanem, intaktem Lungengewebe beobachtet werden, welche sich durch Stimulation jedoch weiter steigern ließ [67]. Interessanterweise reicht die alleinige Aktivität der ERK Kinasen nicht aus um die COX-2 zu induzieren.

In einigen Modellen wird sowohl ein positiver als auch ein negativer Feedback Loop für die COX-2 Expression beobachtet [50]. Im Lungengewebe konnte jedoch kein Feedback Loop festgestellt werden, da weder die Inhibition der COX-2 noch die direkte Stimulation mit PGE₂ einen Einfluss auf die COX-2 Expression hatte.

Die Wirkung von PGE₂ wird über vier EP Rezeptoren vermittelt [16]. Die Aktivierung des EP₁ Rezeptors kann zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium Konzentration führen, während die Aktivierung der EP₂ und EP₄ Rezeptoren zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration führt. Die EP₃ Rezeptor Aktivierung kann bedingt durch verschiedene Splice Varianten sowohl den Anstieg als auch eine Reduzierung der cAMP Konzentration auslösen [68]. Im hier verwendeten Lungengewebe wurde sowohl die Expression als auch die Funktion der Rezeptoren untersucht. Die

Infektion mit *S. pneumoniae* beeinflusst nicht die Expression der vier Rezeptoren auf mRNA Ebene. Im Gegensatz dazu wurde während einer *Moraxella catarrhalis* Infektion von Bronchialepithelzellen eine Hochregulation des EP₂ und des EP₄ Rezeptors beobachtet [24]. Darüber hinaus resultierte die Stimulation mit PGE₂ sowie die spezifische Aktivierung des EP₄ Rezeptors im Lungenmodell zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration. Diese Ergebnisse stimmen mit einer Studie überein, welche den Anstieg der cAMP Konzentration in der Bronchialepithelzelllinie Calu-3 nach Stimulation mit spezifischem EP₄ Rezeptoragonisten und PGE₂ demonstriert [69]. Dagegen zeigten Joy et al., dass die Applikation sowohl von PGE₂ als auch des EP₄ Rezeptoragonisten keine cAMP Erhöhung in Calu-3 Zellen bewirkt [70]. Diese unterschiedlichen Befunde sind möglicherweise auf ein anderes experimentelles Design zurückzuführen. Zum einen sind die Zellen in dieser Studie kürzer stimuliert worden, zum anderen wurde kein Phosphodiesterase Inhibitor verwendet, welcher einen schnellen cAMP Abbau verhindert und damit eine Detektion erleichtert.

Verschiedene Studien haben den Anstieg von Zytokinen nach Infektion mit *S. pneumoniae* *in vitro*, *in vivo* und *ex vivo* beschrieben [61, 71, 72]. Auch im humanen Lungengewebe führte die Infektion zum Anstieg von TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, PDGF, IL-10, IL-1ra, IL-15 und IL-17. Dahingegen war eine Konzentrationszunahme der Zytokine IL-6, IL-8 MIP-1 α und VEGF nicht messbar. Dies könnte durch zelltypspezifische Expression in Bronchialepithelzellen erklärt werden, welche in diesem Modell nicht vorhanden sind. Weiterhin könnte sich die Zytokinregulation in primärem Lungengewebe von der in immortalisierten Zelllinien grundsätzlich unterscheiden. Für PGE₂ sind *in vitro* verschiedene Wirkungen auf die Regulation von Zytokinen beschrieben worden. Sowohl die Induktion von IL-10 als auch die Inhibition von GM-CSF, TNF- α , IL-12 oder PDGF wurde dokumentiert [17-20, 73]. In Übereinstimmung mit diesen Studien resultierte die Hemmung der PGE₂ Synthese mittels COX-2 Inhibition im Lungengewebe zur Erhöhung der Konzentration von PDGF. Des Weiteren verursachte die COX-2 Inhibition einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg von TNF- α und GM-CSF. Da im menschlichen Lungengewebe ein Summensignal verschiedener Zelltypen bestimmt wird, ist es durchaus möglich, dass gegensätzliche Regulierungen Zytokinkonzentrationen egalalisieren. Mögliche, gegensätzliche zelltypspezifische Zytokinfreisetzungen können dadurch nicht detektiert werden. Weiterhin ist denkbar, dass PGE₂ hauptsächlich auf einwandernde Immunzellen wirkt, die im hier eingesetzten Modell nicht vorhanden sind.

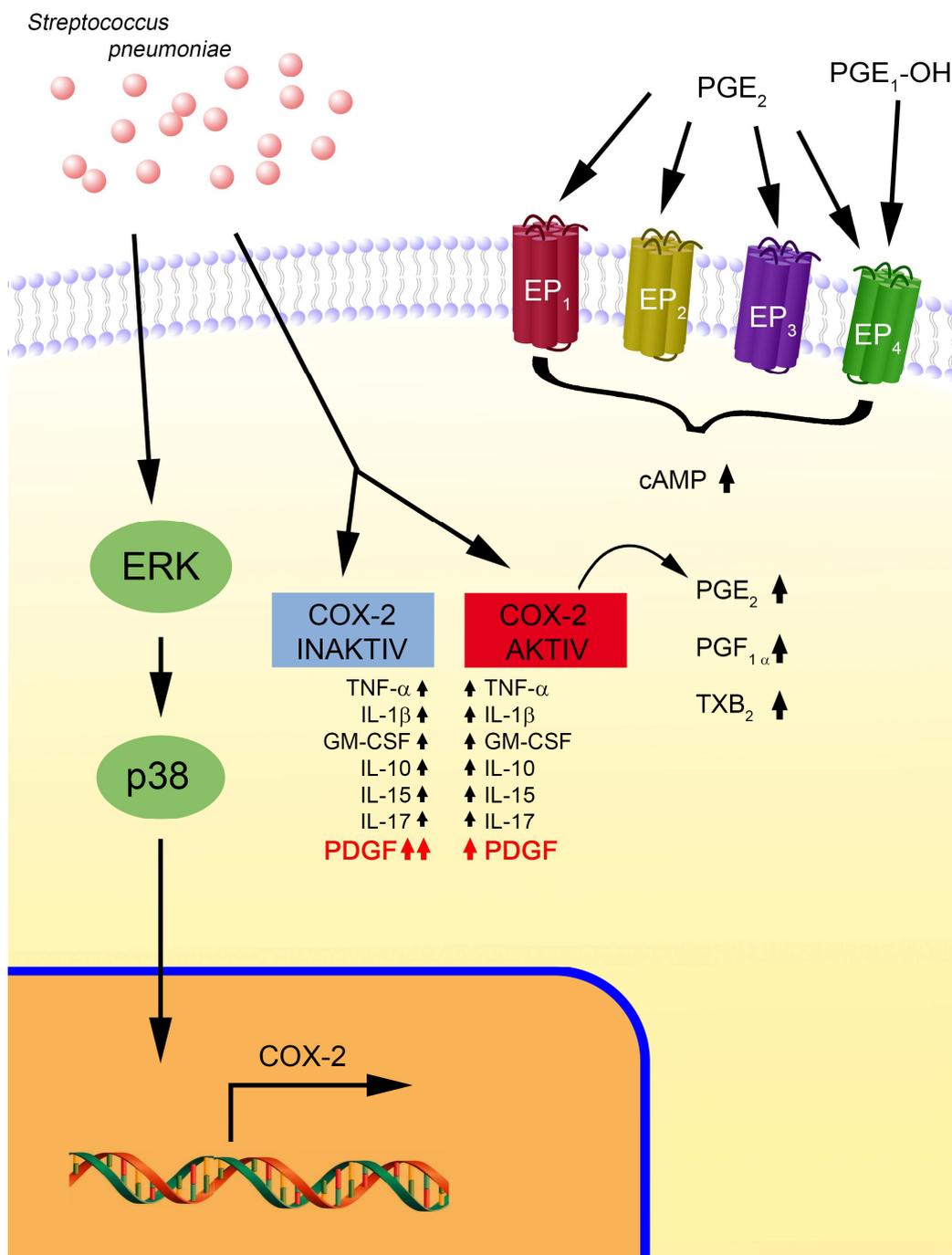


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ergebnisse. Die Infektion mit *S. pneumoniae* induziert im Lungengewebe die p38 und ERK MAPK abhängige Expression der Zyklooxygenase-2 (COX-2). Die Aktivität der COX-2 bewirkt einen Anstieg der Prostaganoide PGE₂, PGF_{1α} und TXB₂. Weiterhin führt die Infektion zu einem Anstieg von TNF-α, IL-1β, IL-15, GM-CSF, IL-17, IL-10, IL-1ra und PDGF. Die Inhibition der COX-2 während der Infektion verstärkt den Anstieg von PDGF zusätzlich. Des Weiteren resultiert die Stimulation mit PGE₂ sowie mit spezifischem EP₄ Rezeptor Agonist (PGE₁-OH) in einem Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration.

6.2 Influenza A Viren infizieren Typ II Pneumozyten

Ziel dieser Studie war es, das Infektionsverhalten verschiedener Influenzastämme in humanem, *ex vivo* kultiviertem Lungengewebe zu charakterisieren. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit sich aviäre, humane und porcine Viren in der Replikation, dem Zelltropismus und der induzierten Zytokinantwort unterscheiden. Möglicherweise lassen sich dadurch Rückschlüsse auf die Ursachen der unterschiedlichen Pathogenität der verschiedenen Influenzaviren im menschlichen Wirt ziehen. Die verwendeten aviären und porcinen Viren replizierten nur sehr schwach in humanem Lungengewebe, während das hoch-pathogene aviäre Thai/04(H5N1) Virus sowie das saisonale NC/99(H1N1) Virus und das pandemische Bay/09(H1N1pdm) Virus sehr gut replizierten. Das Replikationsvermögen korreliert möglicherweise mit der Infektionshäufigkeit und dem Krankheitsverlauf beim Menschen. Generell treten Infektionen mit den klassischen aviären oder porcinen Viren beim Menschen eher selten auf und verlaufen meist mild [25, 74]. Infektionen durch saisonale Viren sind hingegen relativ häufig [75]. So infizieren sich jedes Jahr bis zu 15 % der Bevölkerung mit den aktuell zirkulierenden Viren [76]. Infektionen durch das Thai/04(H5N1) Virus sind deutlich seltener dokumentiert, jedoch durch eine hohe Mortalität charakterisiert [77, 78]. Lange Zeit wurde spekuliert, dass die Rezeptorausstattung der Lunge ausschlaggebend für das unterschiedliche Wachstumsverhalten aviärer und humaner Viren im humanen Wirt ist. Aktuelle Studien konnten jedoch nicht nur Rezeptoren für aviäre und humane Influenzaviren in der Lunge nachweisen [30], sondern auch die Bindung aviärer Viren an humane Lungenepithelzellen [32, 79]. Demnach scheint es weitere Faktoren zu geben, welche die Pathogenität der verschiedenen Influenzastämme beeinflussen.

Weiterhin wurde postuliert, dass das aviäre hoch-pathogene H5N1 Virus bevorzugt Typ II Pneumozyten infiziert und darin der Grund der hohen Pathogenität des Virus liegen könnte [79]. Im Influenza A-Infektionsmodell konnten mittels Immunhistochemie aviäre und humane Rezeptoren sowohl auf Typ I als auch auf Typ II Pneumozyten detektiert werden, wodurch die Befunde der früheren Studien [30] bestätigt bzw. erweitert werden. Trotz der Expression beider Rezeptoren auf beiden Zelltypen infizierte keines der getesteten Viren Typ I, sondern ausschließlich Typ II Pneumozyten, was bereits für pandemischen und saisonalen Viren in humanem Lungengewebe beschrieben wurde [80]. Die Expression der Sialinsäurekonjugate auf der Zelloberfläche ist daher möglicherweise nicht die alleinige Voraussetzung für eine erfolgreiche Influenza A Virusinfektion. Über die Relevanz der Rezeptoren gibt es Studien mit unterschiedlichen Aussagen. Aufgrund der Bindung von Influenzaviren an Sialinsäuren [28] wurde bisher angenommen, dass die Sialinsäureexpression eine notwendige Voraussetzung für eine Influenza A Virusinfektion ist. Neuere Studien zeigen jedoch eine erfolgreiche Infektion respiratorischer Epithelzellen, deren Sialinsäuren durch Neuraminidasebehandlung entfernt wurden [29, 81]. Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Studien daraufhin, dass neben der Sialinsäureexpression weitere Faktoren für die erfolgreiche Influenza A Vireninfektion eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wird das Vorhandensein potentieller weiterer Rezeptoren diskutiert [81]. So gibt es Hinweise, dass zumindest die

endozytotische Aufnahme der Influenzaviren vom epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) abhängig ist [82]. Immunhistologische Untersuchungen an humanem Lungengewebe zeigten die EGFR Expression in Typ II nicht jedoch in Typ I Pneumozyten [83]. Es könnte daher spekuliert werden, dass Typ I Pneumozyten aus diesem Grund nicht infiziert werden. Diese Hypothese bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. So könnte beispielsweise der EGFR vor der Infektion durch spezifische Antagonisten im Lungengewebe blockiert werden, um anschließend die Auswirkung auf die Typ II Pneumozyten Infektion zu untersuchen.

Da alle getesteten Viren Typ II Pneumozyten infizieren kann ihre variierende Virulenz nicht durch einen unterschiedlichen Zelltropismus im peripheren Lungengewebe erklärt werden. Den Typ II Pneumozyten kommt dementsprechend eine entscheidende Rolle während der Influenza A Infektion im tiefen Respirationstrakt zu.

Neben den Typ II Pneumozyten infizierten alle getesteten Influenzastämme in deutlich geringerem Maße auch Alveolarmakrophagen. Die positive Alveolarmakrophagenfärbung könnte einerseits auf die Replikation der Viren, andererseits auf infizierte, phagozytierte Zellen zurückzuführen sein. In anderen Studien ist die Infektion von isolierten Alveolarmakrophagen durch humane und aviäre Viren beschrieben [84-86]. Es kann daher vermutet werden, dass es auch in diesem Infektionsmodell zu einer Infektion von Alveolarmakrophagen kommt. Aufgrund der prozentual geringen Anzahl an infizierten Makrophagen spielen diese bei der Virusreplikation vermutlich eher eine untergeordnete Rolle. Dafür könnten sie einen entscheidenden Beitrag zur Zytokinproduktion leisten, wie bereits in einem anderen Lungeninfektionsmodell mit *S. pneumoniae* indiziert [61]. Die saisonalen Viren vom Subtyp H3N2, H1N1 sowie das pandemische Bay/09(H1N1pdm) Virus induzierten lediglich eine schwache Zytokinbildung. Auch in Makrophagen und alveolären Epithelzellen führt die Infektion mit dem pandemischen Bay/09(H1N1pdm) Virus nur zu einer gering ausgeprägten Zytokinantwort [35, 87]. Sollte das Virus im Menschen eine ähnlich schwache Immunreaktion auslösen, könnte dies eine Erklärung für dessen schnelle Verbreitung sein. Obwohl sowohl das saisonale Pan/99(H3N2) Virus als auch das hoch pathogene Thai/04(H5N1) Virus sich im Lungengewebe ähnlich gut vermehren, verursacht das Thai/04(H5N1) Virus eine deutlich stärker ausgeprägte Zytokinproduktion. Außerdem löst das niedrig-pathogene aviäre Dk/Alb(H12N5) Virus eine starke Zytokinantwort aus, obwohl dessen Vermehrung in der Lunge stark eingeschränkt ist. In dendritischen Zellen führt die Bindung an den aviären Rezeptor selbst durch UV-inaktivierte Viren bereits zur Induktion verschiedener Zytokine [88]. Dies könnte eine starke Zytokinantwort bei gleichzeitig schlechtem Wachstum erklären. Das klassische porzine Virus vermehrt sich schlecht und induziert kaum Zytokine. Insgesamt implizieren diese Daten, dass sowohl der Zelltropismus als auch die Zytokinantwort nicht die einzigen Kriterien sein können, welche das Wachstumsverhalten bzw. die Pathogenität der Viren beeinflussen. Vielmehr müssen weitere Faktoren in Bezug auf die Wechselwirkungen zwischen Viren und Wirtszellen berücksichtigt werden, um deren komplexe Interaktion besser verstehen zu können.

6.3 *S. pneumoniae* induziert antimikrobielle Peptide in Bronchialepithelzellen

Antimikrobielle Peptide spielen eine wichtige Rolle in der frühen Abwehr von Pathogenen, aber auch in der Regulation von anti- und proinflammatorischen Zytokinen [89]. Die antimikrobielle Wirkung von hBD-2 und 3 gegenüber dem bekapselten Stamm D39 ist stärker ausgeprägt als gegenüber der unbekapselten Variante R6X. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die antimikrobiellen Peptide von der Kapsel gebunden werden, akkumulieren und eine höhere lokale Konzentration erreichen, ähnlich wie es schon bei α -Defensinen beobachtet wurde [90]. Außerdem kann die fehlende Kapsel eine Änderung der Nettooberflächenladung bewirken. Dies könnte sich auf die Bindung der positiv geladenen antimikrobiellen Peptide auswirken. Die Infektion primärer Epithelzellen und der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B mit Streptokokken führte zur Induktion von hBD-2 und 3. In einigen klinischen Studien konnte während verschiedener bakterieller Pneumonien ein Anstieg dieser antibakteriellen Peptide im Plasma oder der bronchoalveolären Lavage beobachtet werden [91, 92]. Die in den genannten Studien sowie in dieser Studie gemessenen Peptid-Konzentrationen waren sehr gering. Um eine antimikrobielle Wirkung gegen *S. pneumoniae* zu erzielen ist eine deutlich höhere Konzentration erforderlich. Es ist daher davon auszugehen, dass die antimikrobiellen Peptide eher über bereits beschriebene regulatorische Eigenschaften wirken [42]. Trotzdem kann es in den Atemwegen durch Akkumulation lokal zu höheren Konzentrationen kommen bzw. die Peptide können auch synergistisch mit anderen AMPs direkt auf Pathogene wirken.

Pattern Recognition Rezeptoren erkennen als Bestandteil der angeborenen Immunität verschiedene, hochkonservierte Molekülstrukturen von Bakterien wie z.B. Zellwandfragmente oder andere Virulenzfaktoren [93]. Durch Ausschaltung des TLR-2 konnte die Streptokokken induzierte Bildung von hBD-2 und 3 vollständig unterbunden werden. Dieser Befund deckt sich mit denen anderer Studien, welche ebenfalls die TLR-2 abhängige Induktion von hBD-2 in verschiedenen Epithelzelllinien beschreiben [94-96].

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des TLR-2 zur Aktivierung der MAPK und der PI3K führt [53]. Die Streptokokkeninfektion führte in BEAS-2B Zellen zur Aktivierung der MAPK ERK, p38 und JNK sowie der AKT Kinase, die über die PI3K aktiviert wird. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein [23] und die Aktivierung der p38 MAPK konnte ebenfalls in der COX-2 Studie im Lysat infizierter Gewebeproben gezeigt werden. Außerdem zeigte sich, dass ausschließlich die Inhibition der PI3K die Bildung von hBD-2 unterdrückt. Die Beteiligung der PI3K wurde bereits beschrieben, im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie war die Aktivität der p38 und JNK MAPK allerdings ebenfalls essenziell für die Synthese von hBD-2 [54]. Die Inhibition von JNK unterdrückte die Bildung von hBD-3, was darauf schließen lässt, dass sich die Signalwege, die zur Bildung von hBD-2 und 3 führen, unterscheiden. Die Induktion inflammatorischer Gene während der Streptokokkeninfektion wird wesentlich über die Transkriptionsfaktoren NF- κ b und AP-1 vermittelt [72, 97]. Ihre wichtige Rolle in der Regulation der hBD-2 und 3 Expression wurde bereits in mehreren Studien beschrieben [55-57]. Diese Beobachtung wird in dieser Studie bestätigt, da eine Rekrutierung

von NF- κ B an den hBD-2 Promoter detektiert werden konnte und die Inhibition von NF- κ B die Streptokokken induzierte hBD-2 Bildung minderte. Weiterhin wurde eine Rekrutierung von AP-1 an den hBD-3 Promotor detektiert, was eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Streptokokken induzierten hBD-3 Bildung vermuten lässt.

7 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend betrachtet konnten in dieser experimentellen Arbeit zwei klinisch bedeutende Infektionsmodelle erfolgreich etabliert werden. In Bezug auf die Infektionssituation im Menschen könnten diese Modelle einen wichtigen Beitrag zur Klärung grundlegender Fragen der angeborenen Immunantwort und des Erregerverhaltens leisten. Darüber hinaus stellen die Lungeninfektionsmodelle eine wichtige Ergänzung zu Zellkultur- und Tierversuchen dar.

Sekundäre Streptokokkeninfektionen nach einer vorausgegangenen Influenza A Virusinfektion stellen ein erhebliches klinisches Problem dar und führen zu schweren Komplikationen der Pneumonie [4, 5]. Die erfolgreiche Etablierung der Modelle ermöglicht nun eine Studie, deren Gegenstand es sein wird beide Modelle zu kombinieren um die konsekutive Infektion mit Influenzaviren und Streptokokken genauer zu untersuchen.

Die Regulation und Wirkung der antimikrobiellen Peptide die zunächst in Zellkulturversuchen gezeigt werden konnte, sollte nun auch im Streptokokken-Lungeninfektionsmodell validiert werden. Sollte sich dabei herausstellen, dass die antimikrobiellen Peptide das Erregerwachstum oder die inflammatorische Antwort beeinflussen können, könnten sie in Zukunft einen nützlichen Beitrag zur Behandlung der bakteriellen Pneumonie leisten.

8 Referenzen

1. Finch R. Community-acquired pneumonia: the evolving challenge. *Clin Microbiol Infect* 2001;7 Suppl 3:30-8.
2. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. *Thorax* 2012;67:71-9.
3. Huijskens EG, van Erkel AJ, Palmen FM, Buiting AG, Kluytmans JA, Rossen JW. Viral and bacterial aetiology of community-acquired pneumonia in adults. *Influenza Other Respi Viruses* 2012.
4. Grijalva CG, Griffin MR. Unveiling the burden of influenza-associated pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2012;205:355-7.
5. McCullers JA. Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:571-82.
6. Said MA, Johnson HL, Nonyane BA, Deloria-Knoll M, KL OB. Estimating the Burden of Pneumococcal Pneumonia among Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Techniques. *PLoS One* 2013;8:e60273.
7. Nair H, Brooks WA, Katz M, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2011;378:1917-30.
8. Whitney CG, Pilishvili T, Farley MM, et al. Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* 2006;368:1495-502.
9. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* 2007;25:6852-62.
10. Gold HS, Moellering RC, Jr. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996;335:1445-53.
11. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000;343:1917-24.
12. Thorlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis* 2011;11:134.
13. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L387-98.
14. Hartung T. Food for thought... on cell culture. *Altex* 2007;24:143-52.
15. Hartung T. Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism Relat Disord* 2008;14 Suppl 2:S81-3.
16. Vancheri C, Mastruzzo C, Sortino MA, Crimi N. The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE2. *Trends Immunol* 2004;25:40-6.
17. Boyle JE, Lindroos PM, Rice AB, Zhang L, Zeldin DC, Bonner JC. Prostaglandin-E2 counteracts interleukin-1beta-stimulated upregulation of platelet-derived growth factor alpha-receptor on rat pulmonary myofibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;20:433-40.
18. Lazzeri N, Belvisi MG, Patel HJ, Yacoub MH, Chung KF, Mitchell JA. Effects of prostaglandin E2 and cAMP elevating drugs on GM-CSF release by cultured human airway smooth muscle cells. Relevance to asthma therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:44-48.
19. Ratcliffe MJ, Walding A, Shelton PA, Flaherty A, Dougall IG. Activation of E-prostanoid4 and E-prostanoid2 receptors inhibits TNF-alpha release from human alveolar macrophages. *Eur Respir J* 2007;29:986-94.
20. Vancheri C, Mastruzzo C, Tomaselli V, et al. Normal human lung fibroblasts differently modulate interleukin-10 and interleukin-12 production by monocytes:

- implications for an altered immune response in pulmonary chronic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:592-9.
21. Smith WL, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001;107:1491-5.
 22. N'Guessan PD, Etouem MO, Schmeck B, et al. Legionella pneumophila-induced PKC α -, MAPK-, and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L267-77.
 23. N'Guessan PD, Hippenstiel S, Etouem MO, et al. Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L1131-8.
 24. N'Guessan PD, Temmesfeld-Wollbruck B, Zahlten J, et al. Moraxella catarrhalis induces ERK- and NF-kappaB-dependent COX-2 and prostaglandin E2 in lung epithelium. *Eur Respir J* 2007;30:443-51.
 25. Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch Virol* 1991;119:37-42.
 26. Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe* 2010;7:440-51.
 27. Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:243-67.
 28. Rogers GN, Paulson JC. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* 1983;127:361-73.
 29. Thompson CI, Barclay WS, Zambon MC, Pickles RJ. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. *J Virol* 2006;80:8060-8.
 30. Shinya K, Ebina M, Yamada S, Ono M, Kasai N, Kawakami Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 2006;440:435-6.
 31. Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect* 2004;6:929-36.
 32. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *Am J Pathol* 2007;171:1215-23.
 33. Lam WY, Yeung AC, Chu IM, Chan PK. Profiles of cytokine and chemokine gene expression in human pulmonary epithelial cells induced by human and avian influenza viruses. *Virol J* 2010;7:344.
 34. Matsukura S, Kokubu F, Noda H, Tokunaga H, Adachi M. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:1080-7.
 35. Woo PC, Tung ET, Chan KH, Lau CC, Lau SK, Yuen KY. Cytokine profiles induced by the novel swine-origin influenza A/H1N1 virus: implications for treatment strategies. *J Infect Dis* 2010;201:346-53.
 36. De Smet K, Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 2005;27:1337-47.
 37. Singh PK, Jia HP, Wiles K, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14961-6.
 38. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001;276:5707-13.
 39. Yanagi S, Ashitani J, Ishimoto H, et al. Isolation of human beta-defensin-4 in lung tissue and its increase in lower respiratory tract infection. *Respir Res* 2005;6:130.

40. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007;127:594-604.
41. van Wetering S, Mannesse-Lazeroms SP, van Sterkenburg MA, Hiemstra PS. Neutrophil defensins stimulate the release of cytokines by airway epithelial cells: modulation by dexamethasone. *Inflamm Res* 2002;51:8-15.
42. Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003;62 Suppl 2:ii17-21.
43. Zielecki F, Semmler I, Kalthoff D, et al. Virulence determinants of avian H5N1 influenza A virus in mammalian and avian hosts: role of the C-terminal ESEV motif in the viral NS1 protein. *J Virol* 2010;84:10708-18.
44. Schmeck B, Gross R, N'Guessan PD, et al. Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect Immun* 2004;72:4940-7.
45. Krull M, Kramp J, Petrov T, et al. Differences in cell activation by Chlamydomphila pneumoniae and Chlamydia trachomatis infection in human endothelial cells. *Infect Immun* 2004;72:6615-21.
46. Gomolka B, Siegert E, Blossey K, Schunck WH, Rothe M, Weylandt KH. Analysis of omega-3 and omega-6 fatty acid-derived lipid metabolite formation in human and mouse blood samples. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011;94:81-7.
47. Santel A, Aleku M, Keil O, et al. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther* 2006;13:1222-34.
48. Schmeck B, Huber S, Moog K, et al. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L730-L37.
49. Schmeck B, Zahlten J, Moog K, et al. Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem* 2004;279:53241-7.
50. Vichai V, Suyarnsesthakorn C, Pittayakhajonwut D, Sriklung K, Kirtikara K. Positive feedback regulation of COX-2 expression by prostaglandin metabolites. *Inflamm Res* 2005;54:163-72.
51. Park GY, Christman JW. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L797-805.
52. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:986-1000.
53. Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1617-23.
54. Jang BC, Lim KJ, Paik JH, et al. Up-regulation of human beta-defensin 2 by interleukin-1beta in A549 cells: involvement of PI3K, PKC, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:1026-33.
55. Jang BC, Lim KJ, Suh MH, Park JG, Suh SI. Dexamethasone suppresses interleukin-1beta-induced human beta-defensin 2 mRNA expression: involvement of p38 MAPK, JNK, MKP-1, and NF-kappaB transcriptional factor in A549 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;51:171-84.
56. McDermott AM, Redfern RL, Zhang B, Pei Y, Huang L, Proske RJ. Defensin expression by the cornea: multiple signalling pathways mediate IL-1beta stimulation of hBD-2 expression by human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1859-65.
57. Shao ZJ, Zheng XW, Feng T, et al. Andrographolide exerted its antimicrobial effects by upregulation of human beta-defensin-2 induced through p38 MAPK and NF-

- kappaB pathway in human lung epithelial cells. *Can J Physiol Pharmacol* 2012;90:647-53.
58. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-6.
 59. Corbiere V, Dirix V, Norrenberg S, Cappello M, Rimmelink M, Mascart F. Phenotypic characteristics of human type II alveolar epithelial cells suitable for antigen presentation to T lymphocytes. *Respir Res* 2011;12:15.
 60. Attarwala H. TGN1412: From Discovery to Disaster. *J Young Pharm* 2010;2:332-6.
 61. Xu F, Droemann D, Rupp J, et al. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:522-9.
 62. Pascual RM, Billington CK, Hall IP, et al. Mechanisms of cytokine effects on G protein-coupled receptor-mediated signaling in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1425-35.
 63. Khan KN, Stanfield K, Trajkovic D, Harris RK. Cyclooxygenase-2 expression in inflammatory lung lesions of nonhuman primates. *Vet Pathol* 2000;37:512-6.
 64. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 1994;113:1008-14.
 65. Belvisi MG, Saunders MA, Haddad el B, et al. Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br J Pharmacol* 1997;120:910-6.
 66. Klockmann MT, Jahn HU, Hippenstiel S, Kramer HJ, Suttrop N. Interaction of human neutrophils with airway epithelial cells: reduction of leukotriene B4 generation by epithelial cell derived prostaglandin E2. *J Cell Physiol* 1998;175:268-75.
 67. Chakrabarty K, Wu W, Booth JL, et al. Human lung innate immune response to *Bacillus anthracis* spore infection. *Infect Immun* 2007;75:3729-38.
 68. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999;79:1193-226.
 69. Clayton A, Holland E, Pang L, Knox A. Interleukin-1beta differentially regulates beta2 adrenoceptor and prostaglandin E2-mediated cAMP accumulation and chloride efflux from Calu-3 bronchial epithelial cells. Role of receptor changes, adenylyl cyclase, cyclo-oxygenase 2, and protein kinase A. *J Biol Chem* 2005;280:23451-63.
 70. Joy AP, Cowley EA. 8-iso-PGE2 stimulates anion efflux from airway epithelial cells via the EP4 prostanoid receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38:143-52.
 71. Hocke AC, Lampe MP, Witzenrath M, et al. Cell-specific interleukin-15 and interleukin-15 receptor subunit expression and regulation in pneumococcal pneumonia--comparison to chlamydial lung infection. *Cytokine* 2007;38:61-73.
 72. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, et al. *Streptococcus pneumoniae* induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 2006;7:98.
 73. Fennekohl A, Sugimoto Y, Segi E, Maruyama T, Ichikawa A, Puschel GP. Contribution of the two Gs-coupled PGE2-receptors EP2-receptor and EP4-receptor to the inhibition by PGE2 of the LPS-induced TNFalpha-formation in Kupffer cells from EP2-or EP4-receptor-deficient mice. Pivotal role for the EP4-receptor in wild type Kupffer cells. *J Hepatol* 2002;36:328-34.
 74. Kimura K, Adlakha A, Simon PM. Fatal case of swine influenza virus in an immunocompetent host. *Mayo Clin Proc* 1998;73:243-5.
 75. Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, et al. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. *Vaccine* 2007;25:5086-96.

76. WHO. Influenza factsheet N°211. March 2003; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/>
77. Daniels P, Wiyono A, Sawitri E, Poermadjaja B, Sims LD. H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza in Indonesia: Retrospective Considerations. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012.
78. Wang TT, Parides MK, Palese P. Seroevidence for H5N1 influenza infections in humans: meta-analysis. *Science* 2012;335:1463.
79. van Riel D, Munster VJ, de Wit E, et al. H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* 2006;312:399.
80. Zhang J, Zhang Z, Fan X, et al. 2009 pandemic H1N1 influenza virus replicates in human lung tissues. *J Infect Dis* 2010;201:1522-6.
81. Oshansky CM, Pickens JA, Bradley KC, et al. Avian influenza viruses infect primary human bronchial epithelial cells unconstrained by sialic acid alpha2,3 residues. *PLoS One* 2011;6:e21183.
82. Eierhoff T, Hrincius ER, Rescher U, Ludwig S, Ehrhardt C. The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001099.
83. Aida S, Tamai S, Sekiguchi S, Shimizu N. Distribution of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human lung: immunohistochemical and immunoelectron-microscopic studies. *Respiration* 1994;61:161-6.
84. Wang J, Nikrad MP, Travanty EA, et al. Innate immune response of human alveolar macrophages during influenza A infection. *PLoS One* 2012;7:e29879.
85. Short KR, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. The fate of influenza A virus after infection of human macrophages and dendritic cells. *J Gen Virol* 2012.
86. Yu WC, Chan RW, Wang J, et al. Viral replication and innate host responses in primary human alveolar epithelial cells and alveolar macrophages infected with influenza H5N1 and H1N1 viruses. *J Virol* 2011;85:6844-55.
87. Mukherjee S, Vipat VC, Mishra AC, Pawar SD, Chakrabarti AK. Pandemic (H1N1) 2009 influenza virus induces weaker host immune responses in vitro: a possible mechanism of high transmissibility. *Virol J* 2011;8:140.
88. Ramos I, Bernal-Rubio D, Durham N, et al. Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J Virol* 2011;85:4421-31.
89. Scott MG, Hancock RE. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. *Crit Rev Immunol* 2000;20:407-31.
90. Beiter K, Wartha F, Hurwitz R, Normark S, Zychlinsky A, Henriques-Normark B. The capsule sensitizes *Streptococcus pneumoniae* to alpha-defensin human neutrophil proteins 1 to 3. *Infect Immun* 2008;76:3710-6.
91. Ihi T, Nakazato M, Mukae H, Matsukura S. Elevated concentrations of human neutrophil peptides in plasma, blood, and body fluids from patients with infections. *Clin Infect Dis* 1997;25:1134-40.
92. Ishimoto H, Mukae H, Date Y, et al. Identification of hBD-3 in respiratory tract and serum: the increase in pneumonia. *Eur Respir J* 2006;27:253-60.
93. Kovach MA, Standiford TJ. Toll like receptors in diseases of the lung. *Int Immunopharmacol* 2011;11:1399-406.
94. Birchler T, Seibl R, Buchner K, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol* 2001;31:3131-7.
95. Kumar A, Zhang J, Yu FS. Toll-like receptor 2-mediated expression of beta-defensin-2 in human corneal epithelial cells. *Microbes Infect* 2006;8:380-9.
96. Vora P, Youdim A, Thomas LS, et al. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2004;173:5398-405.

-
97. Amory-Rivier CF, Mohler J, Bedos JP, et al. Nuclear factor-kappaB activation in mouse lung lavage cells in response to *Streptococcus pneumoniae* pulmonary infection. *Crit Care Med* 2000;28:3249-56.

9 Anteilserklärung

Kolja Szymanski hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

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, Droemann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, and Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. Eur Respir J 2012;40:1458-67

Anteil: 70 %

Beitrag im Einzelnen:

- Für die Etablierung des Modells wurde tumorfreies Lungengewebe nach erfolgreicher Resektion unverzüglich vom Pathologen abgeholt und für die Infektion vorbereitet.
- Durchführung der Keimwachstumsversuche, sowie aller Western Blot Analysen
- Immunhistologische Färbungen sowie deren Auswertung
- Durchführung und Auswertung der PGE₂ ELISA, sowie Anfertigung der Proben zur Prostanoid- und Zytokinbestimmung
- Anfertigung des Manuskripts unter Anleitung

Publikation 2:

Weinheimer VK, Becher A, Toennies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rueckert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, and Hocke AC. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. J Infect Dis 2012;206:1685-94.

Anteil : 10 %

Beitrag im Einzelnen:

- Für die Etablierung des Modells wurde tumorfreies Lungengewebe nach erfolgreicher Resektion unverzüglich vom Pathologen abgeholt und für die Infektion vorbereitet.
- Mithilfe bei der Etablierung der immunhistologischen Färbungen von Lungengewebe

Publikation 3:

Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N and N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. *Exp Lung Res* 2012;38:100-10.

Anteil: 10 %

Beitrag im Einzelnen:

- Untersuchungen zur Aktivierung der MAPK JNK, p38 und ERK in BEAS-2B Zellen durch *S. pneumoniae*. Dies beinhaltete die Kultur von BEAS-2B und *S. pneumoniae* sowie die Infektion von BEAS-2B mit *S. pneumoniae*. Des Weiteren wurden BEAS-2B Zelllysate hergestellt und Western Blots für alle MAPK durchgeführt, ausgewertet und interpretiert.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

10.1 Publikation 1 *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue

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, Droemann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, and Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. Eur Respir J 2012;40:1458-67

10.2 Publikation 2 Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung

Weinheimer VK, Becher A, Toennies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rueckert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, and Hocke AC. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. *J Infect Dis* 2012;206:1685-94.

10.3 Publikation 3 *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium

Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N and N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. Exp Lung Res 2012;38:100-10.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Publikationsliste

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, Droemann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, and Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. Eur Respir J 2012;40:1458-67

Impact Factor: 5,895

Weinheimer VK, Becher A, Toennies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rueckert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, and Hocke AC. Influenza A viruses target type II pneumocytes in the human lung. J Infect Dis 2012;206:1685-94.

Impact Factor: 6,410

Scharf S, Zahlten J, Szymanski K, Hippenstiel S, Suttorp N and N'Guessan PD. *Streptococcus pneumoniae* induces human beta-defensin-2 and -3 in human lung epithelium. Exp Lung Res 2012;38:100-10.

Impact Factor: 1,220

13 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Kolja Szymanski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Streptococcus pneumoniae* und Influenza A Virus induzierte Immunantwort in kultiviertem, humanem Lungengewebe und Zellkulturen“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Zunächst möchte Ich mich bei Professor Suttorp für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie anzufertigen.

Professor Stefan Hippenstiel und Dr. Andreas Hocke danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die exzellente Betreuung während der Promotion.

Bei allen anderen Kollegen des Labors bedanke ich mich für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre, welche ich insbesondere in schwierigen Zeiten zu schätzen wusste.

Außerdem möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für die fortlaufende Unterstützung während der Promotion bedanken.