

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

DISSERTATION

**Einfluss des Lipopeptides MALP-2
auf den Verlauf der sekundären Pneumokokkenpneumonie
nach Influenzavirusinfektion im murinen Modell**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Peter Radünzel

aus Trier

Datum der Promotion: 16.06.2018

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Abstract	6
1 Einleitung	8
1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie.....	8
1.1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	9
1.2 Influenza	12
1.3 Das angeborene Immunsystem der Lunge.....	15
1.3.1 Zytokine.....	17
1.3.2 Interaktion von Immunsystem, Influenzavirus und <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
1.4 Die lokale TLR-vermittelte Immunstimulation als Therapie der experimentellen bakteriellen Pneumonie	20
1.5 MALP-2.....	21
1.6 Ziel der Arbeit	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Studiendesign.....	27
2.2 Versuchstiere	28
2.3 Infektion mit Influenzavirus	28
2.4 Klinische Überwachung	29
2.5 MALP-2-Applikation	31
2.5.1 Vorbereitung.....	31
2.5.2 Applikation des MALP-2	31
2.6 Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
2.6.1 Bakterienanzucht	32
2.6.2 Infektion	33
2.7 Präparation der Tiere und Probenentnahme	33

2.7.1	Vorbereitung.....	33
2.7.2	Präparation.....	33
2.8	Differenzierung der Leukozyten.....	34
2.8.1	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in der BALF.....	34
2.8.2	Differenzierung der Leukozyten in der BALF.....	35
2.8.3	Differenzierung der Leukozyten im Blut.....	35
2.9	Zytokinquantifizierung in BALF und Plasma mittels Bio-Plex-Assay.....	36
2.10	Bakterienlast in der Lunge und im Blut.....	37
2.11	Bestimmung der Viruslast in der Lunge mittels Virus-Plaque-Assay.....	37
2.11.1	Vorbereitung.....	37
2.11.2	Virus-Plaque-Assay.....	38
2.12	Histologie.....	39
2.13	Statistik.....	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Modulation der Immunantwort durch MALP-2 nach Influenzavirusinfektion.....	40
3.1.1	MALP-2 führte zu vermehrtem Einstrom von Leukozyten in die Influenzavirus- infizierte murine Lunge.....	40
3.1.2	MALP-2 führte zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren in der Influenzavirus-infizierten murinen Lunge.....	41
3.1.3	Die Wirkung von MALP-2 auf die Entzündungsreaktion blieb lokal begrenzt.....	43
3.1.4	MALP-2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf der Influenzavirusinfektion.....	45
3.2	Modulation der Immunantwort durch MALP-2 bei sekundärer <i>S. pneumoniae</i> - Pneumonie.....	47
3.2.1	MALP-2 führte zu keinem zusätzlichen Einstrom von Leukozyten bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie.....	47
3.2.2	MALP-2 führte nicht zu einer Modulation der Zytokinproduktion in der Lunge bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie.....	49
3.2.3	MALP-2 führte nicht zu einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion bei der sekundären Pneumokokkenpneumonie.....	51

3.2.4	MALP-2 modifizierte die Verteilung von Granulozyten in der Influenzavirus-induzierten bronchointerstitiellen Pneumonie.....	53
3.2.5	MALP-2 hatte keinen Einfluss auf die Viruslast.....	55
3.2.6	MALP-2 reduzierte die Bakterienlast bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie....	56
3.3	Pulmonale MALP-2-Stimulation verbesserte die approximative Überlebensrate der Maus bei sekundärer <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie	58
4	Diskussion	61
4.1	MALP-2 stimuliert eine lokale angeborene Immunreaktion in der Influenzavirus-vorgeschädigten Lunge.....	61
4.2	Die pulmonale Entzündungsreaktion der sekundären Pneumokokkeninfektion wird durch MALP-2 nicht verstärkt.....	64
4.3	MALP-2 verbessert die bakterielle Erregerelimination in der Influenzavirus-vorgeschädigten Lunge.....	66
4.4	MALP-2 erhöht die Überlebensrate bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie	68
4.5	Ausblick.....	70
5	Literaturverzeichnis.....	72
6	Anhang	85
6.1	Materialien.....	85
6.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	85
6.1.2	Geräte und Apparaturen	86
6.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	87
6.2	Abkürzungen	89
6.3	Abbildungsverzeichnis	92
6.4	Tabellenverzeichnis	93
	Eidesstattliche Versicherung.....	94
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	95
	Lebenslauf.....	96
	Publikationsliste	97
	Danksagung.....	98

Zusammenfassung

Einfluss des Lipopeptides MALP-2 auf den Verlauf der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach Influenzavirusinfektion im murinen Modell

Sekundäre bakterielle Infektionen stellen eine bedeutende Komplikation der Infektion mit dem Influenza-A-Virus dar. Die Influenzavirusinfektion führt zu einer Schwächung der angeborenen Immunabwehr der Lunge und damit zu einer verringerten pulmonalen Erregerelimination. Häufigster Erreger der sekundären Pneumonie bei Influenza ist das Bakterium *Streptococcus pneumoniae*. Trotz moderner antibiotischer Therapie ist die Letalität der sekundären Pneumonie bei Influenza beträchtlich. Die lokale Stimulation des angeborenen Immunsystems der Lunge stellt eine neuartige Therapiestrategie dar, die auf die Aktivierung vorhandener Abwehrmechanismen des Organismus abzielt. *Toll-like* Rezeptoren (TLR) erkennen bestimmte, hochkonservierte Bestandteile von Pathogenen und führen zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Das in dieser Arbeit verwendete Lipopeptid *macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa* (MALP-2) ist ein spezifischer Agonist des TLR-2/6-Rezeptordimers.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirksamkeit einer lokalen Stimulation der pulmonalen Immunabwehr mit MALP-2 in der Prävention der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach pulmonaler Vorschädigung durch Influenzavirusinfektion. Zur Analyse der Auswirkungen von MALP-2 auf eine vorbestehende Influenzavirusinfektion wurden weibliche C57BL/6 Mäuse transnasal mit dem Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 infiziert und 5 d später intratracheal mit MALP-2 behandelt. Die Applikation des MALP-2 induzierte eine Rekrutierung von Leukozyten in die Influenzavirus-infizierte Lunge mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Die Auswirkungen der MALP-2-Stimulation blieben dabei auf die Lunge beschränkt und ohne Einfluss auf den Verlauf der viralen Infektion.

Um den Effekt der MALP-2-Stimulation auf die sekundäre Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen wurden Influenzavirus-infizierte Tiere mit *S. pneumoniae* transnasal infiziert. Durch die sekundäre bakterielle Infektion wandelte sich das histologische Bild der Virus-bedingten bronchointerstitiellen Pneumonie zu einer eitrigen Bronchopneumonie. Die pulmonale MALP-2 Behandlung der Influenzavirus-infizierten Tiere 24 h vor der *S. pneumoniae*-Infektion reduzierte die bakterielle Erregerlast in der Lunge und verbesserte die Überlebensrate bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie. Die immunstimulatorische Behandlung mit MALP-2 führte jedoch

nicht zu quantitativen Veränderungen in der Zytokinsekretion oder der Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum während der sekundären Pneumokokkenpneumonie. Es kam auch nicht zu einer überschießenden systemischen Entzündungsreaktion.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine Verbesserung der pulmonalen Immunabwehr bei Influenzavirusinfektion durch lokale Stimulation mit MALP-2 mit verbesserter Erregerelimination und gesteigerter Überlebensrate bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie.

Abstract

Effects of pulmonary immunostimulation with MALP-2 on the course of secondary pneumococcal infection in influenza virus-infected mice

Pulmonary infection with influenza virus is frequently complicated by secondary bacterial pneumonia. Influenza virus infection impairs the innate immune system resulting in reduced elimination of bacterial pathogens in the respiratory tract. The most prevalent pathogen inducing secondary pneumonia following primary influenza virus infection is *Streptococcus pneumoniae*. Despite potent antimicrobial therapy bacterial superinfection is still associated with a high case fatality rate. Local stimulation of the innate immune system in the lung is a novel strategy to prevent secondary bacterial infections by improving the host innate immune response. Specific molecular components of bacteria and other pathogens induce a local inflammatory reaction by activating Toll-like receptors of host cells. The macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa (MALP-2) used in this study is a specific agonist for the TLR-2/6 receptor dimer.

The objective of this study was to evaluate the effect of local stimulation of the pulmonary immune response with MALP-2 in influenza virus-infected mice on the course of secondary pneumococcal pneumonia. In a first set of experiments, female C57BL/6N mice were treated intratracheally with MALP-2 5 d after transnasal infection with influenza virus A/H1N1/PR/8/34 to study the effect of the pulmonary immuno-stimulation on the preexisting influenza virus infection. In influenza virus-infected mice, MALP-2 induced the release of proinflammatory cytokines and the recruitment of leukocytes into the bronchoalveolar space. The impact of the immuno-stimulation with MALP-2 was limited to the lung without any detectable systemic effects. Furthermore, no significant changes of the clinical parameters, the viral replication or the course of the influenza virus infection were observed.

To study the impact of MALP-2 stimulation on secondary pneumococcal pneumonia, influenza virus-infected mice were transnasally infected with *S. pneumoniae* 24 h after intratracheal MALP-2 treatment. The bacterial superinfection caused purulent bronchopneumonia revealed by histopathological examination of the lung. In this model, MALP-2 treatment significantly reduced the bacterial burden of the lung and increased the survival rate after secondary pneumococcal infection. MALP-2 stimulation prior to secondary *S. pneumoniae* infection had, however, no effect on the local and systemic leukocyte recruitment and cytokine release.

In conclusion, the results of this study indicate that local immunostimulation with the TLR2/6-agonist MALP-2 in influenza virus-infected mice prior to secondary pneumococcal superinfection improves bacterial elimination and increases survival.

1 Einleitung

1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die Pneumonie stellt eine der häufigsten Infektionskrankheiten sowohl in Deutschland als auch weltweit dar. Infektionen der Lunge und der Atemwege verursachen weltweit 2,7 Millionen Todesfälle im Jahr (1).

Eine ambulant erworbene Pneumonie (*community-acquired pneumonia*, CAP) bezeichnet eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms, die im Gegensatz zur nosokomialen Pneumonie nicht im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes erworben wurde. In Deutschland werden jedes Jahr circa 200 000 Menschen wegen einer ambulant erworbenen Pneumonie stationär behandelt. Zusätzlich werden circa 200 000 – 400 000 Patienten mit Pneumonie ambulant versorgt (2, 3). *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) wird in über 40 % der Fälle als Erreger identifiziert und ist damit der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland. Seltener werden *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, Influenza-A-Virus, *Staphylococcus aureus* oder andere als auslösendes Pathogen festgestellt (3).

Neben der Art, der Menge und der Virulenz des aufgenommenen Erregers ist die Abwehrbereitschaft des Organismus für die Pathogenese der Pneumonie von großer Bedeutung. Sind die Abwehrmechanismen geschwächt, besteht ein erhöhtes Risiko, an einer ambulant erworbenen Pneumonie zu erkranken. Risikopopulationen für die Entwicklung einer Pneumonie und schwerere Krankheitsverläufe sind sehr junge (unter 6 Jahren) und ältere Patienten (über 65 Jahren). Die Letalität reicht für stationäre Patienten von <1,5 % für junge Erwachsene bis 19,1 % für Patienten im neunten Lebensjahrzent. Vorerkrankungen der Lunge wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) führen ebenfalls zu einer gesteigerten Anfälligkeit für pulmonale Infektionen. Auch systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz, chronische Lebererkrankungen, Herzinsuffizienz, koronare Herzerkrankung, Immunschwäche, neurologische Erkrankungen und Malignome erhöhen die Gefahr für die Entstehung einer ambulant erworbenen Pneumonie (3, 4). Respiratorische Virusinfektionen, insbesondere Influenza, führen über vielfältige Mechanismen (Abschnitt 1.3.2) auch ohne weitere prädisponierende Erkrankungen zu einer verringerten pulmonalen Erregerelimination mit stark erhöhtem Risiko für eine sekundäre bakterielle Pneumonie (5).

Die typische klinische Darstellung einer ambulant erworbenen Pneumonie durch *S. pneumoniae* beinhaltet Fieber, Dyspnoe, allgemeines Krankheitsgefühl, produktiven Husten und eitriges Sputum. Diese Symptomatik liegt in vielen Fällen nicht vollständig vor. Die Abgrenzung zu anderen Infektionen der unteren Atemwege ist klinisch nicht zuverlässig möglich. Der direkte Nachweis des Erregers der Pneumonie kann aus Sputum, Blut oder Lavageflüssigkeit durch Anzucht auf Blutagarplatten und mikrobiologischer Differenzierung erfolgen. Der Nachweis von *S. pneumoniae*-Antigen ist auch aus dem Urin möglich. Wird nicht rechtzeitig eine adäquate Therapie eingeleitet, kann es zur Progredienz der Erkrankung kommen. Es ist der Übertritt der Erreger in die Blutbahn (Bakteriämie) und die Entstehung einer schweren systemischen Entzündungsreaktion im Sinne einer pneumogenen Sepsis möglich. Potenzielle Folgen sind respiratorisches Versagen, septischer Schock, Multiorganversagen und Tod innerhalb weniger Tage nach Krankheitsbeginn. Bei akutem Auftreten von ausgeprägter respiratorischer Insuffizienz und radiologisch gesicherter Beteiligung der gesamten Lunge spricht man auch vom *Acute Respiratory Distress Syndrom* (ARDS) (2, 6).

Um schwerwiegende Komplikationen einer ambulant erworbenen Pneumonie zu vermeiden, sollte die Therapie zum frühestmöglichen Zeitpunkt begonnen werden. Bei noch nicht abgeschlossener mikrobiologischer Diagnostik erfolgt eine empirische antimikrobielle Therapie in Abhängigkeit von dem zu erwartenden Erregerspektrum und der lokalen Resistenzsituation. Hierbei kommen meist β -Lactame, Makrolide oder Fluorchinolone zum Einsatz (2).

1.1.1 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, aber auch ein häufiger Kolonisationskeim im Oropharynx gesunder Menschen. Eine asymptomatische Besiedelung des Oropharynx durch Pneumokokken findet sich bei Kindern in ca. 50 %, bei Erwachsenen in bis zu 12 % der Fälle. Die Übertragung erfolgt als Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch. Außer bei der Pneumonie werden Pneumokokken gelegentlich auch als Erreger bei der bakteriellen Meningitis, Otitis media und Sepsis identifiziert (7, 8). Die Infektion der Lunge erfolgt durch Abstieg des Erregers in die Lunge per Mikroaspiration von Sekret aus dem Oropharynx. Die physiologischen Abwehrmechanismen der Lunge (Kapitel 1.3) verhindern in der Regel die Entstehung einer klinisch manifesten Pneumonie (4).

Mikroskopisch präsentieren sich Pneumokokken als ovale bis lanzettförmige, grampositive Diplokokken (Abbildung 1), welche von einer Polysaccharidkapsel umgeben sind (9). Die Unterteilung in über 91 verschiedene Serotypen erfolgt anhand der Antigenstrukturen der Polysaccharidkapsel (6). Auf Blutagar wächst der Erreger in glatten, schleimigen Kolonien unter Ausbildung einer α -Hämolyse. Pneumokokken sind fakultativ anaerob und bevorzugen eine 5 % CO₂-Atmosphäre. Die Abgrenzung von anderen α -hämolisierenden Streptokokken erfolgt durch Nachweis der Empfindlichkeit gegen Optochin (9).

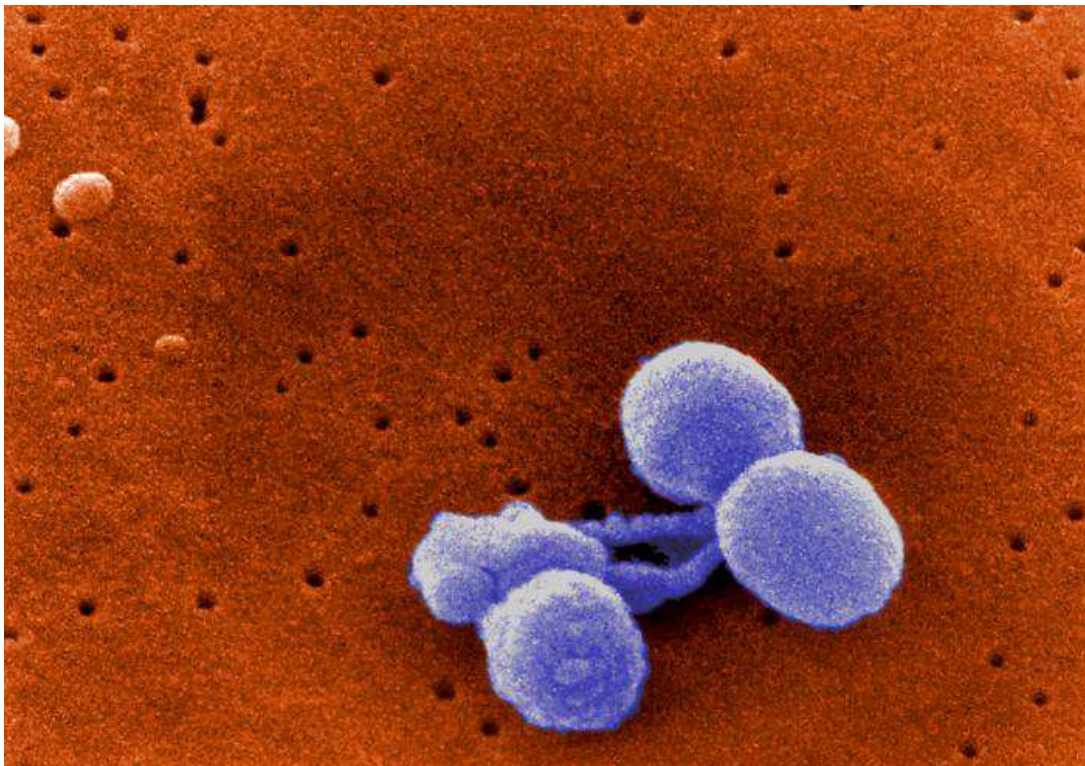


Abbildung 1: *Streptococcus pneumoniae*. (<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>, ID #: 9996 [Stand: 15.08.2017])

Pneumokokken besitzen eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren, welche die Virulenz des jeweiligen Stammes entscheidend beeinflussen. Besondere Bedeutung kommt der Polysaccharidkapsel zu, welche die Opsonierung des Erregers durch Komplementfaktoren unterbindet und so die Phagozytose durch Zellen des Immunsystems verhindert (10). Bei Kontakt mit dem respiratorischen Epithel kommt es zur Phasenvariation, d.h. die Kapsel wird deutlich verringert, um die Adhäsion am Epithel zu verbessern (11). Das zytoplasmatische Pneumolysin ist ein weiterer Pathogenitätsfaktor, der bei der Autolyse des Bakteriums freigesetzt wird. Es wirkt zytotoxisch auf pulmonales Endothel und alveoläres Epithel und vermindert die Barrierefunktion dieser Gewebe, so dass es zum Übertritt von Blutbestandteilen in das

Lungeninterstitium kommt (12). Auch verschiedene Oberflächenproteine stellen Pathogenitätsfaktoren dar, wie u.a. PspA (*pneumococcal surface protein A*), CbpA (*choline-binding protein A*), PsaA (*pneumococcal surface adhesin A*) und Enzyme, wie z.B. Neuraminidase, Hyaluronidase und Autolysin (13, 14). Das Zusammenspiel der verschiedenen Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums und der Suszeptibilität des Wirtes entscheidet über den Verlauf und Schweregrad einer Infektion.

In der Therapie der Pneumokokken-Pneumonie werden häufig Betalaktame, Fluorchinolone und Makrolide eingesetzt. Resistente Serotypen, die unempfindlich für einen oder mehrere der eingesetzten Wirkstoffe sind, nehmen weltweit zu und stellen ein zunehmendes Problem in der Behandlung der *S. pneumoniae*-Pneumonie dar (15). Laut dem Bericht des *European Centre for Disease Prevention and Control* von 2015 liegt in Deutschland bei 4,4 % der *S. pneumoniae*-Isolate eine Resistenz gegenüber Penicillinen vor. Für Makrolide ist die Situation noch gravierender mit Resistenz bei 7,1 % der Isolate von *S. pneumoniae*. In anderen europäischen Ländern ist die ungenügende Wirksamkeit von Penicillinen noch weit häufiger mit beispielsweise 22,3 % in Frankreich und 27,9 % in Spanien (16). Durch die eingeschränkte Wirksamkeit der konventionellen Therapie steigt die Bedeutung von prophylaktischen Maßnahmen. Zur Prophylaxe sind Pneumokokken-Impfstoffe verfügbar, die zu einer verringerten Zahl von Erkrankungen durch *S. pneumoniae* und Senkung der Mortalität bei älteren Menschen führten. Die Impfung wird für alle Patienten mit erhöhtem Risiko einer Pneumokokkenerkrankung empfohlen, insbesondere für Patienten ab dem 60. Lebensjahr, Kleinkinder, Bewohner von Altenpflegeeinrichtungen und Patienten mit schweren chronischen Vorerkrankungen. Aktuell verfügbare Polysaccharid-Impfstoffe induzieren die Bildung von Antikörpern gegen maximal 23 der 91 bekannten Serotypen von *S. pneumoniae*. Die spezifische Immunantwort auf die Pneumokokken-Impfung ist allerdings gerade bei den am meisten gefährdeten Gruppen, wie Immunsupprimierten, Kleinkindern und älteren Patienten, häufig unzureichend (2, 6). Zudem kommt es zu Selektion und vermehrter Ausbreitung von Serotypen, die vom Impfstoff nicht erfasst werden (17).

Die Reduktion der Mortalität durch die aktuell verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten bleibt insbesondere für Hochrisikopatienten ungenügend, so dass auch weiterhin Bedarf an neuen Therapie- und Präventionsstrategien besteht. Eine Stimulation des angeborenen Immunsystems der Lunge zeigte im Tierversuch vielversprechende Ergebnisse bei der Prävention der primären schweren *S. pneumoniae*-Pneumonie (18).

1.2 Influenza

Akute virale Infektionen der Atemwege hemmen die pulmonalen Abwehrmechanismen und erhöhen die Anfälligkeit für sekundäre bakterielle Pneumonien. Die größte Bedeutung kommt dabei der Influenza zu (2). Die Influenza (oder Grippe) ist eine durch Inflenzaviren (Abbildung 2) ausgelöste akute Atemwegsinfektion. Sie tritt regelmäßig als saisonale und regional begrenzte Epidemie in den Wintermonaten auf. Die saisonale Influenza ist für etwa 13 000 Todesfälle pro Jahr allein in Deutschland verantwortlich (19). Des Weiteren kommt es in unregelmäßigen Abständen zu weltweiten Pandemien mit oft erheblicher Mortalität. Besonders gefährdet durch die saisonale Influenza sind Kinder unter 2 Jahren, ältere Menschen über 65 Jahre und Menschen mit chronischen Erkrankungen (20).

Die Inflenzaviren werden der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet. Es werden drei Arten unterschieden: Influenza-A-, B- und C-Virus. Sowohl Inflenzavirus Typ A als auch Typ B sind verantwortlich für die saisonalen Epidemien. Pandemien allerdings werden allein vom Influenza-A-Virus hervorgerufen. Das Influenza-A-Virus besitzt ein achteilig-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom mit negativer Polarität, welches 11 Proteine kodiert. Von diesen Proteinen sind zwei für die Einteilung des Virus von besonderer Bedeutung: das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA). Diese beiden Glykoproteine sind in der Lipidmembran des Viruspartikels lokalisiert. Das Hämagglutinin ermöglicht das Eindringen in Wirtszellen, die Neuraminidase das Ablösen der neuen Viruspartikel von befallenen Zellen. Diese Oberflächenmoleküle sind verantwortlich für die antigenen Eigenschaften des Virus (21-23). Es werden 18 serologisch und genetisch verschiedene Varianten des Hämagglutinins (H1 – H18) und 11 Varianten der Neuraminidase unterschieden (N1 – N11) (24, 25). Die Einteilung der Inflenzavirus-A-Subtypen erfolgt anhand dieser beiden Antigene. Zurzeit zirkulieren beim Menschen lediglich die beiden Influenza-A-Subtypen H1N1 und H3N2 sowie das Influenza-B-Virus als Erreger der saisonalen Influenza. Tiere, insbesondere Vögel, stellen dagegen ein großes Reservoir verschiedenster Subtypen dar, von dem neue Subtypen in die menschliche Population eingeführt werden können. Die Varianz dieser Antigene ist für die Verbreitung der Influenza besonders wichtig, da eine Immunität immer nur gegen bestimmte Subtypen gerichtet sein kann (21-23).

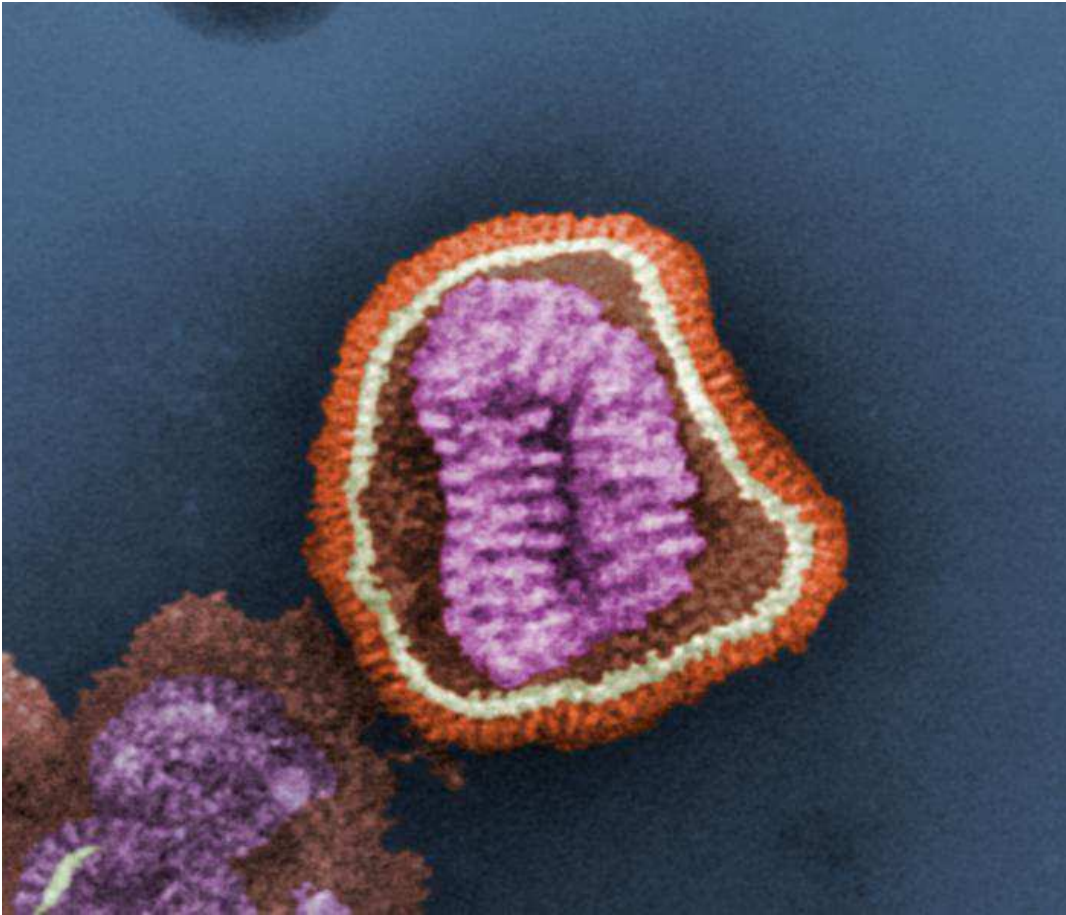


Abbildung 2: **Influenza-A-Virus.** (<http://phil.cdc.gov/phil/home.asp>, ID#:10073 [Stand: 15.08.2017])

Für die Varianz der HA- und NA-Antigene sind zwei Mechanismen von besonderer Bedeutung. Durch die fehleranfällige Polymerase des Virus entstehen regelmäßig Mutationen in den HA- und NA-Genen. Diese verändern schrittweise die antigenen Eigenschaften des Virus und führen damit zum teilweisen Verlust der Immunität der betroffenen Population. Durch natürliche Selektion kommt es zur Verbreitung dieser modifizierten Antigen-Varianten. Dieser langsame, kontinuierliche Vorgang heißt Antigen-Drift. Wenn innerhalb eines humanen oder tierischen Organismus verschiedene Subtypen vorkommen, kann es darüber hinaus zu einem *reassortment* kommen. Darunter wird die Neukombination der genetischen Information zweier Subtypen verstanden, so dass plötzlich ein Virus mit neuen antigenen Eigenschaften entsteht. Dieser Vorgang heißt Antigen-Shift (21).

Die Übertragung von Influenzaviren erfolgt von Mensch zu Mensch durch z.B. beim Husten und Niesen entstehende infektiöse Aerosole. Der Virus befällt primär das respiratorische Epithel der Atemwege. Erste Symptome sind nach einer Inkubationszeit von 1 - 4 Tagen zu beobachten. Beim Erwachsenen kommt es typischerweise zum abrupten Beginn mit Fieber, schwerem

Krankheitsgefühl, Kopf-, Hals- und Gliederschmerzen sowie trockenem Husten. Das Fieber erreicht seinen Höhepunkt von 38 – 40 °C nach ca. 24 h und dauert 1 – 5 Tage an (21). Der Verlauf ist abhängig von Alter und Immunstatus des Patienten sowie der Pathogenität des Virusstammes. Insbesondere bei Kindern oder alten Menschen können die typischen Symptome daher fehlen. Die Inzidenz der Influenza ist im Kindes- bis jungen Erwachsenenalter am höchsten. Allerdings sind schwere Verläufe, Komplikationen und Todesfälle weit häufiger bei älteren Menschen. Vorerkrankungen wie Asthma und andere Lungenerkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Leberzirrhose, Immunschwäche und Nierenversagen sowie Schwangerschaft stellen prädisponierende Faktoren für einen schweren Verlauf und Komplikationen der Influenza dar. Die Ausbreitung der Influenza ist sowohl von der Virulenz des Virus als auch von der Immunität in der betroffenen Population abhängig (20, 22). Besonders schnell verbreitet sich das Virus in Einrichtungen wie Schulen, Kindergärten, Kasernen, Altenheimen und Krankenhäusern (26). Schwere Erkrankungsverläufe entstehen über drei verschiedene Mechanismen, entweder durch eine sekundäre bakterielle Infektion, durch Exazerbation einer vorbestehenden schweren Herz- oder Lungenerkrankung oder seltener primär durch die Virusinfektion allein (23).

Für die gezielte Therapie der Influenza stehen Virostatika wie Oseltamivir und Zanamivir zur Verfügung. Diese Wirkstoffe führen durch Inhibition der viralen Neuraminidase zu einer unvollständigen Blockade der Ablösung neugebildeter Viruspartikel von der Wirtszelle. Sie senken die Dauer der Influenzaerkrankung um 1 bis 1,5 Tage, wenn die Behandlung frühzeitig innerhalb von 24 – 48 h nach Auftreten der ersten Symptome begonnen wird. Die Rate an stationären Aufenthalten wird durch die virostatistische Behandlung allerdings nicht verringert. Auch kommt es durch die hohe Mutationsrate des Influenzavirus schnell zur Entwicklung von Resistenzen (27-29). Als präventive Maßnahme steht eine Impfung gegen saisonal zirkulierende Influenzaviren zur Verfügung. Die Impfung ist empfohlen für Risikogruppen wie z.B. Menschen über 60 Jahre, Personen mit prädisponierenden Vorerkrankungen und medizinisches Personal (30). Gerade bei älteren Menschen ist die Antikörperbildung allerdings häufig eingeschränkt, so dass nur eine geringe Schutzwirkung durch die Impfung erreicht wird. Zudem kommt es durch Antigen-Drift und Antigen-Shift zu Ausbildung neuer Virusvarianten, welche durch die Impfung nicht oder unvollständig abgedeckt werden. Es ist jedes Jahr eine erneute Impfung mit einem modifizierten Impfstoff gegen die jeweils häufigsten Virusstämme notwendig. Durch produktionsbedingte Verzögerungen kann sich dabei der jeweils aktuelle Impfstoff nur gegen die

häufigsten Virusvarianten der bereits vergangenen Influenzasaison richten. Obwohl eine Reduktion der Mortalität von Influenza nachgewiesen wurde, bleibt die Schutzwirkung der Impfung daher unzureichend (31)

Die bedeutendste Komplikation der Influenza ist die Pneumonie. Sie entsteht gelegentlich durch direkte Infektion des Lungenparenchyms mit dem Influenzavirus selbst als primäre Influenza-Pneumonie. Häufiger ist jedoch die nachträgliche Infektion der vorgeschädigten Lunge durch bakterielle Erreger als sekundäre bakterielle Pneumonie. Diese sekundären bakteriellen Pneumonien stellen eine besonders schwere Verlaufsform der Influenza mit erhöhter Letalität dar (31, 32). *Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger einer solchen sekundären Pneumonie. Das Risiko für eine sekundäre bakterielle Infektion ist 4 bis 14 Tage nach Auftreten der ersten Influenza-Symptome am größten (33). Die Influenzavirus-induzierte erhöhte Suszeptibilität für bakterielle Pneumonien entsteht außer durch direkte Schädigung des respiratorischen Epithels auch durch eine Modifikation der pulmonalen Immunantwort (Abschnitt 1.3.2).

1.3 Das angeborene Immunsystem der Lunge

Die Lunge stellt eine 70 - 140 m² große Grenzfläche des menschlichen Organismus zu seiner Umwelt dar. Über diese Grenzfläche ist die Lunge per Atemluft im ständigen Kontakt mit Schadstoffen, Allergenen und Infektionserregern. Eine Vielzahl von Mechanismen der Atemwege und der Lunge dient dazu, diese Gefahrstoffe abzuwehren. Der Husten- und Niesreflex, die Schleimproduktion der Atemwege und die mukoziliäre Clearance verhindern mechanisch das Vordringen von Partikeln größer als 5 µm in den Alveolarraum. Gelangen Mikroorganismen dennoch bis in die Lunge, erfolgt die Elimination durch das Immunsystem. Ist die Funktion dieser Abwehrsysteme eingeschränkt, z.B. durch Alter, Lungenerkrankungen oder vorbestehende Infektionen, ist das Risiko einer Pneumonie deutlich erhöht.

Das Immunsystem kann in ein angeborenes und ein erworbenes Abwehrsystem unterteilt werden. Die beiden Systeme arbeiten nicht getrennt, sondern sind in komplexer Weise miteinander verbunden und interagieren miteinander. Das angeborene Immunsystem besteht zum einen aus zellulären Bestandteilen wie Makrophagen, Granulozyten, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen. Aber auch lösliche Stoffe sind elementare Bestandteile des angeborenen

Immunsystems, wie Akute-Phase-Proteine, Zytokine, das Komplementsystem und antimikrobielle Substanzen wie Collectine, Defensine, Lysozyme, Lactoferrin und die Surfactantproteine A und D (34, 35).

Während das erworbene Immunsystem über die Bildung löslicher Antikörper hochspezifisch auf einen bestimmten Erreger reagieren kann, ist das angeborene, unspezifische Immunsystem nicht darauf ausgelegt, jedes Antigen eines Erregers spezifisch zu identifizieren. Es ist jedoch in der Lage, bestimmte, genetisch konservierte Merkmale zu erkennen, die eine Gruppe von Mikroorganismen gemeinsam hat. Zu diesen sogenannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zählen meist Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Lipoteichonsäure und Lipoproteine. Diese PAMPs werden von den Zellen des angeborenen Immunsystems über die *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt. Eine Aktivierung von PRRs durch mikrobielle Bestandteile führt zu einer gesteigerten Ausschüttung proinflammatorischer Peptide. Diese führen dann zu einer lokalen Stimulation des angeborenen Immunsystems. Im Alveolarraum der Lunge gehören Makrophagen zu den häufigsten Zellen des unspezifischen Immunsystems. Sie können pulmonale Mikroorganismen über die PRRs erkennen, binden und aufnehmen (Phagozytose). Phagozytierte Erreger werden intrazellulär einer Reihe aggressiver Moleküle, wie Sauerstoffradikale und bakterizide Peptide, ausgesetzt und so unschädlich gemacht. Ist die Phagozytoseaktivität nicht ausreichend zur Erregerelimination, sind die residenten Makrophagen darüber hinaus in der Lage, durch Freisetzung von Zytokinen weitere Immunzellen zu rekrutieren und eine lokale oder systemische Entzündungsreaktion anzustoßen. Neutrophile Granulozyten sind nur in geringer Zahl in der gesunden Lunge zu finden. Bei einer pulmonalen Entzündungsreaktion wandern sie infolge der Freisetzung von Zytokinen in großer Zahl über die Blutgefäße zum Entzündungsherd (34, 36, 37).

Eine bedeutende Gruppe der PRRs sind die membranständigen *Toll-like* Rezeptoren (TLRs). Sie stellen einen der wichtigsten Mechanismen zur Erkennung von Mikroorganismen im unspezifischen Immunsystem dar. TLRs erkennen unterschiedlichste Moleküle (PAMPs) von Bakterien, Viren, Protozoen und Pilzen. Momentan sind 10 verschiedene *Toll-like* Rezeptoren beim Menschen bekannt. Die Aktivierung von TLRs führt über eine oder mehrere komplexe intrazelluläre Signalkaskaden letztendlich zur Induktion einer Entzündungsreaktion. In der Lunge werden die TLRs von Makrophagen, dendritischen Zellen, Lungenepithel und pulmonalem Endothel exprimiert. (38-40).

Toll-like Rezeptor-2 (TLR-2) ist ein membranständiger Rezeptor auf der Zelloberfläche. Er findet sich hauptsächlich auf Zellen des Mononukleär-phagozytierenden Systems. Aber auch Granulozyten und andere Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen von Bronchien und Alveolen exprimieren TLR-2 (41). Peptidoglykane und Lipoteichonsäure von grampositiven Bakterien, sowie Lipopeptide und Glykolipide verschiedener anderer Mikroorganismen binden an TLR-2. Er ist somit von großer Bedeutung für die Immunantwort gegen grampositive Erreger wie *S. pneumoniae* (40). TLR-2 kann mit den Rezeptoren TLR-1 und TLR-6 Rezeptordimere bilden, die spezifisch für diacylierte (TLR-6/TLR-2) bzw. triacylierte (TLR-1/TLR-2) Lipopeptide sind (42).

1.3.1 Zytokine

Zytokine sind eine Gruppe von kleinen (~25 kDa), löslichen Proteinen und Glykopeptiden, die für die Regulation der angeborenen Immunantwort von großer Bedeutung sind. Zytokine werden häufig von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems sezerniert, können aber auch von verschiedenen anderen Zellen des Organismus abgegeben werden. Ausgelöst wird ihre Sekretion durch inflammatorische Stimuli wie z.B. eingedrungene Mikroorganismen. Sie wirken über membranständige Rezeptoren auf die sezernierende Zelle selber (autokrin), auf in der Nähe befindliche Zellen (parakrin) oder auch auf weit entfernte Zellen (endokrin). Eine Untergruppe der Zytokine sind die Chemokine. Sie wirken chemotaktisch, induzieren also die gezielte Wanderung von Leukozyten zum Ort der Sekretion. Sie sind somit essentiell für die Entwicklung einer lokalen Entzündungsreaktion. Die Menge und die Art der ausgeschütteten Zytokine beeinflussen maßgeblich die Progression oder Regression einer Entzündungsreaktion (43). In dieser Arbeit wurden verschiedene Zytokine als Marker der lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion bestimmt. Auf die gemessenen Zytokine wird im folgenden Abschnitt kurz eingegangen.

Interleukin-1 beta (IL-1 β) wird von Makrophagen und epithelialen Zellen bei Kontakt mit Mikroorganismen gebildet und gehört zu den proinflammatorischen Proteinen. Es führt zur Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen und zur gesteigerten Sekretion von *Interleukin-6* (IL-6) und *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α). IL-6 und TNF- α gehören ebenfalls zu den entzündungsfördernden Zytokinen. Bei hohem Plasmaspiegel der genannten Zytokine kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit Fieber, Leukozytose und

Ausschüttung von Proteinen der akuten Phase durch die Leber. Das immunmodulatorisch und antiviral wirkende *Interferon gamma* (IFN- γ) wird hauptsächlich von Lymphozyten sezerniert. *Interleukin-18* (IL-18) wird von aktiven Makrophagen ausgeschüttet und fördert die IFN- γ Sekretion durch Lymphozyten. *Interleukin-10* (IL-10) gehört dagegen zu den überwiegend antiinflammatorisch-wirkenden Zytokinen. Es wird von Makrophagen und T-Lymphozyten gebildet und inhibiert die phagozytotische und sekretorische Funktion von Makrophagen (43).

Eine Untergruppe der Zytokine stellen die Chemokine dar. Es handelt sich um Proteine mit einer Größe von 8 – 10 kDa. Sie fördern nach Bindung an membranständige Chemokinrezeptoren den Übertritt von Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe und anschließend die Wanderung von Leukozyten entlang des Konzentrationsgradienten des Chemokins zur Quelle der Sekretion (Chemotaxis). Die Chemokine können von verschiedenen Zellen wie z.B. Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten ausgeschüttet werden. Das Chemokin MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein-1*; CCL2) veranlasst Monozyten und T-Lymphozyten zum Ort der Sekretion zu wandern. MIP-2 (*macrophage inflammatory protein 2*; CXCL2) und KC (*keratinocyte-derived cytokine*; CXCL1) wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*; CCL5) führt zur Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen (43, 44).

1.3.2 Interaktion von Immunsystem, Influenzavirus und *Streptococcus pneumoniae*

Das Influenzavirus und *S. pneumoniae* treten durch verschiedene Mechanismen miteinander und mit dem Wirtsorganismus in Wechselwirkung. Das Influenzavirus befällt primär die Zellen des respiratorischen Epithels. Durch Lyse der infizierten Zellen im Rahmen der Virusreplikation und durch Induktion der Apoptose in den Wirtszellen kommt es zum Zelluntergang und zu Lücken im epithelialen Zellverband (33, 45, 46). Die dadurch im betroffenen Abschnitt freiliegende Basalmembran ermöglicht eine verstärkte Adhäsion von *S. pneumoniae* am Atemwegsepithel und eine erleichterte Invasion bakterieller Pathogene (23, 47). Zusätzlich wird der Zilienschlag des respiratorischen Epithels und damit die mechanische Elimination von *S. pneumoniae* durch die Infektion mit Influenza-A-Virus reduziert (48). Die Haftung von *S. pneumoniae* an respiratorischen Epithelien wird auch durch die Aktivität der viralen Neuraminidase begünstigt. Diese spaltet Sialinsäuren am Bronchialepithel und bietet *S. pneumoniae* so vermehrte Möglichkeiten zur Adhäsion (49). Die Neuraminidasen verschiedener Virusstämme haben eine

unterschiedliche Aktivität, wobei eine hohe Aktivität mit einer hohen Letalität der sekundären Pneumokokkenpneumonie einhergeht (50). Bakterielle Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* wie das Oberflächenprotein *Pneumococcal surface protein A* (PspA) sind ebenfalls an der Interaktion von Influenzavirus und Pneumokokken beteiligt. Es ermöglicht *S. pneumoniae* bei vorbestehender Influenzavirusinfektion, sich den unspezifischen pulmonalen Abwehrmechanismen zu entziehen (51).

Das Influenzavirus modifiziert auch direkt das pulmonale Immunsystem des Wirts. Die Abwehrmöglichkeiten gegenüber einer bakteriellen Infektion sind dadurch vermindert. Insbesondere die phagozytotische Aktivität der neutrophilen Granulozyten und die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch eine Influenzavirusinfektion verringert (52, 53). Auch die Rekrutierung und die Überlebenszeit von neutrophilen Granulozyten wird durch das Influenzavirus herabgesetzt (54, 55). Das proapoptische Protein PB1-F2 wird von den meisten Influenza-A-Virus Subtypen exprimiert und hat eine große Bedeutung für die virusinduzierte Hemmung des angeborenen Immunsystems. PB1-F2 induziert die Apoptose von Monozyten, hat jedoch keinen direkten Einfluss auf die Replikation des Virus in der infizierten Lunge. Im Tierversuch zeigt sich nach Infektion mit einem PB1-F2-exprimierenden Virusstamm im Vergleich zu einem PB1-F2-defizienten Stamm bei nachfolgender sekundärer *S. pneumoniae*-Infektion eine verstärkte bakterielle Pneumonie mit deutlich erhöhter Letalität (56, 57). Die phagozytotische Aktivität von Alveolarmakrophagen wird ebenfalls durch Influenzavirus reduziert. Die pulmonalen Makrophagen zeigen nach einer Influenzavirusinfektion eine verringerte Expression des für die Phagozytose wichtigen Rezeptors MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*). Dieser Effekt wird über das Zytokin *Interferon- γ* (IFN- γ) vermittelt (58, 59). Des Weiteren sind die Konzentrationen der antiinflammatorischen Zytokine wie *Interleukin-10* (IL-10) und der *Typ-1 Interferone* auch noch nach Abklingen der Influenzavirusinfektion erhöht. Diese Zytokine hemmen die Aktivierung von Phagozyten sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und setzen so die Elimination bakterieller Erreger herab (55, 60, 61). Auch die Expression der *Toll-like* Rezeptoren wird durch die Influenzavirusinfektion modifiziert. Während einer akuten Infektion ist die Expression von TLR-2 verstärkt (62, 63). Nach Abklingen der Influenzavirusinfektion werden einige TLRs hingegen über längere Zeit vermindert gebildet und führen so zu einer Hemmung der Rekrutierung von Granulozyten *in vivo* bei einer sekundären bakteriellen Infektion (64). Die vermehrte Expression von TLR-2 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten kann neben dem Influenza-A-

Virus auch durch *S. pneumoniae* induziert werden (62). Im Fall der Pneumokokkeninfektion ist TLR-2 an der Phagozytose und oxidativen Abtötung von Pneumokokken durch neutrophile Granulozyten beteiligt (65). Im Mausmodell zeigen TLR-2-defiziente Tiere eine abgeschwächte Entzündungsreaktion und verringerte Freisetzung von Entzündungsmediatoren bei Infektionen mit *S. pneumoniae* (66). TLR-2 ist somit an der frühen Immunantwort gegen *S. pneumoniae* beteiligt und bietet daher einen äußerst vielversprechenden Ansatzpunkt für eine pharmakologische Intervention.

1.4 Die lokale TLR-vermittelte Immunstimulation als Therapie der experimentellen bakteriellen Pneumonie

Das Risiko für sekundäre bakterielle Infektionen wird durch die Influenzavirus-induzierte Immunsuppression in der Lunge noch zusätzlich erhöht. Die Stimulation einer adäquaten Immunantwort stellt daher eine neuartige Therapiestrategie dar, um die Abwehr bakterieller Erreger in der Lunge zu verbessern.

Die Stimulation einer lokalen Immunantwort über verschiedene *Toll-like* Rezeptoren konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien eine Verbesserung der pulmonalen Erregerabwehr gegen verschiedenste Pathogene hervorrufen. So führte eine pulmonale Stimulation mit Lysat von *Haemophilus influenzae* zu einer Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den Alveolarraum. Die behandelten Tiere zeigten daraufhin eine erhöhte Überlebensrate nach pulmonaler Infektion sowohl mit *S. pneumoniae* als auch mit Influenza-A-Virus. Der maximale protektive Effekt wurde erreicht, wenn die Stimulation 24 h vor Infektion erfolgte. Aber auch bei einer Behandlung 24 h nach der Virusinfektion konnte noch ein therapeutischer Effekt nachgewiesen werden (67, 68). Die Stimulation einer pulmonalen Immunantwort mit TLR-9-Agonisten wie cyclisches Diguanylat (c-di-GMP) oder speziellen synthetischen Oligodeoxynukleotiden (CpG-ODN) erhöhte die Überlebensrate bei pulmonaler Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (69, 70). AGPs (*aminoalkyl glucosaminide phosphates*) bewirkten nach transnasaler Applikation eine TLR-4 vermittelte Verstärkung der Elimination von *Listeria monocytogenes* und Influenza-A-Virus (71). Des Weiteren verbesserte die intratracheale Applikation von Lipopolysaccharid (LPS) die Erregerelimination in der Lunge bei Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (72) sowie die Überlebensrate bei Infektion mit Influenza-A-Virus in der Lunge (73). Die Stimulation der angeborenen Immunantwort der

oberen Atemwege mit dem TLR-3-Agonist *Poly ICLC* (synthetische dsRNA mit poly-l-Lysine and Carboxymethylcellulose) hatte einen ausgeprägten protektiven Effekt gegenüber einer sonst lethalen transnasalen Influenza-A-Virusinfektion (74). Auch beim Menschen führte die pulmonale Applikation von TLR-Agonisten zu einer lokalen inflammatorischen Reaktion. So bewirkte der TLR-2-Agonist Lipoteichonsäure und der TLR-4-Agonist LPS in der humanen Lunge eine Zytokinausschüttung und damit einhergehend die Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (75).

Der Effekt der Immunstimulation ist bei pulmonaler Applikation der TLR-Agonisten weitgehend auf die Lunge beschränkt. In einer Studie mit den TLR-2/6-Agonisten *Pam2CSK4* und dem TLR-9-Agonisten *Oligodeoxynucleotid* in der Maus wurden auch mit dem achtfachen der therapeutischen Dosierung nur eine gering erhöhte systemische Ausschüttung von Zytokin IL-6 und von Akuter-Phase-Proteinen ohne Beeinflussung klinischer Parameter festgestellt (76).

1.5 MALP-2

Die in dieser Studie zur pulmonalen Immunstimulation verwendete Substanz ist das *Macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa* (MALP-2). MALP-2 wurde von Mühradt et al. erstmals aus *Mycoplasma fermentans* isoliert, zuerst noch unter der Bezeichnung *Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material* (MDHM) (77). Seit der Entschlüsselung der chemischen Struktur des MALP-2 ist eine synthetische Herstellung möglich. Bei MALP-2 (Abbildung 3) handelt es sich um ein Lipopeptid bestehend aus zwei langkettigen Fettsäuren und einem aus 14 Aminosäuren bestehendem Peptidteil (78). Für die biologische Aktivität sind vor allem die zwei Ester-gebundenen Fettsäuren sowie die freie NH₂-Gruppe verantwortlich (79). Aufgrund eines asymmetrischen C-Atoms im Lipidteil von MALP-2 liegt es in zwei verschiedenen Konfigurationen vor. Dabei besitzt das R-Isomer gegenüber dem S-Isomer eine über hundertfach erhöhte biologische Aktivität (80).

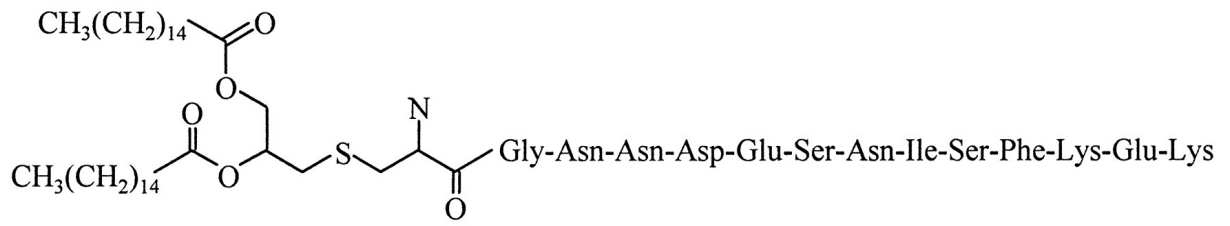


Abbildung 3: **Struktur des MALP-2.** (81)

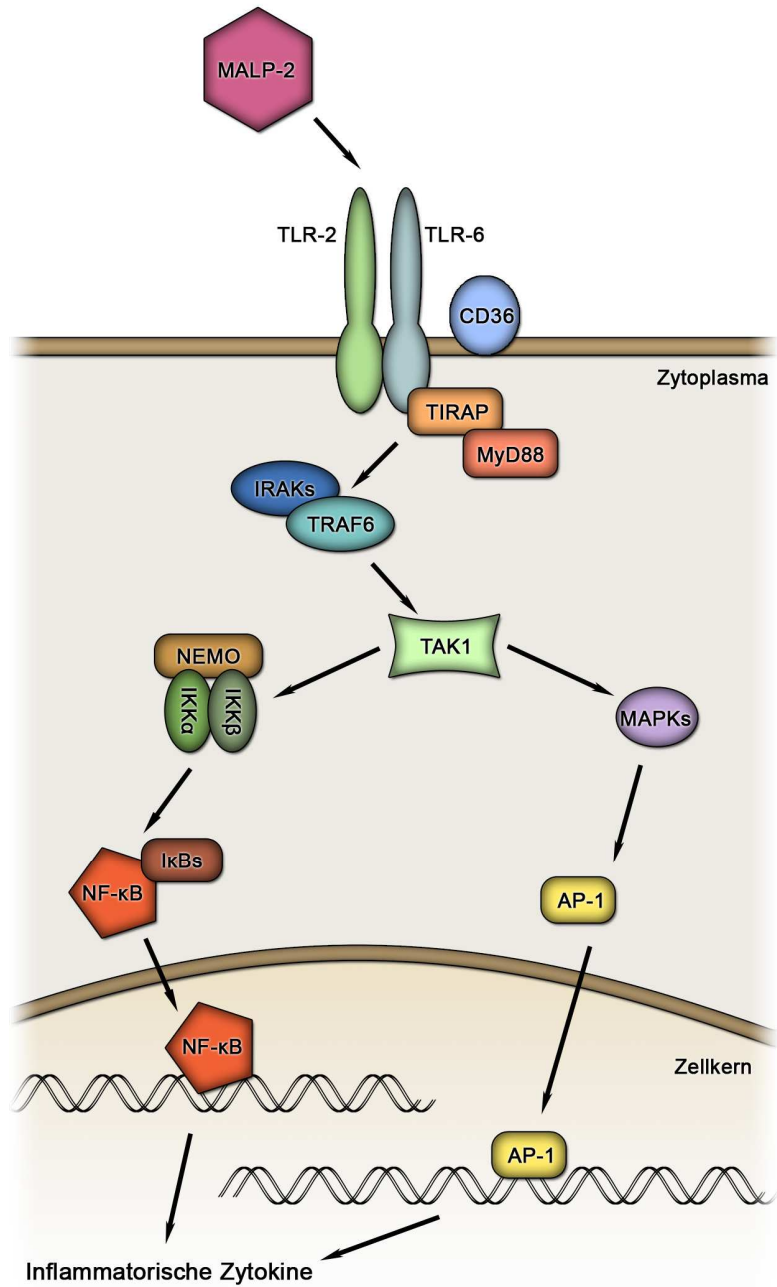


Abbildung 4: **Signaltransduktion von TLR-2/6.** Modifiziert nach (82, 83).

MALP-2 ist ein Ligand des Rezeptordimers bestehend aus TLR-2 und TLR-6 (79). CD36 (*cluster of differentiation 36*) ist als Korezeptor an der Erkennung von Diacylglyceriden wie MALP-2 durch das TLR-2/TLR-6-Dimer beteiligt (84). Bei Stimulation des Rezeptordimers kommt es zum Ablauf einer intrazellulären Signalkaskade (Abbildung 4), die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer* of activated B-cells) und AP-1 (*activator protein 1*) führt. Diese aktivierten Transkriptionsfaktoren modulieren im Zellkern die Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine (82, 83, 85, 86).

Mehrere *in vitro* Studien zeigten, dass MALP-2 eine Stimulation der angeborenen Immunantwort bewirkt. Die Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Proteinen wie MIP-1, MIP-2, MCP-1, TNF- α , IL-6 in murinen und humanen Zellen des mononukleärphagozytären Systems wurde durch MALP-2 induziert (80, 87-89). Des Weiteren erhöhte MALP-2 die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch Makrophagen und verstärkte damit die bakterizide Aktivität dieser Zellen (78-80). Die Stimulation mit MALP-2 reduzierte entsprechend die intrazelluläre Proliferation von phagozytiertem *Mycobacterium bovis BCG* in pulmonalen Makrophagen (90). Neutrophile Granulozyten reagierten ebenfalls auf MALP-2-Stimulation mit erhöhter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, einer Steigerung ihrer phagozytotischen Aktivität, einer verstärkten Migrationsneigung, einer vermehrten Ausschüttung von Zytokinen wie IL-8 und MIP-1 sowie einer Verzögerung der Apoptose (91). Selbst Fibroblasten als ortsständige Zellen des Bindegewebes konnten durch MALP-2 zur Ausschüttung von Zytokinen wie MCP-1 angeregt werden (79).

In vivo zeigte sich ebenfalls die immunstimulatorische Wirkung von MALP-2. Intraperitoneal appliziert bewirkte MALP-2 im murinen Tiermodell einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die lokale Ausschüttung von Zytokinen in den peritonealen Raum. Diese Induktion einer lokalen unspezifischen Immunantwort ging mit einer erhöhten Überlebensrate bei bakterieller Peritonitis und Sepsis einher (87, 92). Des Weiteren wurde lokal appliziertes MALP-2 als Therapie von Wundheilungsstörungen in einem diabetischen Mausmodell untersucht. Nach lokaler Anwendung von MALP-2 im Wundbereich wurde hierbei eine vermehrte Einwanderung von Leukozyten sowie eine erhöhte lokale Zytokinkonzentration beobachtet, die insgesamt zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung führte (93).

Eine MALP-2-induzierte lokale Entzündungsreaktion wurde im Tiermodell auch in der Therapie maligner Neoplasien erfolgreich eingesetzt. Dabei führte die intratracheale Applikation von MALP-2 vor Injektion von Adenokarzinomzellen in den venösen Blutkreislauf zu einer Verringerung der pulmonalen Metastasierungshäufigkeit (94). In einem murinen Modell des Pankreaskarzinoms führte die Applikation von MALP-2 zu einer verstärkten Migration von T-Killerzellen und natürlichen Killerzellen zum Karzinom und darauf folgend zu einer signifikant verlängerten Überlebenszeit (95). Auch im Menschen zeigte sich eine verstärkte lokale Entzündungsreaktion bei Applikation von MALP-2 in ein nichtresezierbares Pankreaskarzinom (96).

In der murinen Lunge bewirkte eine intratracheale Applikation von MALP-2 eine Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, sowie eine Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, MCP-1, KC und TNF α in den bronchoalveolären Raum. Die Zahl der rekrutierten Zellen erreichte 24 h nach intratrachealer Applikation von MALP-2 ihr Maximum und geht nach mehreren Tagen wieder auf die Ausgangswerte zurück. Die Anzahl der einwandernden Zellen war dabei von der MALP-2 Dosierung, vom Alter und vom Geschlecht der Versuchstiere abhängig. Darüber hinaus stimulierte MALP-2 die Expression des TLR-2 im Lungengewebe (18, 97-99).

Im Asthma-Tiermodell bewirkte MALP-2 eine Modifikation der bronchialen Entzündungsreaktion mit verringertem bronchialen Remodeling und verringerter Atemwegsreaktion auf Methacholin-Provokation (100).

Neben dem angeborenen Immunsystem wird das spezifische Immunsystem ebenfalls durch MALP-2 aktiviert. So erhöhte die lokale Applikation von MALP-2 die Zahl der antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten in der murinen Lunge. Des Weiteren steigerte MALP-2 die Expression von MHC-I, MHC-II (*major histocompatibility complex*) und anderen Oberflächenmolekülen auf Antigenpräsentierenden Zellen und förderte damit die Aktivierung weiterer Zellen des adaptiven Immunsystems (98, 101-103). Durch die geringe Größe des Peptidteils ist MALP-2 selbst nicht immunogen, d.h. es kommt nicht zur Bildung MALP-2-spezifischer Antikörper (104). Durch die Aktivierung der spezifischen Immunantwort ist jedoch der Einsatz von MALP-2 als Adjuvans für Impfstoffe möglich. Im Tiermodell verbesserte die Verwendung von MALP-2 als Adjuvans

sowohl lokal als auch systemisch bereits die Antikörperbildung gegen die Antigene β -Galactosidase bzw. HIV-1-tat-Protein (104, 105).

In sehr hoher Dosierung (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) induzierte MALP-2 nach lokaler Applikation die Entwicklung einer systemischen Entzündungsreaktion mit Hyperthermie (106) und nur extreme Dosierungen von über 100 $\mu\text{g}/\text{Maus}$ bewirkten potentiell letale endotoxische Effekte ähnlich dem LPS (107). Im Vergleich dazu wird für die lokale Applikation moderater Mengen MALP-2 in der Literatur bisher keine akute oder chronische schädliche Wirkung beschrieben.

Im murinen Modell der Pneumonie wurde MALP-2 bereits erfolgreich präventiv verwendet. Mit MALP-2 vorbehandelte Lungen zeigten eine gesteigerte Immunantwort und verbesserte Erregerabwehr gegenüber *Pseudomonas aeruginosa*, mit entsprechend geringerer Erregerlast und geringerem Gewichtsverlust (108). Des Weiteren führte die lokale Vorbehandlung der gesunden Lunge mit MALP-2 vor transnasaler *S. pneumoniae*-Infektion zu einem geringeren Gewichtsverlust, einer reduzierten Bakteriämie, einer verminderten Erregeranzahl im Lungengewebe und verbesserte den Verlauf der primären Pneumokokkenpneumonie signifikant (18).

1.6 Ziel der Arbeit

Die ambulant erworbene Pneumonie tritt sehr häufig bei Patienten mit kompromittiertem Immunsystem und Vorschädigung der Lunge auf. So führt insbesondere die Infektion der Lunge mit dem Influenza-A-Virus zu einer vorübergehend abgeschwächten pulmonalen Erregerabwehr und prädisponiert somit für die Entstehung einer sekundären bakteriellen Pneumonie. Gerade diese Patienten könnten von einer präventiven Immunstimulation profitieren. Eine vorangegangene Studie zeigte bereits die Wirksamkeit der Immunstimulation mit dem Lipopeptid MALP-2 in der Prävention der primären *S. pneumoniae*-Pneumonie in der gesunden murinen Lunge (18). Welchen Effekt MALP-2 in der bereits durch Influenzavirusinfektion vorgeschädigten Lunge hat ist bislang nicht bekannt.

Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob MALP-2 auch in einer Influenza-A-Virus-infizierten Lunge die angeborene Immunantwort stimuliert und welchen Effekt das auf eine nachfolgende sekundäre *S. pneumoniae*-Pneumonie hat. Dafür wurde das murine Modell der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach primärer Influenza-A-Virus-Infektion verwendet.

Es wurden zunächst die Auswirkungen von MALP-2 auf die Influenza-modifizierte Immunantwort der Lunge analysiert und anschließend die Wirkung der Immunstimulation auf eine sekundäre Pneumokokkeninfektion, insbesondere hinsichtlich der bakteriellen Elimination, der Entzündungsreaktion und des klinischen Verlaufs, untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Tabelle 1: Untersuchungsgruppen.

	Untersuchungszeitpunkt p.i.	Gruppe 1 Leukozyten BALF/Blut Zytokine BALF/Plasma	Gruppe 2 Leukozyten BALF/Blut Zytokine BALF/Plasma	Gruppe 3 Histologie
PBS+Kontrolle	6 d	n = 8		
PBS+MALP-2	6 d	n = 8		
H1N1+Kontrolle	6 d	n = 8		
H1N1+MALP-2	6 d	n = 8		
PBS+Kontrolle+PBS	7 d		n = 8	n = 4
H1N1+Kontrolle+PBS	7 d		n = 8	n = 4
H1N1+MALP-2+PBS	7 d		n = 8	n = 4
H1N1+Kontrolle+ <i>S.pn</i>	7 d		n = 8	n = 4
H1N1+MALP-2+ <i>S.pn</i>	7 d		n = 8	n = 4

	Untersuchungszeitpunkt p.i.	Gruppe 4 Bakterienlast Viruslast	Gruppe 5 Klinischer Verlauf	Gruppe 6 Klinischer Verlauf
H1N1+Kontrolle+ <i>S.pn</i>	7 d	n = 11		
H1N1+MALP-2+ <i>S.pn</i>	7 d	n = 11		
H1N1+Kontrolle+ <i>S.pn</i>	10 d		n = 10	
H1N1+MALP-2+ <i>S.pn</i>	10 d		n = 10	
H1N1+Kontrolle	10 d			n = 10
H1N1+MALP-2	10 d			n = 10

Abkürzungen:

p.i.: *post infectionem*, Zeitpunkt nach Influenzavirusinfektion

H1N1: infiziert mit Influenzavirus A/H1N1 am Tag 0

PBS: Scheininfektion mit phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) Tag 0 bzw. 6d p.i.

MALP-2: MALP-2-behandelt 5d p.i.

Kontrolle: Lösungsmittel-behandelt 5d p.i.

S.pn.: infiziert mit *S. pneumoniae* 6d p.i.

BALF: bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell der primären pulmonalen Schädigung durch Influenza-A-Virus-Infektion verwendet. Alle Tiere erhielten am Tag 0 der Versuchsreihe eine Influenzavirus- oder eine Scheininfektion. Am 5. Tag erfolgte die Applikation von MALP-2 bzw. Kontrolllösung. Am 6. Tag erfolgte eine Infektion mit *S. pneumoniae* bzw. eine Scheininfektion. Das Versuchsende bzw. die finale Probenentnahme wurden je nach Versuchsgruppe nach 6, 7 oder 10 Tagen erreicht (Tabelle 1, Abbildung 5).

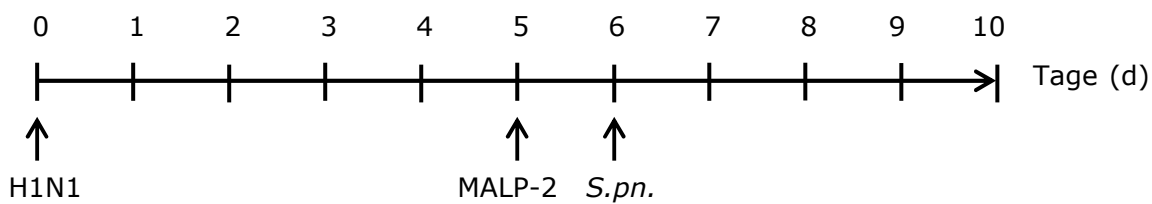


Abbildung 5: Schema Studiendesign

2.2 Versuchstiere

Für alle Untersuchungen im Tiermodell wurden weibliche, spezifiziert-pathogenfreie Mäuse des Inzuchtstammes C57BL/6N WT verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen. Die 8-9 Wochen alten Tiere hatten eine Körpermasse (KM) von 17-21 g. Die Haltung der Tiere während der Infektionsversuche erfolgte in geschlossenen, individuell belüfteten Käfigen (IVC Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland). Ein Tag-/Nacht-Wechsel alle 12 Stunden wurde gewährleistet. Die Tiere hatten durchgehend Zugang zu Wasser und Futterpellets.

Alle Tierversuche zur vorliegenden Arbeit wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) genehmigt (Genehmigung vom 14.06.2011, Antragsnummer G 0044/11).

2.3 Infektion mit Influenzavirus

Für die Virusinfektion wurden Viren des Stammes Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 verwendet. Die Virusstammlösung wurde freundlicherweise von PD Dr. Thorsten Wolff vom Robert Koch Institut zur Verfügung gestellt.

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte Virusstammlösung der Konzentration $8,4 \times 10^9$ Plaque-bildende Einheiten pro Milliliter (*plaque forming units*, pfu/ml) wurde nach dem Auftauen schrittweise mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf die Zielkonzentration von 2×10^3 pfu/ml verdünnt. Vor der Infektion wurde die Körpermasse und Körperkerntemperatur der Tiere bestimmt und dokumentiert. Anschließend wurde jedes Tier einzeln in eine Narkosekammer verbracht und mit 5 % Isofluran narkotisiert. Nach Erreichen der notwendigen Narkosetiefe wurden 50 μl der Infektionslösung langsam transnasal appliziert (Infektionsdosis 100 pfu). Nicht infizierte Kontrolltiere erhielten auf die gleiche Weise transnasal 50 μl PBS.

2.4 Klinische Überwachung

Alle Tiere wurden während der gesamten Versuchsdauer zweimal täglich kontrolliert. Es wurden der klinische Zustand sowie Körperkerntemperatur und Körpermasse erfasst. Wenn sich der Zustand eines Tieres durch die Infektion vor Versuchsende soweit verschlechterte, dass das Leiden des Tieres ein ethisch vertretbares Maß überschritt, wurde eine Euthanasie mit einer intraperitonealen Ketamin/Xylazin-Injektion durchgeführt. Hierfür wurden die vorab festgelegten Handlungsanweisungen gemäß Tabelle 2 zugrunde gelegt.

Tabelle 2: **Handlungsanweisung** zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren

Tier isoliert sich	A
Struppiges/ungepflegtes Fell	A
Aufgetriebener Leib	A
Kot abweichend in Farbe, Konsistenz	A
Verletzungen, Hautveränderungen	A
Fehlstellung der Zähne	A
Tier vermeidet Bewegung	A
Reaktionsminderung auf äußere Reize (Teilnahmslosigkeit)	A
Ruhelosigkeit	A
Circling	A
Stelzgang	A
Atmung normal/beschleunigt/stark pumpend	A/B/C
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	B
Krustige Belege am Augenrand, eingesunkene trübe Augen	B
Blässe (Augen, Ohren)	B
Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot	B
Krämpfe, Torkeln	B
Paresen	B
Lokale, äußerlich sichtbare Infektionen	B
Abszesse	B
Leib hart oder gespannt	B
Hautfalten bleiben stehen	B
Ödembildung	B
Automutilation	B
Schmerzen beim Anfassen	B
Paralysen, spätestens sobald die Gefahr besteht, dass die Tiere aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen	C
Moribund	C
Leib hart und aufgetrieben	C
Ungewöhnliche Zunahme der Körpermasse	B
10 % Körpermassedefizit	B
20 % Körpermassedefizit	C

Tötungskriterien (nach Kategorien):

- A Das Tier weiter beobachten.
- B Bei Kombination eines B mit Torkeln, Schmerzen oder Blässe ist das Tier unverzüglich schmerzlos töten.
- C Tier unverzüglich schmerzlos töten

2.5 MALP-2-Applikation

2.5.1 Vorbereitung

Das in den Versuchen verwendete MALP-2 (S-[2,3-bis(Palmitoyloxy)-(2R)-propyl]-cysteinyl-GNNDESNISFKEK) wurde in 30 % 2-Propanol/H₂O gelöst und bei 4 °C lichtgeschützt gelagert (Konzentration der Stammlösung 1 mg/ml). Vor Applikation erfolgte die Verdünnung mit steriler isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %) auf eine Konzentration von 0,5 µg MALP-2 pro 30 µl Applikationsvolumen. Die kontroll-behandelten Tiere erhielten entsprechend 0,5 µl 30 % 2-Propanol/H₂O in 30 µl NaCl 0,9 %, um unspezifische Effekte durch die Applikation von Lösungsmittel und Kochsalzlösung von der Wirkung des MALP-2 abzugrenzen und die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten. Die für diese Arbeit verwendete MALP-2-Stammlösung wurde freundlicherweise von Prof. Peter Mühlradt zur Verfügung gestellt.

2.5.2 Applikation des MALP-2

Vor der intratrachealen Behandlung mit MALP-2- oder Kontrolllösung wurde die Körpermasse (KM) und Körperkerntemperatur der Mäuse bestimmt und die Narkose gewichtsadaptiert durchgeführt. Die Narkose erfolgte mit einem Gemisch von 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin als intraperitoneale (i.p.) Injektion. Augengel (Thilo-Tears Gel) wurde appliziert um eine Austrocknung des Auges in Narkose zu verhindern. Nach Erreichen der ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage fixiert und in eine senkrechte Position gebracht. Eine Kaltlichtquelle zur indirekten Ausleuchtung der Luftröhre wurde von ventral auf den Kehlkopf gerichtet. Anschließend wurde ein Mauslaryngoskop in die Maulhöhle eingeführt, so dass Kehlkopf und indirekt ausgeleuchtete Trachea gut einsehbar waren. Daraufhin erfolgte unter direkter Sichtkontrolle die orotracheale Intubation mit einer 24G Venenverweilkanüle. Nach intratrachealer Applikation von 30 µl MALP-2- bzw. Kontrolllösung über die Kanüle erfolgte die sofortige Extubation und Entfernung des Laryngoskops. Anschließend wurden die Tiere wieder in den Käfig überführt. Um das Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden sie während der Aufwachphase mit Rotlicht bestrahlt und regelmäßig überwacht.

2.6 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Für die sekundäre Infektion wurden Erreger vom Stamm *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3 (PN36, NCTC7978) verwendet.

2.6.1 Bakterienanzucht

Für die Erregeranzucht wurde gefrorene Bakteriensuspension mit einer sterilen Plastiköse (1µl) direkt aus der gefrorenen Stammlösung aufgenommen und auf Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut ausgestrichen. Daraufhin wurden die Platten für 9 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Wattetupfer aufgenommen und in eine sterile Nährlösung (18ml Todd-Hewitt Bouillon + 0,5 % Hefeextrakt, 2ml fetales Kälberserum (FCS)) überführt. Mit Hilfe eines Photometers wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienlösung bei 600nm Wellenlänge erfasst und damit die Konzentration der Bakterien in der Lösung kontrolliert. Sobald genügend Kolonien überführt wurden, d.h. eine OD von 0.03 – 0,04 erreicht wurde, erfolgte die Inkubation der Bakterienlösung im Wasserbad bei 37 °C für weitere 2 Stunden bis zu einer OD zwischen 0,3 und 0,4 (Beginn der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien). Aus der zuletzt erreichten OD und dem Volumen der Bakteriensuspension wurde die Gesamtzahl der Bakterien errechnet. Dabei entspricht eine OD von 0,1 einer Pneumokokken-Konzentration von 1×10^8 koloniebildenden Einheiten pro ml (*colony forming units*, cfu/ml). Durch Zentrifugation (3100 rpm, 10 min) wurden die Bakterien von der Nährlösung getrennt und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden anschließend in PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von 1×10^9 cfu/ml verdünnt. Durch weitere Verdünnungsschritte wurde die gewünschte Infektionskonzentration von 5×10^4 cfu/ml (entspricht 1×10^3 *S. pneumoniae* in 20 µl) hergestellt. Zur Kontrolle der Erregeranzahl wurden Proben der Infektionslösung auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen, über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und die Zahl der Kolonien bestimmt.

2.6.2 Infektion

Vor der Infektion erfolgte Bestimmung der Körpermasse und Körperkerntemperatur der Mäuse. Anschließend wurde die Narkose mit einem Gemisch von 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin als i.p. Injektion verabreicht. Augengel (Thilo-Tears Gel) wurde appliziert, um eine Austrocknung des Auges in Narkose zu verhindern. Nach Erreichen der entsprechenden Narkosetiefe wurden die Tiere in einer speziellen Haltevorrichtung fixiert. Die Infektion erfolgte transnasal durch langsame Applikation von 10 µl Infektionslösung in jedes Nasenloch (Infektionsdosis 1×10^3 cfu pro Tier). Kontroll-infizierte Tiere wurden auf die gleiche Weise mit 2×10 µl PBS behandelt. Im Anschluss an die Infektion wurden die Tiere wieder in den Käfig verbracht. Um das Auskühlen der Tiere zu verhindern, wurden sie mit Rotlicht bestrahlt und bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose regelmäßig überwacht.

2.7 Präparation der Tiere und Probenentnahme

2.7.1 Vorbereitung

Vor der Präparation erfolgten die Beurteilung des klinischen Zustands des Tieres sowie die Erfassung von Körperkerntemperatur und Körpermasse. Die Narkose erfolgte mit einem Gemisch aus 100 mg/kg KM Ketamin und 20 mg/kg KM Xylazin als intraperitoneale Injektion. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe wurde die Desinfektion des Operationsfeldes (Abdomen, Thorax und Hals) mit Braunol durchgeführt. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf der Unterlage einer speziellen Vorrichtung, der sogenannten IPML-Kammer (isoliert ventilierte und perfundierte Mauslunge), fixiert.

2.7.2 Präparation

Die Haut wurde im Bereich des medianen Unterbauchs eröffnet und der Schnitt in der Medianlinie bis zur Mandibula erweitert. Es folgte die stumpfe Präparation der Trachea und Eröffnung derselben unterhalb des Larynx. Eine Trachealkanüle wurde über das Tracheostoma eingeführt und mittels Ligatur fixiert. Die Überdruckbeatmung mit Raumluft und 90 Atemzügen pro Minute sowie einem Beatmungsdruck von inspiratorisch 9,0 cmH₂O und endexpiratorisch 4,5 cmH₂O wurde begonnen. Anschließend erfolgten eine mediane Laparotomie bis zum *Processus xiphoideus* und die Entfernung des Zwerchfells. Zur Gerinnungshemmung wurden

50 µl einer Heparinlösung (125 I.E.) unter Sichtkontrolle intrakardial appliziert und es erfolgte eine Blutentnahme aus der *Vena renalis sinister*. Anschließend wurde die *Vena cava caudalis* eröffnet und durch die progrediente Hypovolämie kam es zum raschen Kreislaufstillstand. Daraufhin wurden die Zwerchfellreste entfernt und der Unterleib abgetrennt. Es folgte eine mediane Thorakotomie und seitliches Fixieren der Thoraxhälften, so dass freie Sicht auf die beatmete Lunge möglich war. Der Thymus und pleurale Verwachsungen wurden entfernt und eine lockere Ligatur um die *Arteria pulmonalis* gelegt. Anschließend wurde die Herzspitze entfernt, so dass beide Herzkammern eröffnet waren und der Pulmonalkatheter in die rechte Herzkammer eingebracht werden konnte. Der Katheter wurde bis zum Beginn der *Arteria pulmonalis* vorgeschoben und dort mittels der vorher angebrachten Ligatur fixiert, so dass eine Spülung der Lunge mit auf 37 °C vorgewärmter isotoner Kochsalzlösung mit einer Flussrate von 1 ml/min erfolgen konnte. Der Deckel der IPML-Kammer wurde geschlossen und die Beatmung anschließend auf Unterdruckbeatmung umgestellt. Über 3 Minuten erfolgte nun eine Beatmung der Lunge mit Raumluft, bei 90 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von inspiratorisch -9,0 cmH₂O bis endexpiratorisch -4,5 cmH₂O unter Kontrolle der dynamischen Compliance und der pulmonalen Resistance. Anschließend wurden die Perfusion und die Ventilation der isolierten Lunge beendet und, je nach Versuchsreihe, entweder eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt oder die Lunge als Ganzes entnommen. Für die Lavage wurde die Lunge zweifach mit 800 µl eisgekühltem, mit Proteaseinhibitoren (Complete Mini) versetztem PBS über die Trachealkanüle lavagiert und die gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF1 und BALF2) zur späteren Analyse bei 4 °C asserviert.

2.8 Differenzierung der Leukozyten

2.8.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl in der BALF

Direkt nach der Entnahme wurde die BALF bei 2200rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand von BALF1 und BALF2 wurde bei -80 °C aufbewahrt. Die Zellpellets wurden gemeinsam mit insgesamt 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 5 µl der Zellsuspension mit 5 µl Metylenblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Leukozyten in allen 4×16 Quadraten ausgezählt und damit die Gesamtleukozytenzahl der Lavageflüssigkeit berechnet (Mittelwert pro Großquadrat × 2 × 10.000 = Leukozyten/ml).

2.8.2 Differenzierung der Leukozyten in der BALF

Die Untersuchung der Leukozyten in der Lavageflüssigkeit erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur von BD Biosciences (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Die Unterscheidung der Zellen erfolgte anhand des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*, FSC), des Seitwärtsstreulichtes (*side scatter*, SSC) und dem Muster der Antikörperfärbung bei Anregung mit einem Laser. Durch spezifische, fluoreszenzmarkierte Antikörper können dabei verschiedene Zellpopulationen differenziert werden.

Die in PBS verdünnte Zellsuspension aus der BALF wurde bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde aufgerüttelt und mit 2 µl Fc-Block bei 4 °C für 10 min inkubiert. Diese Zelllösung wurde mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern versetzt (anti-CD 45 PerCP-konjugiert, anti-GR-1 PE-konjugiert und anti-F4-80 APC-konjugiert, 3 µl pro 300 000 Zellen) und 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 500 µl BD- FACS-Lysing Solution (1X) hinzugegeben und wiederum für 10 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Proben mit BD FACS CellWASH aufgefüllt und für 5 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 500 µl BD FACS CellWASH resuspendiert. Es folgte die Messung der Proben mit dem BD FACS Calibur und der BD CellQuest Pro Software (Version 4.0.2). Entsprechend dem Maß des Vorwärtsstreulichtes (FSC) und des Seitwärtsstreulichtes (SSC) der einzelnen Zellen sowie den spezifisch gebundenen Fluorochrom-markierten Antikörpern wurde der Anteil der Alveolarmakrophagen, der Lymphozyten und der polymorphkernigen (neutrophilen) Granulozyten in der Zellsuspension bestimmt.

2.8.3 Differenzierung der Leukozyten im Blut

Die Quantifizierung und die Differenzierung der Leukozyten im Blut erfolgte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie. Von der Vollblutprobe wurden sofort nach Entnahme 60 µl in ein EDTA-Blutröhrchen gegeben und auf Eis gelagert. Je 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper anti-GR-1 PE und anti-CD45 PerCP wurden in ein BD TruCount-Röhrchen pipettiert. Es wurden 50 µl EDTA-Vollblut hinzugegeben und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Als nächstes wurden 450 µl BD-FACS Lysing Solution hinzugefügt und wieder für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgt die Analyse der Leukozyten mit

dem BD FACS Calibur und der BD CellQuest Pro Software (Version 4.0.2). Es wurden die Populationen der Lymphozyten, der Monozyten und der polymorphkernigen (neutrophilen) Granulozyten unterschieden. Die TruCount-Röhrchen enthalten zudem kleine fluorochrommarkierte Kügelchen (*beads*) in definierter Menge. Aus dem Verhältnis von *beads* zu Leukozyten in der Messung wurde (durch die Software) die Gesamtleukozytenzahl pro μl Vollblut bestimmt.

2.9 Zytokinquantifizierung in BALF und Plasma mittels Bio-Plex-Assay

Die Zytokinquantifizierung wurde mit Blutplasma sowie dem zellfreien Überstand der BALF1 durchgeführt. Das Plasma wurde durch Zentrifugation aus dem Vollblut gewonnen. Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Quantifizierung der Zytokine in der BALF wurde ein *Bio-Plex Mouse 9-Plex Assay* der Firma BIO-RAD für folgende Zytokine verwendet: IFN- γ , IL-1 β , IL-10, IL-18, KC, MCP-1, MIP-2, RANTES, und TNF- α . Für das Plasma wurde ein *Bio-Plex Mouse Plex Assay* für das Zytokin IL-6 verwendet. Der Bio-Plex Assay erlaubt eine gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Zytokine in einer einzigen Probe.

Zuerst wurde der Zytokinstandard entsprechend Herstellerangaben gelöst und 30 min auf Eis inkubiert und in einer Verdünnungsreihe in 7 Schritten jeweils 1:4 verdünnt. Die Filterplatte (96-well) wurde mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ Assaypuffer pro Vertiefung befeuchtet und der überschüssige Puffer wieder durch Vakuumfiltration abgesaugt. Die Beads wurden 1:10 mit Assaypuffer verdünnt und je $50\text{ }\mu\text{l}$ in die einzelnen Vertiefungen gegeben. Anschließend erfolgte das zweimalige Waschen jeder Vertiefung mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer. Daraufhin wurden je $50\text{ }\mu\text{l}$ BALF1 Überstand pur, Plasma (1:4 Verdünnt in Sample Diluent) oder Zytokinstandard in die Vertiefungen gegeben. Die Platte wurde für 30 sec auf dem Schüttler bei 1100 rpm aufgeschüttelt und dann 30 min bei 300 rpm lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer und die Zugabe von $25\text{ }\mu\text{l}$ Detektionsantikörpern (AK-Stock (10X) vorher 1:10 in Detection Antibody Diluent verdünnt) je Vertiefung. Wiederum erfolgte 30 sec Aufschütteln mit 1100 rpm, 30 min Inkubation bei 300 rpm und dreifaches Waschen mit je $100\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer. Die gebundenen Detektionsantikörper wurden mit $50\text{ }\mu\text{l}$ /Vertiefung Streptavidin-Phycoerythrin-Lösung (1X) markiert. Nach 10 min Inkubation wurde die Platte wiederum dreimal mit $100\text{ }\mu\text{l}$

Waschpuffer gewaschen. Die Streptavidin-Phycoerythin-markierten Beads wurden mit 125 µl Analysepuffer resuspendiert und 30 sec bei 1100 rpm aufgeschüttelt. Schlussendlich erfolgte die Messung der Zytokinkonzentrationen im Bio-Plex Array Reader mit der Bioplex Manager 6.0 Software.

2.10 Bakterienlast in der Lunge und im Blut

Zur Bestimmung der Bakterienlast der Lunge wurden die Tiere wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben präpariert. Am Ende der Präparation wurde die Lunge ohne Hilus und pulmonale Lymphknoten entnommen, zerkleinert und durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit PBS auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Daraufhin wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und 10 µl Lungensuspension pur sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 auf eine Columbia-Agarplatte mit 5 % Schafblut ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die entstandenen Bakterienkolonien ausgezählt und, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die Zahl der koloniebildenden Einheiten in der gesamten Lunge berechnet.

Die Bestimmung der Bakterienlast im Blut erfolgte entsprechend durch Auftragen von 10 µl Blut unverdünnt sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 auf Columbia-Blutagarplatten, Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ und dem Auszählen der Kolonien.

2.11 Bestimmung der Viruslast in der Lunge mittels Virus-Plaque-Assay

2.11.1 Vorbereitung

Für den Virus-Plaque-Assay wurden *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells* (MDCK-II) Zellkulturen benutzt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort in MEM-Zellkulturmedium (*minimal essential medium*, versetzt mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin) aufgenommen, um zytotoxische Effekte durch das DMSO im Gefriermedium zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit 13 ml MEM-Zellkulturmedium in eine 75 cm² Zellkulturflasche aufgenommen und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bis ein konfluenter einschichtiger Zellrasen (*Monolayer*) entstanden war. Das Medium wurde entfernt, die Zellen darauf mit sterilem PBS

gewaschen, mit 2 ml Trypsin von der Flasche gelöst und in 8 ml frisches Zellkulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension (250 µl pro Well) wurde auf 12-Well-Zellkulturplatten mit je 1 ml Zellkulturmedium verteilt. Es erfolgte eine Inkubation von 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂, bis in den Vertiefungen der Platte ein konfluenter Zellrasen entstanden war.

Für die Probengewinnung wurden die Tiere wie in Kapitel 2.7.2 präpariert. Die Lunge wurde ohne Hilus und pulmonale Lymphknoten entnommen, zerkleinert und durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit PBS auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt und mit einem Ultra-Turrax Dispergiergerät homogenisiert um einen Zellaufschluss zu gewährleisten. Die entstandene Suspension wurde bei 4000 rpm 10 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis zur späteren Untersuchung bei -80 °C gelagert.

2.11.2 Virus-Plaque-Assay

Zuerst erfolgte nach dem Auftauen der Lungenhomogenatüberstände auf Eis die Herstellung einer Verdünnungsreihe in 7 Verdünnungsstufen (jeweils 1:10) mit PBS (unter Zugabe von 0,2 % BSA, 1mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin). Anschließend wurde das Zellkulturmedium aus der 12-Well Zellkulturplatte entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung wurden 150 µl Probenverdünnung aufgetragen und 45 min bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schwenken inkubiert. Die Probenverdünnung wurde anschließend abgesaugt und je 1 ml Überschichtungsmedium (bestehend aus 486 µl 2,5 % Avicell-Suspension, 486 µl 2XMEM, 6,7 µl 30 % BSA, 10 µl 5 % NaHCO₃, 10 µl 1 % Dextran, 1 µl TPCK Trypsin (1mg/ml)) in jede Vertiefung gegeben. Daraufhin wurde die Platte für 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ ohne Bewegung inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Überschichtungsmedium abgesaugt und die Zellen zweifach mit PBS gewaschen. Der Zellrasen wurde daraufhin mit je 400 µl/Vertiefung Färbelösung (0,1 % Kristallviolett, 2 % Ethanol, 9 % Formaldehyd) angefärbt und fixiert. Nach 20 min war der intakte Zellrasen makroskopisch blau angefärbt und die Färbelösung wurde wieder entfernt. Anschließend wurde die Zahl der Plaques (virusinduzierte kreisrunde Lücken im Zellrasen) pro Vertiefung als Maß für die infektiösen Einheiten (*plaque forming units*, pfu) erfasst. Anhand des eingesetzten Volumens und der Verdünnung in der Vertiefung konnte daraufhin die Zahl der pfu in der gesamten Lunge errechnet werden.

2.12 Histologie

Die histologische Aufarbeitung und Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Kristina Dietert und Prof. Dr. Achim Gruber vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Die Präparation der Tiere erfolgte grundsätzlich wie unter Kapitel 2.7.2 beschrieben, jedoch ohne Durchführung der Ventilation, der Perfusion und der Lungenlavage. Nach Exsanguination des Tieres wurde die Trachea noch vor der Eröffnung des Thorax ligiert, um ein Kollabieren der Lunge zu verhindern. Anschließend wurde der Thorax entlang des Sternums unter Schonung der Lunge eröffnet. Es erfolgte die Entnahme der intakten Lunge mit Trachea und Überführung in 3,7 % Formaldehydlösung.

Im Institut für Veterinärpathologie wurden die fixierten Lungen in Paraffin eingebettet, 2 µm-dicke Gewebsschnitte hergestellt und mittels Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) gefärbt. Die pathologische Beurteilung der Lungenveränderungen hinsichtlich ihrer Qualität und quantitativen Ausbreitung erfolgte verblindet durch Kristina Dietert.

2.13 Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde *GraphPad PRISM 4.02* der Firma Graph Pad Software Incorporated verwendet. Die Ergebnisse der Leukozytendifferenzierung, der Zytokinquantifizierung und der klinischen Parameter sind als Mittelwert und Standardfehler (SEM), die Virus- und Bakterienlast sind als Einzelwerte und Median angegeben. Der Vergleich der Überlebenszeit der Tiere wurde als Kaplan-Meier-Kurve dargestellt und mit dem log-rank-Test statistisch überprüft. Die statistische Testung erfolgte für Versuchsreihen mit lediglich zwei experimentellen Gruppen zu einem einzigen Zeitpunkt mit dem Mann-Whitney U-Test. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Testung mittels One-way ANOVA (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns post-hoc Test für relevante Gruppen). Für Vergleiche mehrerer Gruppen mit multiplen, zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen erfolgte die Testung mit Two-way ANOVA. Die statistische Auswertung der Zytokinquantifizierung erfolgte lediglich für Gruppen deren Einzelwerte oberhalb des Detektionslimits lagen. p-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der Immunantwort durch MALP-2 nach Influenzavirusinfektion

Zur Untersuchung der Wirkung von MALP-2 in der Influenzavirus-infizierten Mauslunge wurden Tiere mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine Scheininfektion mit PBS. Fünf Tage später wurde 0,5 µg MALP-2 intratracheal appliziert. Eine kontrollbehandelte Gruppe erhielt entsprechend Kontrolllösung. Einen weiteren Tag später erfolgte im Rahmen der finalen Probennahme die bronchoalveoläre Lavage (BAL) und die Blutentnahme zur weiteren Untersuchung der nachfolgend beschriebenen Parameter (Abbildung 6).

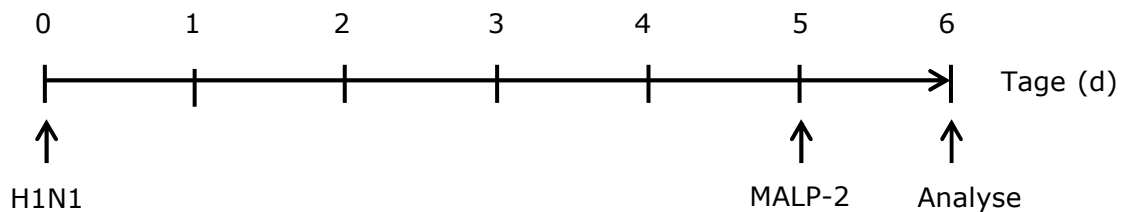


Abbildung 6: Schematischer Versuchsablauf Teil 1.

3.1.1 MALP-2 führte zu vermehrtem Einstrom von Leukozyten in die Influenzavirus-infizierte murine Lunge

Die Bestimmung des Einflusses von MALP-2 auf die zelluläre Immunantwort in der Influenzavirus-infizierten Mauslunge erfolgte durch eine Analyse der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie 6 d nach Influenzavirusinfektion (entspricht 1 d nach MALP-2).

Ohne MALP-2 zeigten die Influenzavirus-infizierten Tiere im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen erhöhte Zahlen an neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BALF. Die lokale MALP-2-Applikation induzierte bei Tieren ohne Infektion ebenfalls einen Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge. In den infizierten Tieren führte die MALP-2-Behandlung zu einem zusätzlichen, signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen im bronchoalveolären Raum (Abbildung 7).

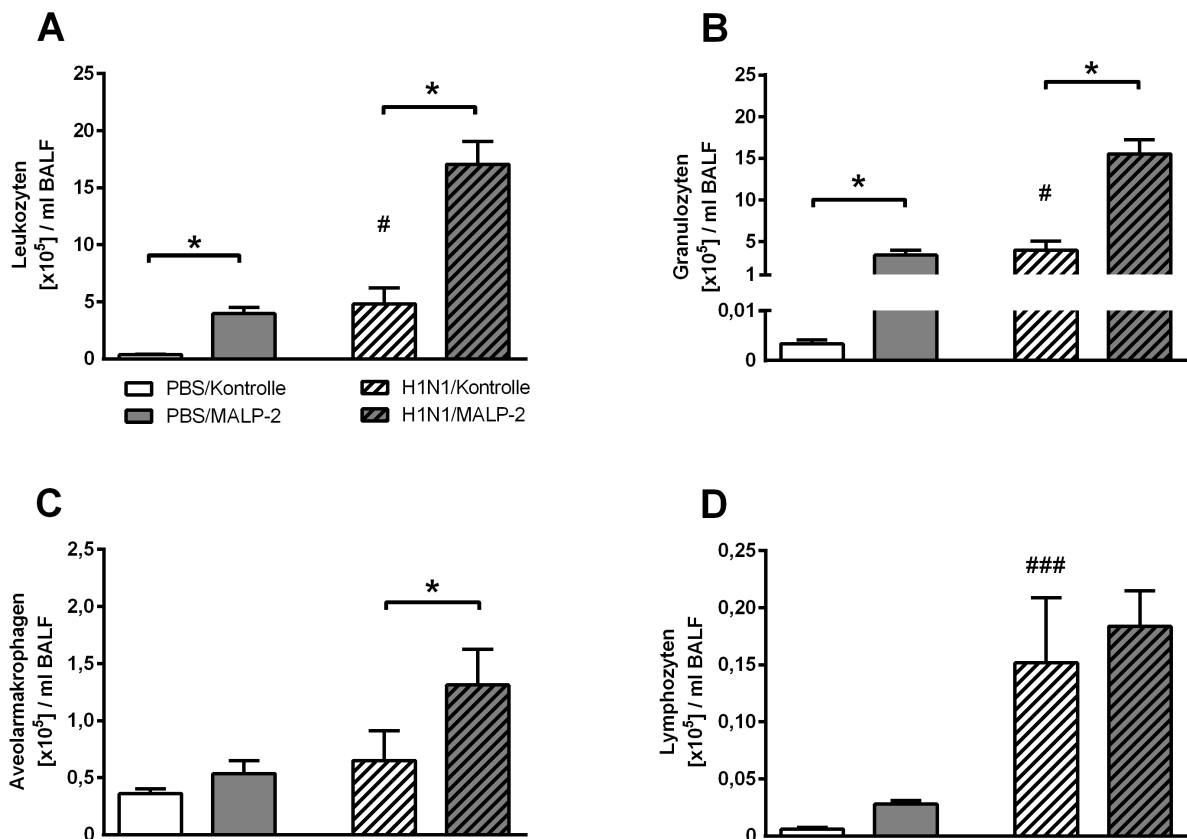


Abbildung 7: **Leukozytendifferenzierung in der BALF nach MALP-2-Applikation.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurde eine BAL durchgeführt und die Leukozyten (A) in der BALF mit der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (C) und Lymphozyten (D) wurden mittels Durchflusszytometrie differenziert. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 6-8). *p < 0,05 (Vergleich zwischen den markierten Gruppen) bzw. #p < 0,05; ###p < 0,001 (Vergleich zur nicht-infizierten kontrollbehandelten Gruppe).

3.1.2 MALP-2 führte zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren in der Influenzavirus-infizierten murinen Lunge

Zur Untersuchung der Modifikation der Entzündungsreaktion durch MALP-2 in der Influenzavirus-infizierten Mauslunge erfolgte eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) mit Untersuchung der Lavageflüssigkeit auf die Zytokine IL-1 β , IL-10, IFN- γ , KC, MCP-1, RANTES, IL-18, TNF- α und MIP-2 mittels *Bio-Plex Cytokine Assay* 6 d nach Influenzavirusinfektion (entspricht 1 d nach MALP-2-Applikation).

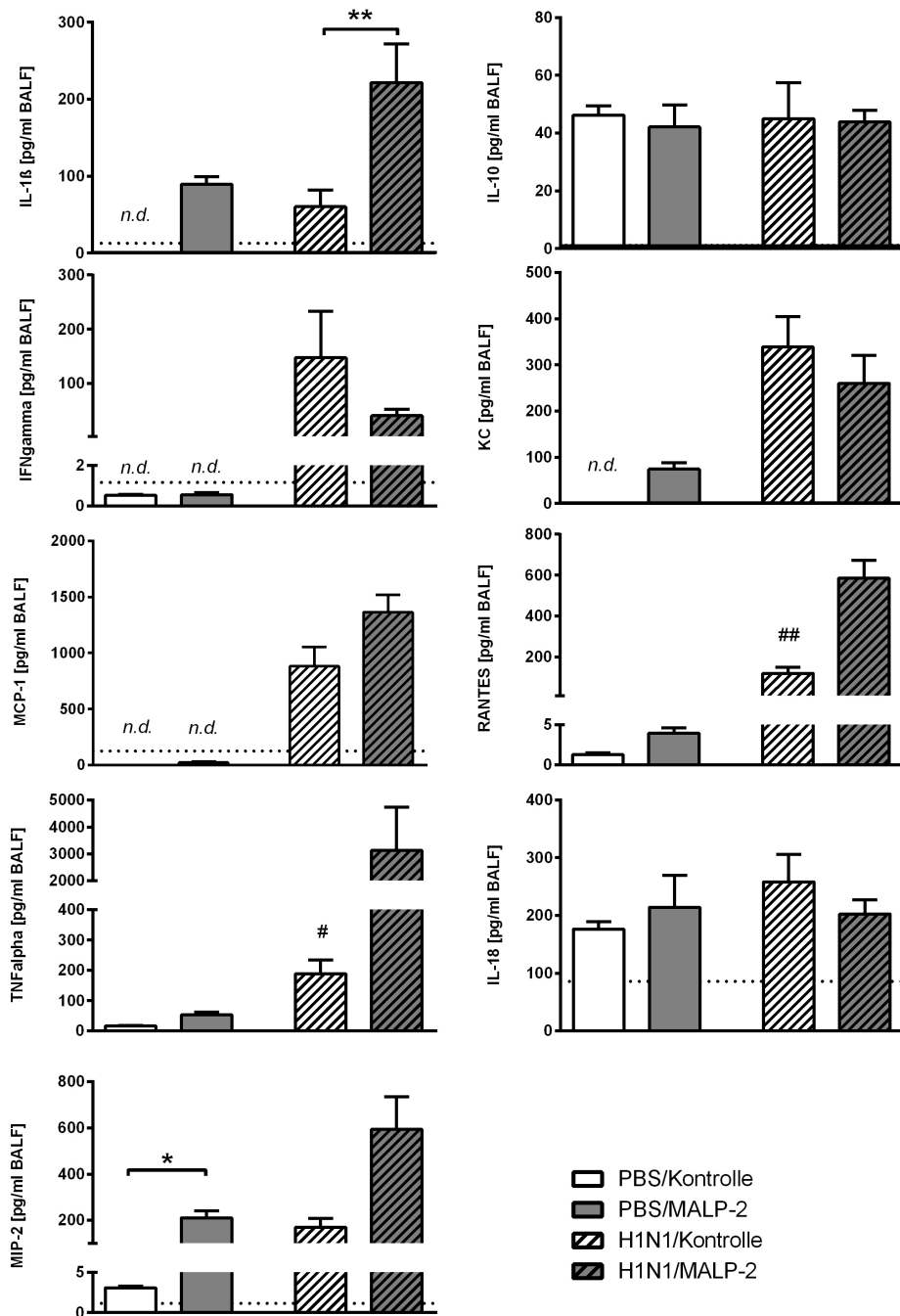


Abbildung 8: **Zytokinkonzentration in der BALF nach MALP-2-Applikation.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurde eine BAL durchgeführt und die Zytokine IL-1 β , IL-10, IFN- γ , KC, MCP-1, RANTES, IL-18, TNF- α und MIP-2 im zellfreien Überstand der BALF mittels *Bio-Plex Cytokine Assay* quantifiziert. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 5-8). Die untere Detektionsgrenze des *Bio-Plex Cytokine Assays* wird durch die Strichlinie angezeigt. n.d. (nicht detektierbar) Werte unterhalb der Detektionsgrenze. *p < 0,05; **p < 0,01 (Vergleich zwischen den markierten Gruppen) bzw. #p < 0,05; ##p < 0,01 (Vergleich zur nicht-infizierten kontrollbehandelten Gruppe).

In den kontrollbehandelten Tieren induzierte die Influenzavirusinfektion die Freisetzung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , KC, MCP-1 und RANTES in den bronchoalveolären Raum. Die lokale Stimulation mit MALP-2 führte bei den nicht-infizierten Tieren zu erhöhten Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , KC, und MIP-2 in der BALF. Erhielten die Influenzavirus-infizierten Tiere MALP-2 appliziert, erhöhte sich der Level des Zytokins IL-1 β nochmals signifikant gegenüber den kontrollbehandelten infizierten Tieren (Abbildung 8).

3.1.3 Die Wirkung von MALP-2 auf die Entzündungsreaktion blieb lokal begrenzt

Um die Wirkung der intratrachealen MALP-2-Applikation auf die systemische Immunantwort im Organismus zu beurteilen, erfolgte die Analyse der weißen Blutzellen im Blut mittels Durchflusszytometrie und die Quantifizierung des Zytokins IL-6 im Blutplasma mittels *Bio-Plex Cytokine Assay* als Marker einer systemischen Entzündungsreaktion 6 d nach Influenzavirusinfektion (entspricht 1 d nach MALP-2-Applikation).

Influenzavirus-infizierte kontrollbehandelte Tiere zeigten eine signifikant erhöhte Zahl neutrophiler Granulozyten im Blut gegenüber den scheininfizierten kontrollbehandelten Tieren bei sonst unveränderten Leukozytenzahlen. Die lokale Applikation von MALP-2 führte weder bei infizierten noch bei scheininfizierten Tieren zu einer signifikanten Änderung der Leukozytensubpopulationen im Blut (Abbildung 9).

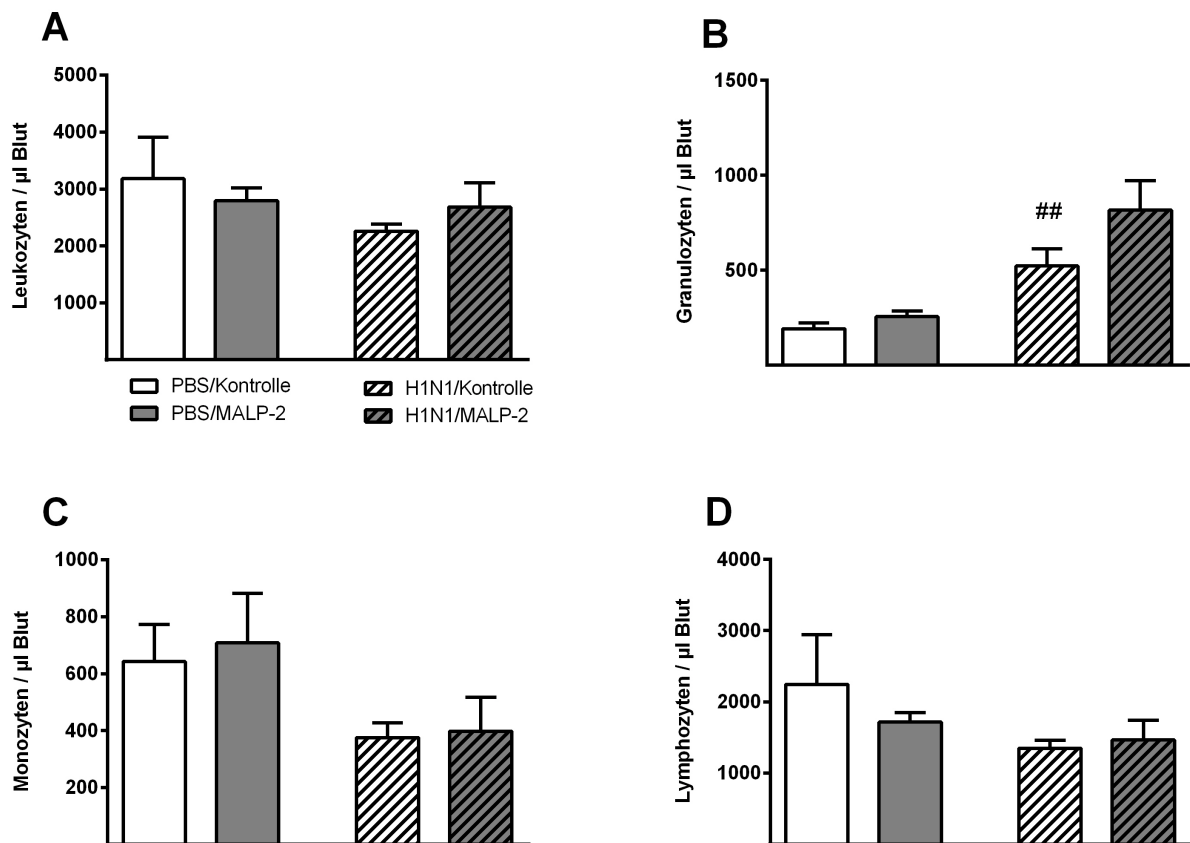


Abbildung 9: **Leukozytendifferenzierung im Blut nach MALP-2-Applikation.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle) und einen weiteren Tag später die Blutentnahme aus der *V. renalis sinister*. Die Quantifizierung der Leukozyten (A), Granulozyten (B), Monozyten (C) und Lymphozyten (D) wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 7-8). ##p < 0,01 (Vergleich zur nicht-infizierten kontrollbehandelten Gruppe).

Im Blutplasma der infizierten Tiere wurden signifikant erhöhte Konzentrationen des Zytokins IL-6 nachgewiesen. MALP-2 zeigte jedoch keinen weiteren Effekt auf die Freisetzung von IL-6 im Blut, weder bei nicht-infizierten Tieren noch bei Influenzavirus-infizierten Tieren (Abbildung 10).

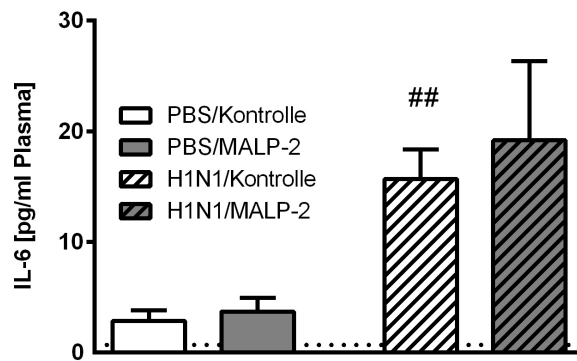


Abbildung 10: **Interleukin-6-Konzentration im Blutplasma.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später erfolgte die Blutentnahme aus der *V. renalis sinister* und die Quantifizierung von IL-6 im Blutplasma mittels *Bio-Plex Cytokine Assay*. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 6-8). Die untere Detektionsgrenze des *Bio-Plex Cytokine Assays* wird durch die Strichlinie angezeigt. ##p < 0,01 (Vergleich zur nicht-infizierten kontrollbehandelten Gruppe).

3.1.4 MALP-2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf den klinischen Verlauf der Influenzavirusinfektion

Um einen möglichen Einfluss von MALP-2 auf den klinischen Verlauf der Influenzavirusinfektion festzustellen, erfolgte im Verlauf von insgesamt 10 d nach Infektion eine Beurteilung der klinischen Parameter Körpermasse und Körpertemperatur. Die Influenzavirusinfektion führte zu einem deutlichen Abfall von Körpermasse und Körpertemperatur bei einer mittleren approximativen Überlebensrate von 20 %. MALP-2 zeigte dabei keine weitere Wirkung auf die Körpermasse oder die Körpertemperatur der infizierten Tiere. An Tag 9 und 10 war aufgrund der geringen Gruppengröße (n = 4/2) eine statistische Auswertung bezüglich Körpertemperatur und Körpermasse nicht möglich (Abbildung 11). Auch die approximative Überlebensrate wurde durch die lokale Stimulation mit MALP-2 nicht signifikant verändert (Abbildung 12).

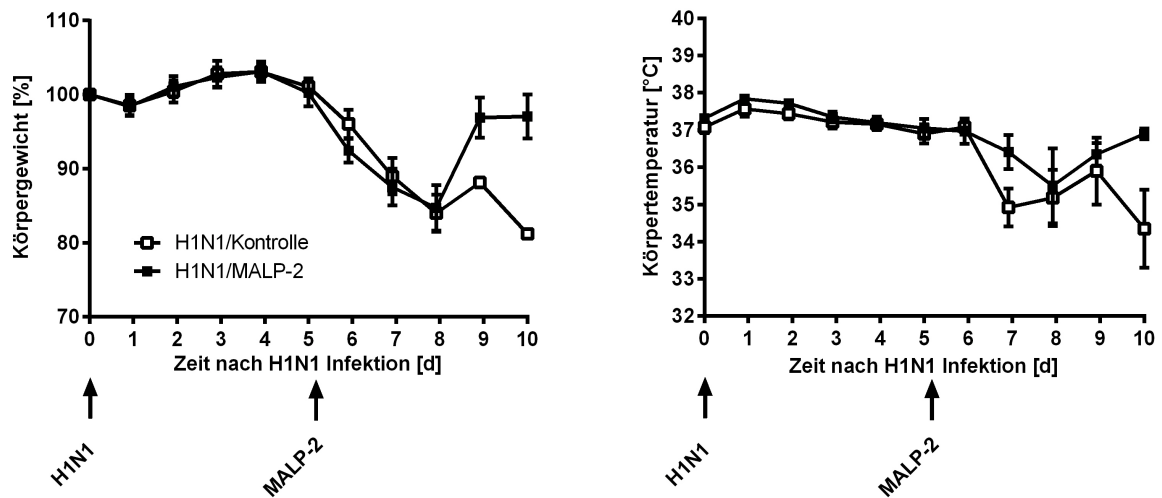


Abbildung 11: **Klinische Parameter im Verlauf von 10 d nach Influenzavirusinfektion.** Die Tiere (n = 10) wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Körpermasse (in % des Ausgangswertes) und die rektale Körpertemperatur gemessen und hier im Intervall von 24 h dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angeben. MALP-2/Kontrolle: n = 10/10 (Tag 0-7); n = 7/5 (Tag 8); n = 4/2 (Tag 9); n = 4/2 (Tag 10)

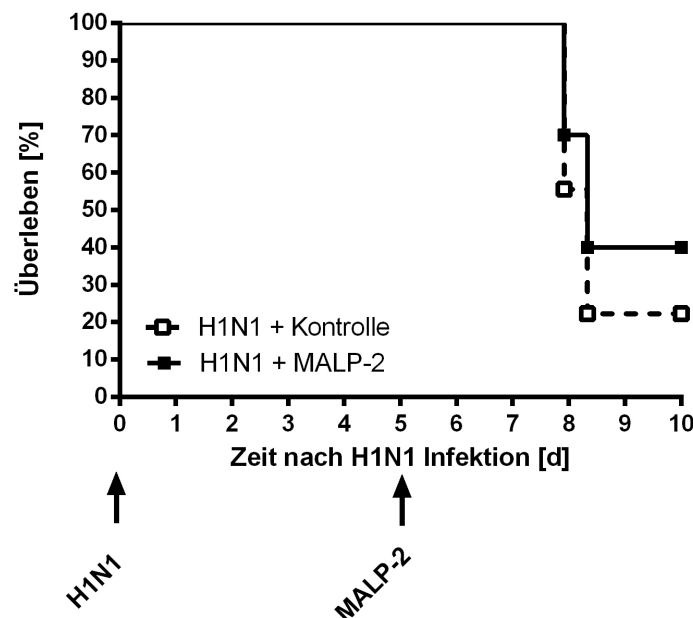


Abbildung 12: **Approximative Überlebensrate bei Influenzavirusinfektion und MALP-2-Behandlung.** Die Tiere (n = 10) wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Das approximative Überleben wurde über einen Zeitraum von insgesamt 10 d beobachtet.

3.2 Modulation der Immunantwort durch MALP-2 bei sekundärer *S. pneumoniae*-Pneumonie

Für die Untersuchung des Einflusses von MALP-2 auf die sekundäre *Streptococcus pneumoniae*-Pneumonie bei vorbestehender Influenzavirusinfektion wurden die Versuchstiere mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Die Kontrolltiere erhielten eine Scheininfektion mit PBS. Nach 5 d wurden 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung intratracheal appliziert. Einen weiteren Tag später erfolgte die transnasale Infektion mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* oder die Scheininfektion mit PBS. Insgesamt 7 d nach Influenzavirusinfektion wurde im Rahmen der finalen Probengewinnung die bronchoalveoläre Lavage, die Entnahme der Lunge und die Gewinnung von Blut für nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt (Abbildung 13).

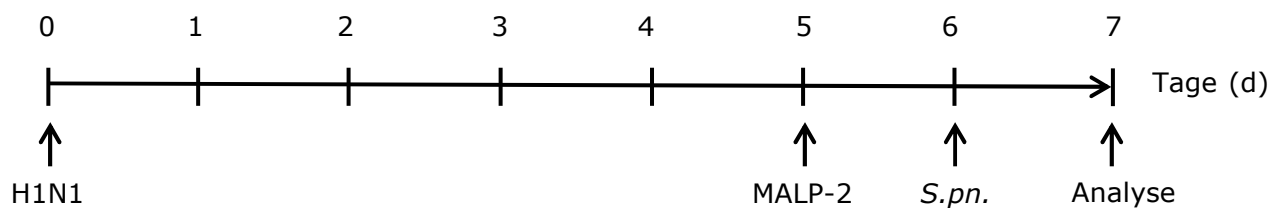


Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf Teil 2.

3.2.1 MALP-2 führte zu keinem zusätzlichen Einstrom von Leukozyten bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie

Zur Beurteilung der Wirkung der lokalen MALP-2-Stimulation in der Influenzavirus-infizierten Maus auf die pulmonale Rekrutierung von Immunzellen bei sekundärer Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Leukozytensubpopulationen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) 7 d nach der primären Influenzavirusinfektion (entspricht 2 d nach MALP-2-Applikation bzw. 1 d nach Infektion mit *S. pneumoniae*).

Dabei zeigten die H1N1-infizierten kontrollbehandelten Tiere 7 d nach primärer Infektion eine Rekrutierung von Leukozyten, Granulozyten, Alveolarmakrophagen und Lymphozyten in den bronchoalveolären Raum. Bei den allein mit Influenzavirus infizierten Tieren führte MALP-2 am Tag 7 nach Infektion zu einem zusätzlichen signifikanten Anstieg der Zahl der Gesamtleukozyten, insbesondere der Granulozyten in der BALF. Die sekundäre Infektion mit

S. pneumoniae induzierte allerdings keine weitere Einwanderung von Leukozyten über das Niveau der primären H1N1-Monoinfektion hinaus. Bei den sekundär mit *S. pneumoniae* infizierten Tieren kam es durch die MALP-2-Applikation zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der zellulären Immunantwort (Abbildung 14).

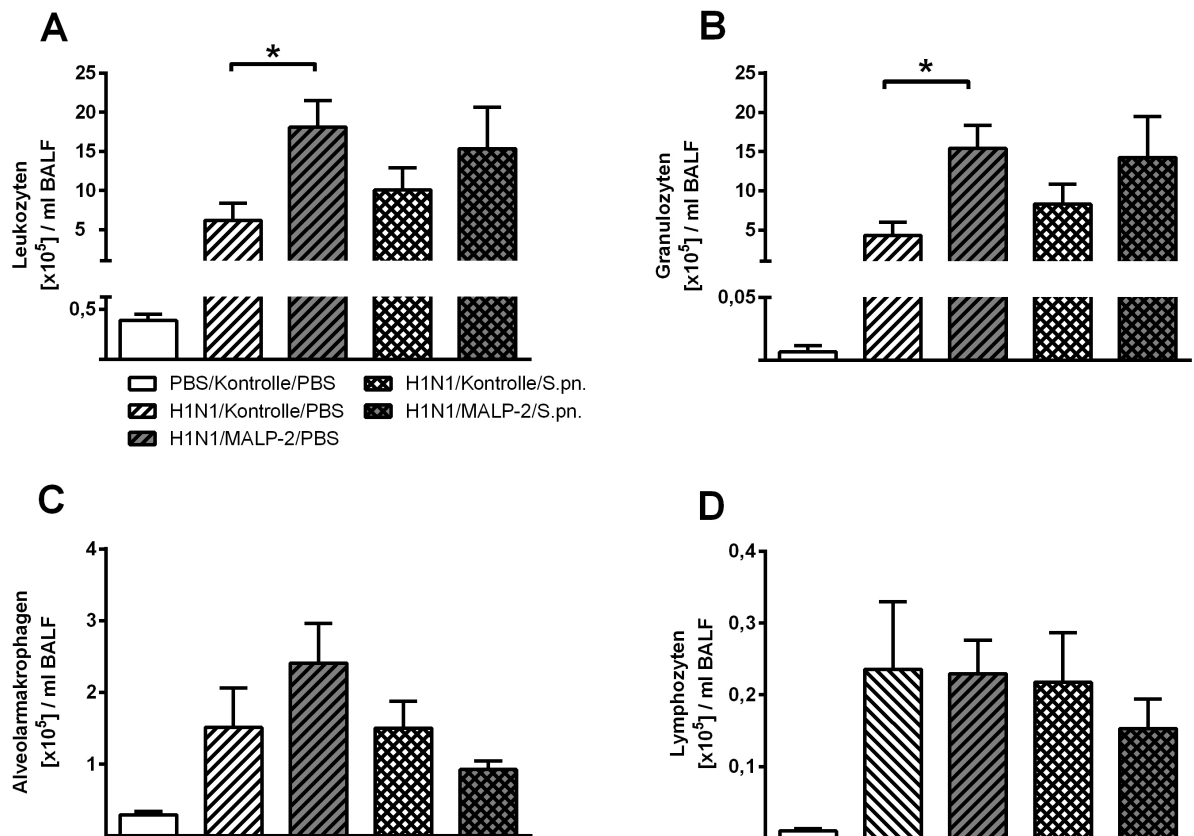


Abbildung 14: Leukozytendifferenzierung in der BALF nach sekundärer *S. pneumoniae*-Infektion. Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) wurde eine BAL durchgeführt und die Gesamtleukozytenzahl (A) in der BALF mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (C) und Lymphozyten (D) wurden mittels Durchflusszytometrie differenziert. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 5-8). *p < 0,05 (Vergleich zwischen den markierten Gruppen).

3.2.2 MALP-2 führte nicht zu einer Modulation der Zytokinproduktion in der Lunge bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie

Zur Analyse der Zytokinproduktion in der Lunge während einer sekundären Pneumokokkenpneumonie erfolgte die Untersuchung der Zytokine IL-1 β , IL-10, IFN- γ , MCP-1, RANTES, IL-18, TNF- α und MIP-2 in der BALF mittels *Bio-Plex Cytokine Assay* 7 d nach der Influenzavirusinfektion (entspricht 2 d nach MALP-2 bzw. 1 d nach Infektion mit *S. pneumoniae*).

Die Influenzavirusinfektion stimulierte die Produktion der Zytokine IL-10, IFN- γ , RANTES, TNF- α , IL-18 und MIP-2 gegenüber den scheininfizierten Kontrolltieren. Die MALP-2-Applikation induzierte am Tag 7 bei den nur mit Influenzavirus-infizierten Tieren die vermehrte Freisetzung des Zytokins MIP-2 im Vergleich zu den Tieren, die lediglich Kontrolllösung erhielten. Die sekundäre Infektion mit *S. pneumoniae* führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der untersuchten Zytokine gegenüber der Monoinfektion mit Influenza-A-Virus. Des Weiteren führte MALP-2 nach sekundärer *S. pneumoniae*-Infektion nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zytokinkonzentration in der BALF (Abbildung 15).

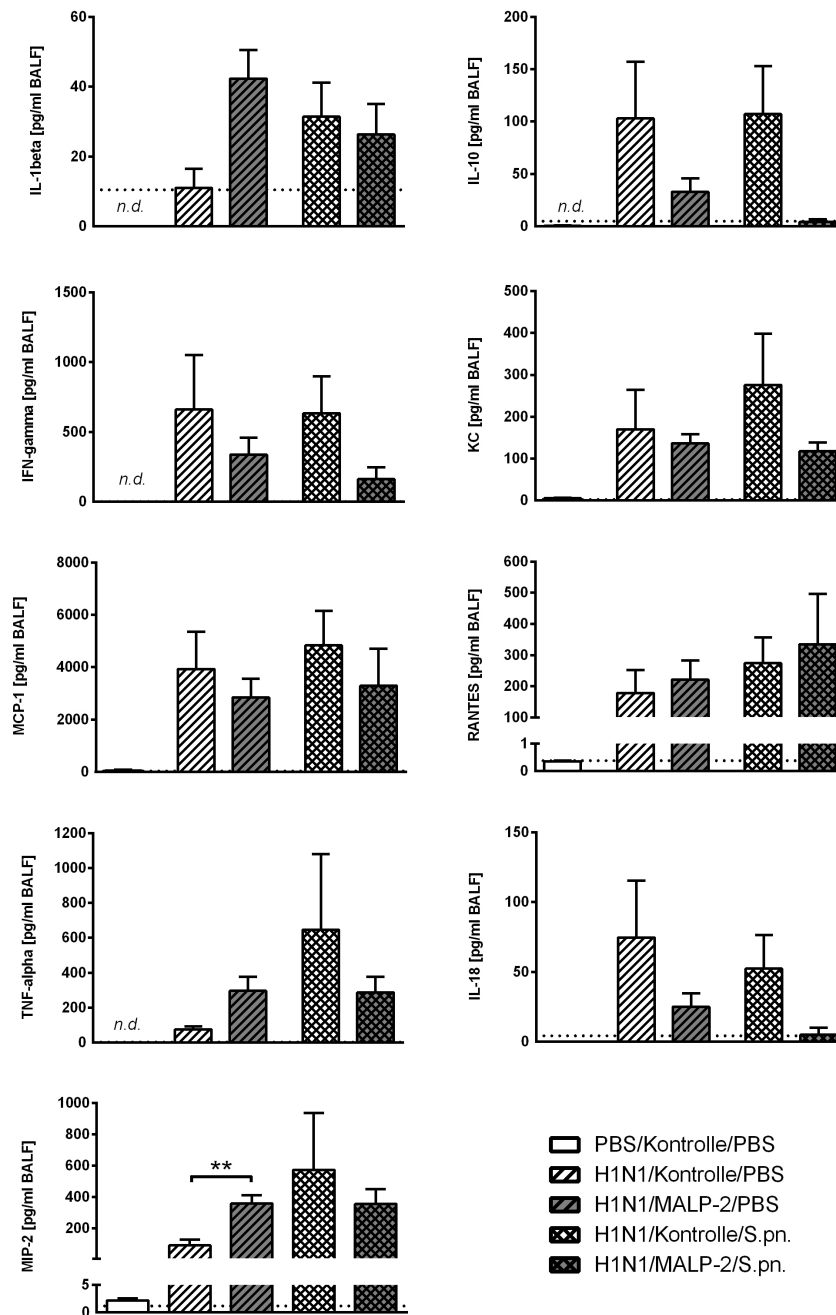


Abbildung 15: **Zytokinkonzentration in der BALF bei sekundärer bakterieller Pneumonie.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) wurde eine BAL durchgeführt und die Zytokine IL-1 β , IL-10, IFN- γ , KC, MCP-1, RANTES, IL-18, TNF- α und MIP-2 im zellfreien Überstand der BALF mittels *Bio-Plex Cytokine Assay* quantifiziert. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 2-8). Die untere Detektionsgrenze des *Bio-Plex-Assays* wird durch die Strichlinie angezeigt. *n.d.* (*nicht detektierbar*) Werte unterhalb der Detektionsgrenze. **p < 0,01 (Vergleich zwischen den markierten Gruppen). Aus technischen Gründen des *Bio-Plex-Assays* kam es zu abweichenden Gruppengrößen.

3.2.3 MALP-2 führte nicht zu einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion bei der sekundären Pneumokokkenpneumonie

Um den Effekt von MALP-2 auf die systemische Immunreaktion nach sekundärer Pneumonie zu untersuchen, erfolgte die Analyse der weißen Blutzellen im Blut mittels Durchflusszytometrie und die Bestimmung des *Interleukin-6* Levels im Blutplasma 1 d nach Infektion mit *S. pneumoniae* (entspricht 7 d nach Influenzavirusinfektion).

Im Blut der Influenzavirus-infizierten Tiere zeigte sich eine erhöhte Zahl von (polymorphkernigen) Granulozyten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen ($p < 0,05$). Weder die Infektion mit *S. pneumoniae* noch die Behandlung mit MALP-2 führten zu signifikanten Veränderungen der Leukozytensubpopulationen oder der Gesamtzahl weißer Blutzellen (Abbildung 16).

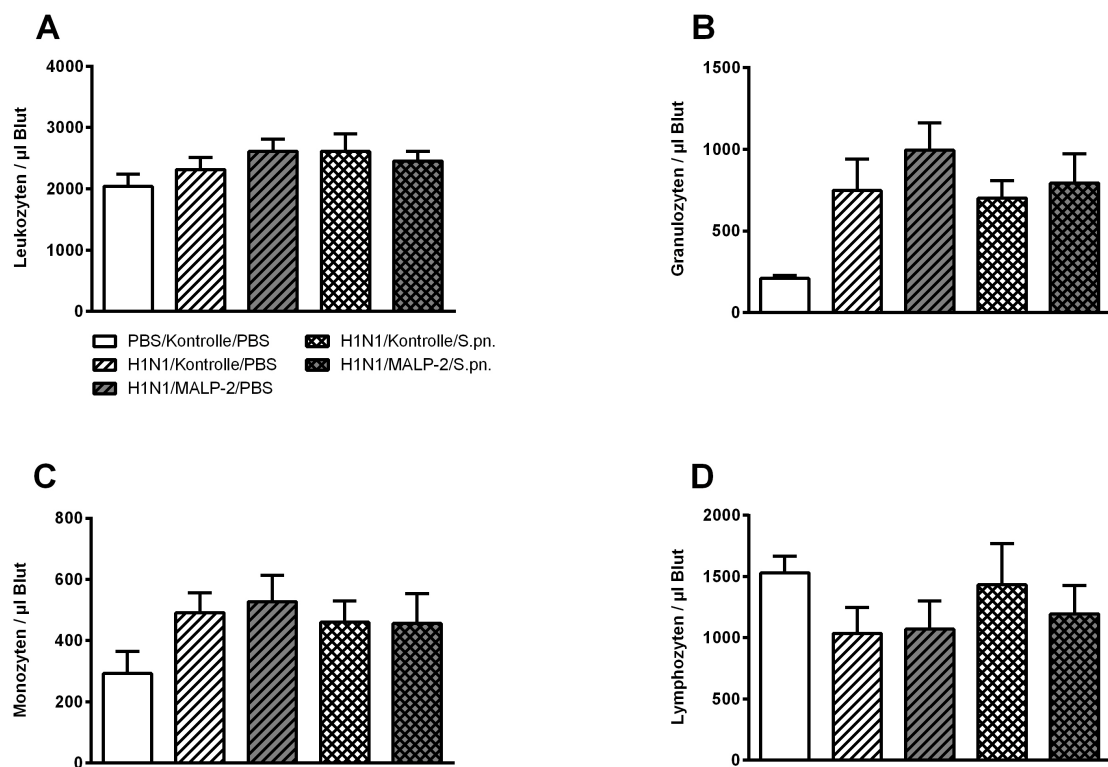


Abbildung 16: Leukozytendifferenzierung im Blut bei sekundärer *S. pneumoniae*-Pneumonie. Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) erfolgte die finale Blutentnahme aus der *V. renalis sinister*. Die Quantifizierung der Leukozyten (A), Granulozyten (B), Monozyten (C) und Lymphozyten (D) wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 5-8).

Die Influenzavirus-infizierten Tiere zeigten im Trend ($p = 0,10$) eine erhöhte IL-6 Plasmakonzentration im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen. Die sekundäre Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu keinem weiteren signifikanten Anstieg von IL-6 im Vergleich zur Monoinfektion. Durch die lokale MALP-2-Stimulation kam es nicht zu einer signifikanten Veränderung der IL-6-Konzentration, weder bei Influenzavirus-Monoinfektion noch nach sekundärer Pneumokokkeninfektion (Abbildung 17).

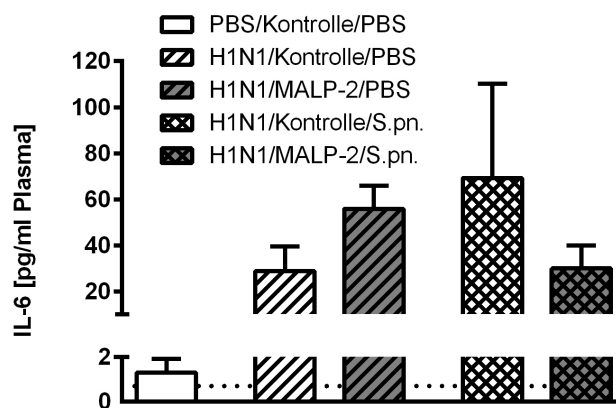
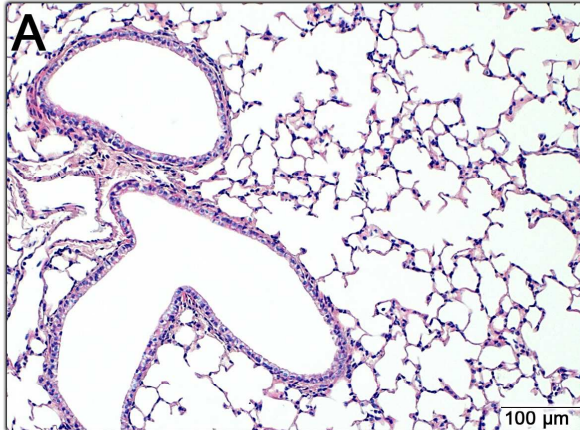


Abbildung 17: **Interleukin-6-Konzentration im Blutplasma bei sekundärer *S. pneumoniae*-Pneumonie.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) erfolgte die finale Blutentnahme aus der *V. renalis sinister* und die Messung von IL-6 im Blutplasma mittels *Bio-Plex Cytokine Assay*. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben ($n = 6-8$). Die untere Detektionsgrenze des *Bio-Plex Cytokine Assays* wird durch die Strichlinie angezeigt.

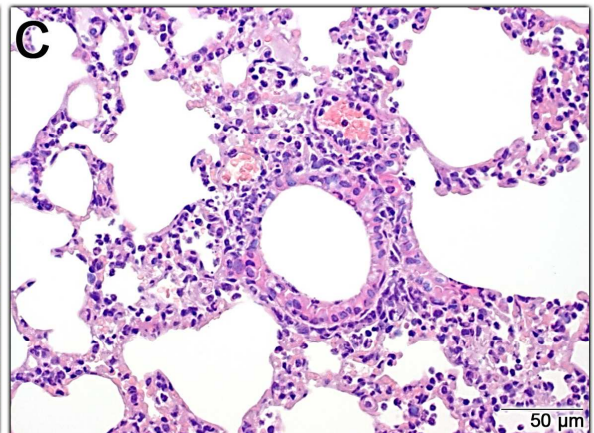
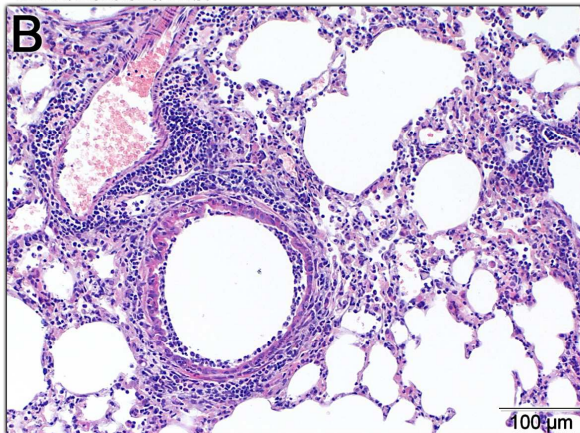
3.2.4 MALP-2 modifizierte die Verteilung von Granulozyten in der Influenzavirus-induzierten bronchointerstitiellen Pneumonie

Die histologische Aufarbeitung der murinen Lungen erfolgte 7 d nach Influenzavirusinfektion (entspricht 1 d nach Infektion mit *S. pneumoniae*). Die Beurteilung der HE-gefärbten histologischen Präparate erfolgte verblindet durch eine Veterinärpathologin. Die Lungen der nicht-infizierten Kontrollgruppe zeigten nur minimale, multifokale, interstitielle Infiltrate vor allem durch Makrophagen und nur wenige neutrophile Granulozyten, die vermutlich durch die transnasale und intratracheale Applikation von sterilem PBS und Kontrolllösung induziert wurden (Abbildung 18 A). Die ausschließlich Influenzavirus-infizierten Tiere zeigten das histopathologische Bild einer leicht- bis mittelgradigen, multifokalen, bronchointerstitiellen Pneumonie mit Infiltraten von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten hauptsächlich im Interstitium, sowie innerhalb von Bronchien und Alveolen. Des Weiteren fanden sich Bereiche mit Nekrosen des Bronchialepithels mit lokaler, luminaler Anhäufung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Abbildung 18 B und C). Die MALP-2-Applikation führte bei Influenzavirus-infizierten Lungen zu einem weiteren Einstrom von neutrophilen Granulozyten in das Bronchial- und Alveolarlumen auch unabhängig von Epithelzellnekrosen (Abbildung 18 D + E). Die sekundäre bakterielle Infektion mit *S. pneumoniae* führte zu einer eitrigen Bronchopneumonie (Abbildung 18 F). Durch MALP-2 kam es jedoch nach der sekundären Infektion zu keiner zusätzlichen nachweisbaren Veränderung der histologischen Lungenmorphologie (Abbildung 18 G).

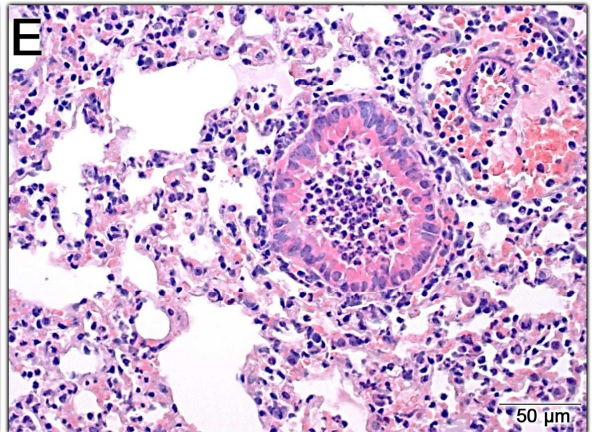
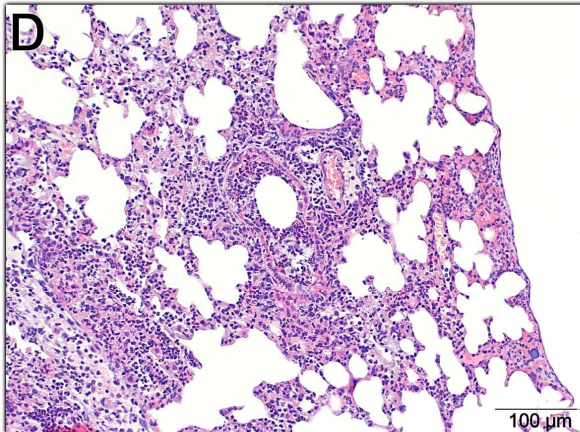
PBS/Kontrolle/PBS:



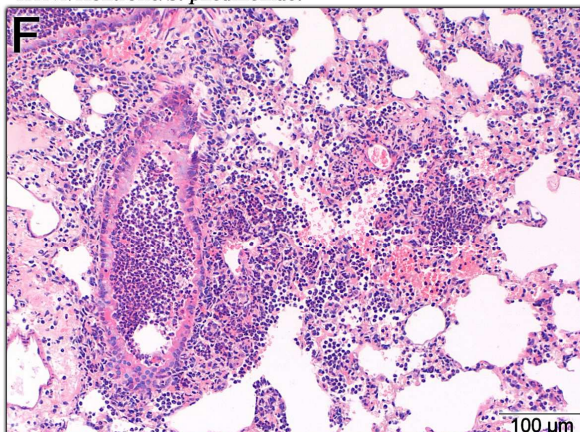
H1N1/Kontrolle/PBS:



H1N1/MALP-2/PBS:



H1N1/Kontrolle/*S. pneumoniae*:



H1N1/MALP-2/*S. pneumoniae*:

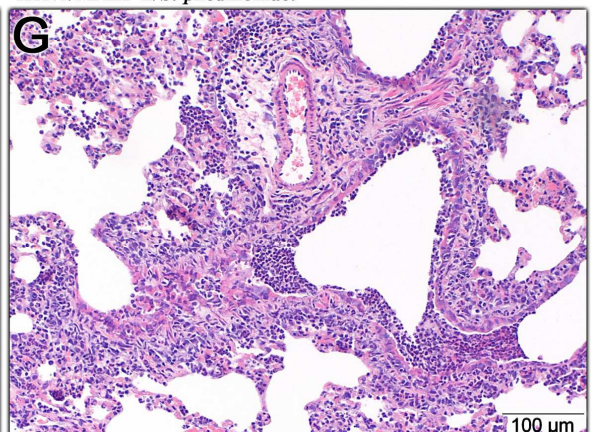


Abbildung 18: **Histologische Untersuchung der Lunge in HE-Färbung.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung. Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) wurde die Lunge als Ganzes entnommen, Formalin-fixiert, geschnitten und HE-gefärbt. (A) PBS/Kontrolle/PBS. (B, C) H1N1/Kontrolle/PBS. (D, E) H1N1/MALP-2/PBS. (F) H1N1/Kontrolle/*S. pneumoniae*. (G) H1N1/MALP-2/*S. pneumoniae*. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Gruppen (n = 3-4).

Es erfolgte auch eine mikroskopische, semiquantitative Bestimmung der entzündlich veränderten Bereiche der Lunge. Hierbei zeigte sich weder durch *S. pneumoniae* noch durch MALP-2 eine signifikante Ausbreitung der entzündlichen Lungenveränderungen (Abbildung 19).

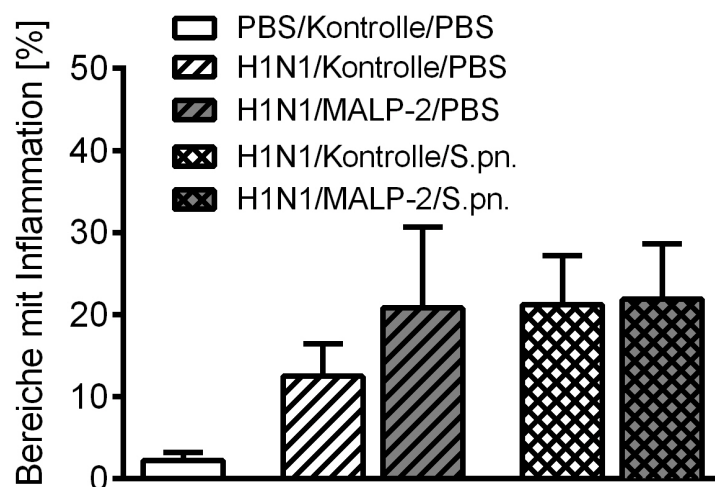


Abbildung 19: **Anteil der Lungenabschnitte mit entzündlichen Veränderungen an der Gesamtlunge.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) wurde die Lunge als Ganzes entnommen, Formalin-fixiert, geschnitten und HE-gefärbt. Es erfolgte eine mikroskopische semiquantitative Bestimmung der betroffenen Lungenabschnitte. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardfehler (SEM) angegeben (n = 3-4).

3.2.5 MALP-2 hatte keinen Einfluss auf die Viruslast

Der Einfluss von MALP-2 auf die Viruslast bei sekundärer Pneumokokkeninfektion wurde mittels *Virus-Plaque-Assay* von Lungenhomogenatüberständen untersucht. Die Bestimmung der *plaque forming units* erfolgte 7 d nach Influenzavirusinfektion (entspricht 1 d nach Infektion mit *S. pneumoniae*). MALP-2 behandelte Tiere zeigten dabei keine signifikante Veränderung der Viruslast (Abbildung 20).

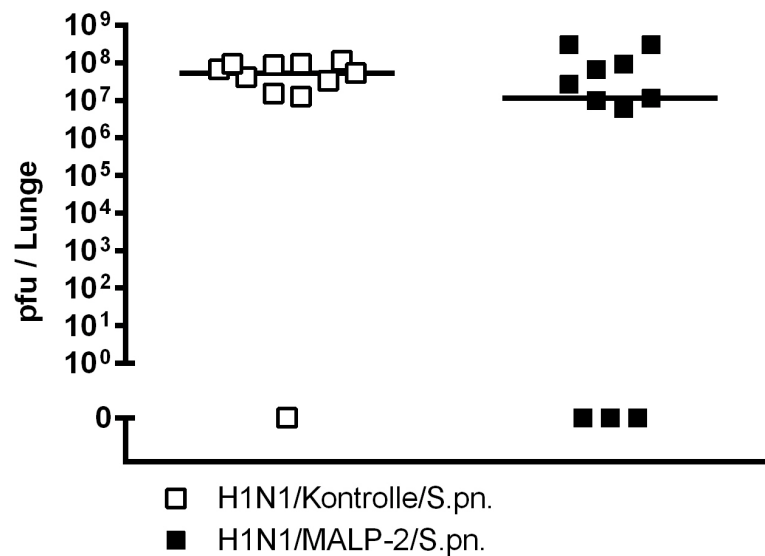


Abbildung 20: **Viruslast in der Lunge 7 d nach Influenzavirusinfektion.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) wurde die Lunge entnommen, homogenisiert und die Viruslast in den Überständen mittels *Virus-Plaque-Assay* als *plaque forming units* (pfu) bestimmt. Alle Werte sind als Einzelwerte und Median angeben (n = 11).

3.2.6 MALP-2 reduzierte die Bakterienlast bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie

Um den Effekt der MALP-2-Behandlung in der Influenzavirus-infizierten Lunge auf die bakterielle Elimination durch das pulmonale Immunsystems zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu) von *Streptococcus pneumoniae* in der murinen Lunge. Die MALP-2-behandelten Tiere zeigten dabei eine signifikant niedrigere bakterielle Erregerlast in der Lunge im Vergleich zu unbehandelten infizierten Kontrollen (Abbildung 21).

Es erfolgte darüber hinaus auch eine Bestimmung der bakteriellen Last im Blut. Dabei konnte lediglich bei zwei (von 11) Tieren der kontrollbehandelten, infizierten Gruppe und bei keinem der MALP-2-behandelten, infizierten Tiere ein Wachstum von *S. pneumoniae* aus der Blutkultur beobachtet werden. Daher ist hier keine statistische Aussage über den Einfluss des MALP-2 auf die Entstehung und das Ausmaß einer Bakteriämie möglich (Abbildung 22).

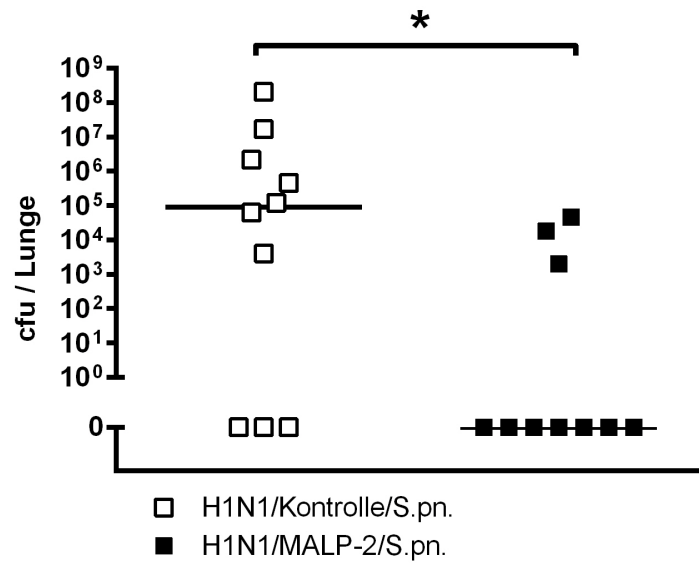


Abbildung 21: **Bakterienlast in der Lunge 1 d nach sekundärer *S. pneumoniae*-Infektion.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu) in der gesamten Lunge. Alle Werte sind als Einzelwerte und Median angeben (n = 10). *p < 0,05.

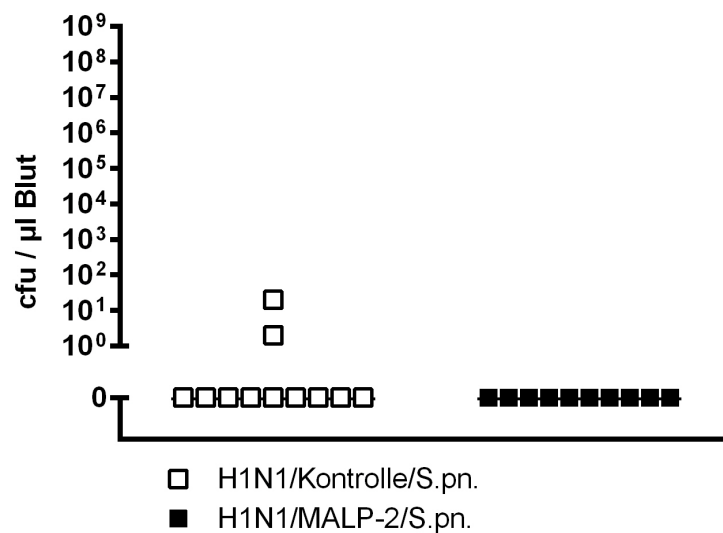


Abbildung 22: **Bakterienlast im Blut 1 d nach sekundärer *S. pneumoniae*-Infektion.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung (Kontrolle). Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Am Versuchsende (Tag 7) erfolgte die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (cfu) im Blut. Alle Werte sind als Einzelwerte und Median angeben (n = 10-11).

3.3 Pulmonale MALP-2-Stimulation verbesserte die approximative Überlebensrate der Maus bei sekundärer *S. pneumoniae*-Pneumonie

Die Beurteilung des klinischen Verlaufs einschließlich der approximativen Überlebensrate der Infektion mit Influenza-A-Virus und nachfolgender sekundärer Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt 10 Tagen. Fünf Tage nach Influenzavirusinfektion wurden die Tiere intratracheal mit MALP-2 oder Kontrolllösung behandelt. Nach einem weiteren Tag (an Tag 6) erfolgte die sekundäre *S. pneumoniae*-Infektion. Während in der MALP-2-behandelten Gruppe die approximative Überlebensrate nach der sekundären Pneumokokkeninfektion 50 % betrug, erreichten alle Tiere der Kontrollgruppe bereits vor Versuchsende die definierten Tötungskriterien (Abbildung 23). Somit verbesserte die lokale Immunstimulation mit MALP-2 in Influenzavirus-infizierten Tieren die approximative Überlebensrate bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie signifikant ($p = 0,011$).

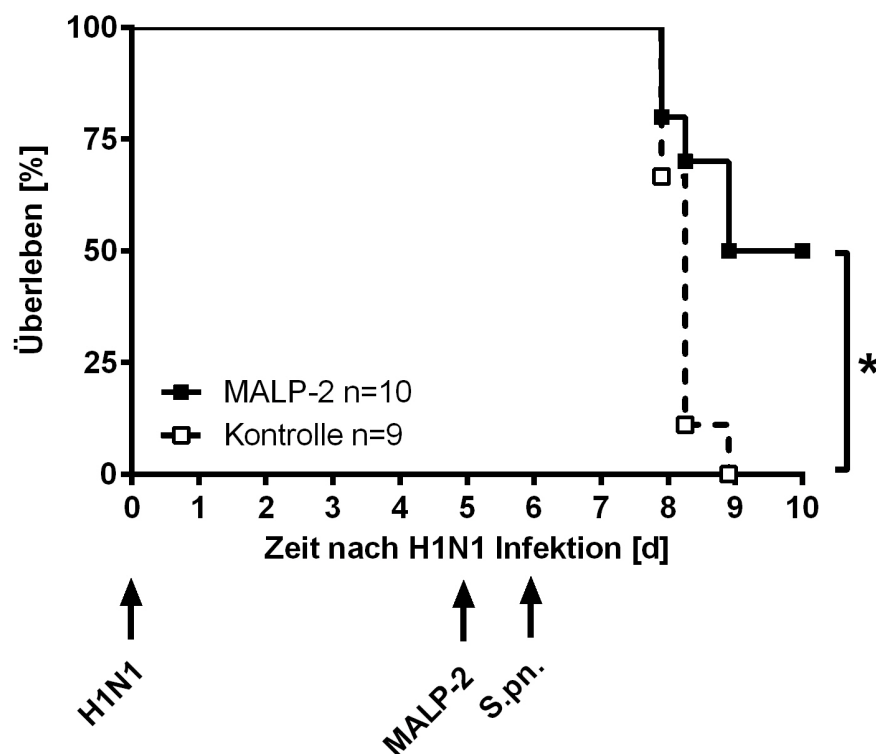


Abbildung 23: **Approximative Überlebensrate nach MALP-2-Behandlung bei Influenza und sekundärer Pneumokokkenpneumonie.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung. Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von insgesamt 10 d beobachtet. * $p < 0,05$ (Vergleich zwischen den Gruppen).

Während des Versuchszeitraums von 10 d erfolgte die Beurteilung des klinischen Zustands der Tiere anhand der Parameter Körpermasse und Körpertemperatur. In Relation zur Ausgangskörpermasse von 100 % zum Versuchsbeginn (Tag 0) ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im Verlauf der Körpermasseentwicklung (Abbildung 24). Der absolute Gewichtsverlust innerhalb der ersten 24 h nach *S. pneumoniae*-Infektion war allerdings in der MALP-2-behandelten Gruppe ($\Delta m = -0,49$ g) im Vergleich zur kontrollbehandelten, infizierten Gruppe ($\Delta m = -1,6$ g) signifikant geringer ($p < 0,001$). Auch zeigten die MALP-2-behandelten Tiere einen Tag nach der sekundären Pneumokokkeninfektion (entspricht Tag 7 nach H1N1-Infektion) eine signifikant bessere Körpertemperatur im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren (Abbildung 25).

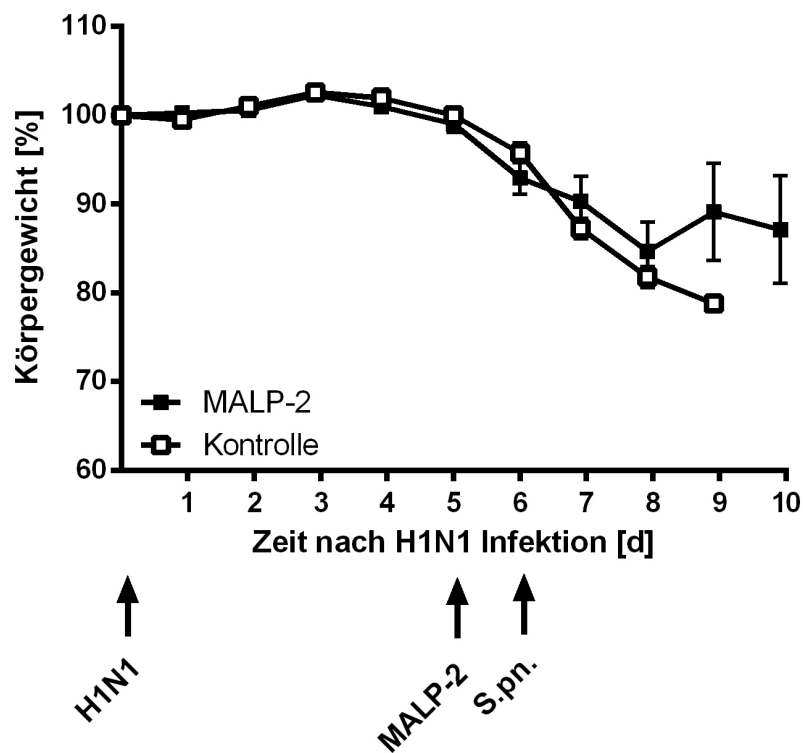


Abbildung 24: **Körpermasse [%] im Verlauf der Influenza/*S. pneumoniae*-Infektion.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung. Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Über den gesamten Versuchszeitraum von 10 d erfolgte die Messung der Körpermasse (in % des Ausgangswertes). Alle Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angeben. MALP-2/Kontrolle: n = 10/9 (Tag 0-8); n = 5/1 (Tag 9); n = 5/0 (Tag 10).

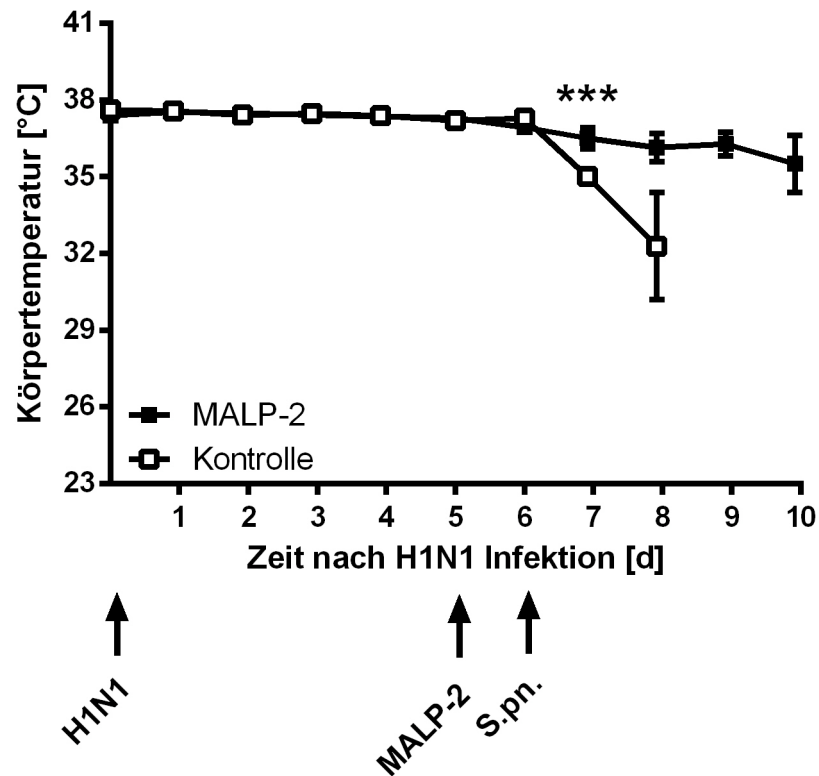


Abbildung 25: **Körpertemperatur [°C] im Verlauf der Influenza/*S. pneumoniae*-Infektion.** Die Tiere wurden mit 100 pfu Influenza-A-Virus H1N1 oder PBS transnasal infiziert. Nach 5 d erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung. Einen weiteren Tag später wurden die Tiere mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Über den gesamten Versuchszeitraum von 10 d erfolgte die Messung der rektalen Körpertemperatur (in °C). Alle Werte sind als Mittelwert und Standardfehler angeben. *** $p < 0,001$ (Vergleich zwischen den Gruppen). MALP-2/Kontrolle: $n = 10/9$ (Tag 0-7); $n = 8/6$ (Tag 8); $n = 5/0$ (Tag 9); $n = 5/0$ (Tag 10).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit wurden die Auswirkungen der pulmonalen Immunstimulation mit dem Lipopeptid MALP-2 im murinen Modell der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach Vorschädigung durch Influenza-A-Virus-Infektion untersucht.

4.1 MALP-2 stimuliert eine lokale angeborene Immunreaktion in der Influenzavirus-vorgeschädigten Lunge

Das Lipopeptid MALP-2 aktiviert über die spezifische Bindung an das Rezeptordimer TLR-2/TLR-6 eine intrazelluläre Signalkaskade, welche zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und so zur vermehrten Expression verschiedener proinflammatorischer Gene und zur gesteigerten Zytokinausschüttung führt (82, 85, 109). Bei intratrachealer Applikation des MALP-2 kommt es daher durch eine vermehrte Chemokinausschüttung zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in die Lunge. Die Zahl der Leukozyten im bronchoalveolären Raum erreicht bei gesunden Mäusen 24 h nach Applikation ihr Maximum (18, 97). *In vivo*-Studien zum Effekt von MALP-2 in bereits infizierten Mäusen oder anderweitig pulmonal vorerkrankten Tieren liegen jedoch bisher nicht vor. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Wirkung des MALP-2 auf die Influenzavirus-vorgeschädigte Mauslunge *in vivo* analysiert. Fünf Tage nach transnasaler Infektion mit dem Influenzavirus A/H1N1 wurde das angeborene Immunsystem mittels intratrachealer Applikation von MALP-2 lokal in der Lunge stimuliert. Die Applikation erfolgte *intratracheal*, um eine hohe Wirkstoffkonzentration in der murinen Lunge zu erreichen und eine systemische Aktivierung oder lokale Stimulation anderenorts (z.B. im mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes der Nase bei transnasaler Applikation) zu vermeiden (102).

Die Entwicklung einer lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion wird über Zytokine und Chemokine vermittelt. Die zellulären Bestandteile des Immunsystems werden durch diese Zytokine aktiviert, zur Proliferation angeregt und der Übertritt aus dem Blut zum Entzündungsherd wird eingeleitet (43). Mehrere *in vitro* Studien zeigten, dass MALP-2 TLR-2/6-vermittelt die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine in humanen und murinen Zellen fördert (80, 87-89). Der Effekt des MALP-2 auf die Zytokinausschüttung

besteht auch *in vivo*: Die Zytokine IL-1 β , IL-6, MCP-1, KC und TNF- α wurden nach intratrachealer MALP-2-Applikation vermehrt in der murinen Lunge nachgewiesen. Diese Zytokine führten daraufhin zu einer Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in den bronchoalveolären Raum (18, 97). In der vorliegenden Arbeit konnte die MALP-2-induzierte Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , KC und MIP-2 in den bronchoalveolären Raum gesunder (scheininfizierter) Tiere reproduziert werden. Zudem führte in Übereinstimmung mit der Literatur die pulmonale Applikation von MALP-2 bei nicht-infizierten Tieren zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten in den bronchoalveolären Raum.

Eine Infektion der Lunge und Atemwege mit Influenza-A-Virus führt, vermittelt unter anderem über die *Toll-like* Rezeptoren-3, -7 und -8, zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und Rekrutierung von Leukozyten in die murine Lunge (110, 111). Auch in dieser Arbeit führte die Infektion mit dem Influenza-A-Virus (ohne Immunstimulation) zur Ausschüttung der Zytokine TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , KC, MCP-1 und RANTES. Es fanden sich auch erwartungsgemäß nach Influenzavirusinfektion vermehrt neutrophile Granulozyten und Lymphozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. Mehreren Studien haben gezeigt, dass die Wirkung einer TLR-Stimulation durch eine solche vorbestehende Influenzavirusinfektion modifiziert wird. So konnte zum Beispiel *in vivo* und *in vitro* eine Steigerung der TLR-2 Expression während der Influenzavirus-Infektion beobachtet werden (62, 63). Didierlaurent et al. zeigten dagegen, dass die Stimulation verschiedener TLRs nach abgeschlossener Influenzavirusinfektion mit bereits erfolgter Virusclearance eine abgeschwächte Aktivierung von Alveolarmakrophagen und eine reduzierte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge hervorrief (64). Erhaltenen Influenzavirus-infizierte Tiere im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Behandlung mit MALP-2, kam es zu einer weiteren Verstärkung der angeborenen Immunantwort. Die MALP-2-Applikation führte im verwendeten Influenza-Modell zu einer gesteigerten Ausschüttung von IL-1 β und entsprechend zur zusätzlichen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen in den bronchoalveolären Raum. Auch in der histopathologischen Untersuchung der MALP-2-behandelten Influenzavirus-infizierten Lungen fanden sich entsprechend vermehrt neutrophile Granulozyten im Bronchial- und Alveolarlumen. Die Zahl der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit war dabei größer als bei einer alleinigen Addition der Effekte von MALP-2 und Influenzavirus zu erwarten gewesen wäre. Es ist daher im

verwendeten Modell von einem synergistischen Effekt der MALP-2-Stimulation und der Influenzavirusinfektion auszugehen. Eine Abschwächung der Immunantwort auf eine TLR-Stimulation durch die Influenzavirusinfektion wie vorbeschrieben (64) wurde im aktuellen Projekt nicht beobachtet. Sie tritt möglicherweise erst zu einem späteren Zeitpunkt nach vollständiger Viruselimination auf. Das in dieser Studie verwendete Influenzavirus-Infektionsmodell stellt zum Zeitpunkt der Immunstimulation mit MALP-2 und der Pneumokokken-Superinfektion eine aktive Influenzavirusinfektion mit dem typischen histologischen Bild einer bronchointerstitiellen Pneumonie dar. Ob die Ergebnisse dieser Arbeit auch auf einen Zustand nach abgeschlossener Viruselimination mit abgeschwächter Immunantwort übertragbar sind, müssen daher erst weitere Untersuchungen klären. Dass MALP-2 bei bereits bestehender Influenzavirusinfektion zu einer weiteren lokalen Aktivierung der angeborenen Immunantwort führen kann, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden.

Ob bei vorbestehender akuter Influenzavirusinfektion eine weitere Stimulation der pulmonalen Immunreaktion mit dem TLR-2 Agonisten MALP-2 einen günstigen oder nachteiligen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Virusinfektion hat, war bisher unklar. Einige Studien lassen eine Gefährdung durch übermäßige *Toll-like*-Rezeptor-Stimulation vermuten. So kann die Aktivierung von TLR-2 zu einer letalen systemischen Hyperinflammation führen, wie sie im Rahmen des septischen Schocks vorkommt (112, 113). *Toll-like*-Rezeptor-Aktivierung und Stimulation des angeborenen Immunsystems wurden auch mit einer überschießenden Entzündungsreaktion und erhöhten Letalität speziell bei Influenza-A-Infektion in Verbindung gebracht. TLR-4-Antagonisten konnten entsprechend die Letalität der pulmonalen Influenzavirus-Infektion im murinen Modell reduzieren (114, 115). Bei anderen Virusinfektionen, wie dem *Humanen Immundefizienz-Virus* (HIV), führte die Stimulation von TLR-2 sogar zu einer Steigerung der Virusreplikation (116). Andererseits konnte durch Stimulation mit einer Kombination aus TLR-9- und TLR-2/6-Agonisten die Letalität der murinen Influenzavirusinfektion *in vivo* gesenkt werden. Die pulmonale Applikation der Liganden erfolgte dabei entweder vor oder bis 24 h nach dem Infektionszeitpunkt (68, 117). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Influenzavirusinfektion ein Anstieg von IL-6 im Blutplasma mit vermehrten neutrophilen Granulozyten im Blut im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion. Die MALP-2-Applikation bewirkte jedoch keine weitere Veränderung der IL-6-Konzentration und der Leukozytenpopulationen im Blut, weder bei Influenzavirus-infizierten Tieren noch bei nicht-infizierten Kontrolltieren. MALP-2 führte also zu keiner

Veränderung der systemischen Entzündungsparameter, was bedeutet, dass die Stimulation der Immunantwort durch die intratracheale Applikation von MALP-2 lokal begrenzt bleibt und in den verwendeten Konzentrationen keine systemische Wirkung auftritt. Vergleichbare ausschließlich lokale Reaktionen wurden ebenfalls bereits durch Alfaro et al. nach inhalativer Gabe verschiedener TLR-Agonisten beobachtet (76). Darüber hinaus zeigte die Influenzaviruslast in den Lungen infizierter Tiere nach MALP-2-Immunstimulation keine Veränderungen gegenüber unbehandelten Tieren. Auch die Überlebensrate und die klinischen Parameter Körpermasse und Körpertemperatur Influenzavirus-infizierter Tiere wurden ebenfalls durch die MALP-2-Stimulation nicht signifikant verändert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass MALP-2 im Tiermodell der durch Influenzaviren vorgeschädigten Lunge die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine induziert und somit die Rekrutierung von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum erhöht. Darüber hinaus wurde kein Einfluss der Immunstimulation auf die Viruselimination oder den klinischen Verlauf der Influenzavirusinfektion festgestellt.

4.2 Die pulmonale Entzündungsreaktion der sekundären Pneumokokkeninfektion wird durch MALP-2 nicht verstärkt

Eine sekundäre bakterielle Infektion ist eine häufige Komplikation der Influenza. *S. pneumoniae* ist der wichtigste Erreger einer solchen sekundären bakteriellen Pneumonie bei Influenzavirusinfektion (33). Verschiedene Infektionsmodelle der sekundären bakteriellen Infektion bei vorbestehender Influenzavirusinfektion wurden bereits in mehreren Studien verwendet (118). Die Ergebnisse eines solchen Infektionsmodells sind von den verwendeten Erregerstämmen, den Infektionsdosen und -zeitpunkten sowie dem verwendeten Wirtsorganismus abhängig (50, 56, 119).

Um die Auswirkungen des MALP-2 auf die sekundäre Pneumokokkenpneumonie zu analysieren, erfolgte in dieser Arbeit eine sequentielle Infektion beginnend mit Influenza-A-Virus H1N1/PR/8/34, darauffolgender MALP-2-Applikation und anschließender Infektion mit *S. pneumoniae* PN36. Die Infektion mit *S. pneumoniae* erfolgte dabei 6 d nach Influenzavirusinfektion und 1 d nach MALP-2-Applikation. Der Applikationszeitpunkt des MALP-2 24 h vor Infektion gewährleistet eine maximale Stimulation der angeborenen

Immunantwort zum Zeitpunkt der sekundären Infektion (18). Die Infektion mit dem Influenza-A-Virus führt über verschiedene Mechanismen zu einer verminderten Erregerelimination. Dabei ist 6 d nach Virusinfektion eine maximale Beeinträchtigung der pulmonalen Abwehr gegenüber bakteriellen Pathogenen zu erwarten (52, 120). Im Mausmodell der sekundären Infektion mit *S. pneumoniae* werden daher deutlich geringere Infektionsdosen von *S. pneumoniae* benötigt, um einen der bakteriellen Monoinfektion vergleichbaren Effekt zu erzielen. Die Empfänglichkeit gegenüber *S. pneumoniae* erreicht dabei 3 - 7 d nach der Infektion mit dem Influenzavirus ihren Höhepunkt (120). Die transnasale Infektion erfolgte in dieser Arbeit mit 1×10^3 cfu *S. pneumoniae*, einer Dosierung weit unter der mittleren letalen Dosis (LD_{50}) des vergleichbaren Mausmodells der primären Pneumokokkeninfektion (LD_{50} $7,5 \times 10^4$ cfu) (121). Beim Menschen besteht die Gefährdung durch sekundäre bakterielle Infektionen vorwiegend an den Tagen 4 - 14 nach Auftreten der ersten klinischen Symptome der Influenza. Die bakterielle Sekundärinfektion bei Influenza kann dabei in eine kombinierte viral/bakterielle Pneumonie und eine bakterielle Pneumonie nach Viruselimination in der Genesungsphase der Influenza unterteilt werden (33). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Infektion mit *S. pneumoniae* bei noch aktiver Virusinfektion.

Mehrere Studien zeigten im Influenza-Mausmodell nach sekundärer Infektion mit *S. pneumoniae* einen Anstieg verschiedener proinflammatorischer Zytokine und der Zellrekrutierung in die Lunge gegenüber ausschließlich Influenzavirus-infizierten Tieren (62, 119). In der vorliegenden Arbeit war die zelluläre Immunantwort der Lunge 1 d nach sekundärer Infektion mit *S. pneumoniae* jedoch ohne signifikante Veränderung gegenüber der reinen Influenza-A-Virus-Infektion. Auch blieben die Zytokine in der bronchoalveolären Lavage nach sekundärer Infektion mit *S. pneumoniae* gegenüber der viralen Monoinfektion unverändert. Offen bleibt zum aktuellen Zeitpunkt, ob durch die geringe Infektionsdosis und den kurzen Zeitraum (Messung nur 24 h nach der sekundären Infektion) noch keine signifikante Veränderung der zellulären Immunantwort hervorgerufen werden konnte. Eine Proliferation der Pneumokokken fand jedoch statt, da die gemessene bakterielle Last im Lungengewebe um ein Vielfaches höher lag als die Infektionsdosis. Die histopathologische Untersuchung der sekundär mit *S. pneumoniae*-infizierten Mauslungen zeigte eine eitrig Bronchopneumonie gegenüber der typischen bronchointerstitiellen Pneumonie der Influenzavirus-Monoinfektion. Zusammenfassend führte die sekundäre bakterielle Infektion in diesem Tiermodell zu einer qualitativen Veränderung im

histologischen Bild mit eitriger Bronchopneumonie, jedoch ohne quantitativ gesteigerte pulmonale Entzündungsreaktion gegenüber der vorbestehenden Influenzavirusinfektion.

Die MALP-2-Behandlung vor der sekundären *S. pneumoniae*-Infektion erzielte ebenfalls keine signifikant vermehrte Leukozytenrekrutierung gegenüber den unbehandelten infizierten Tieren. Auch die Zytokinbestimmung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit ergab dabei keine Veränderungen durch die MALP-2-Behandlung. Im Blut von Tieren mit sekundärer bakterieller Pneumonie blieben die Leukozytenpopulationen und das Zytokin IL-6 als Marker einer systemischen Entzündungsreaktion nach MALP-2-Behandlung unverändert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine MALP-2-Behandlung vor der sekundären Infektion mit *S. pneumoniae* in der Influenzavirus-infizierten Lunge nicht zu einer weiteren Steigerung der Immunreaktion führt.

4.3 MALP-2 verbessert die bakterielle Erregerelimination in der Influenzavirus-vorgeschädigten Lunge

Bei der Elimination von in die Lunge eingedrungenen Erregern spielt das angeborene Immunsystem eine entscheidende Rolle. Die Effektivität der angeborene Immunantwort kann durch TLR-Agonisten wie MALP-2 verbessert werden. *In vitro* Untersuchungen zeigten eine MALP-2-induzierte Aktivierung von Makrophagen einhergehend mit einer gesteigerten Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und damit verstärkter bakterizider Aktivität (78-80). Auch neutrophile Granulozyten wurden durch MALP-2 stimuliert, ihre phagozytotische Aktivität gesteigert und die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies gefördert (91). Des Weiteren zeigten mehrere *in vivo* Studien eine Verbesserung der bakteriellen Erregerelimination nach TLR-spezifischer lokaler Immunstimulation mit lokaler inflammatorischer Reaktion durch Freisetzung von Chemokinen und Rekrutierung von Leukozyten. So führte die Stimulation von TLR-2/6 im Peritonealraum zu einer Verstärkung der Erregerabwehr bei intraperitonealer Infektion im Maus-Modell der polymikrobiellen Sepsis (92). Auch in einem murinen Pneumonie-Modell mit *Klebsiella pneumoniae* bewirkte die pulmonale Stimulation mit dem TLR-Agonisten CpG-ODN eine verringerte Erregerlast in Lunge und Blut (70). Gleichermäßen führte die inhalative Behandlung mit einem Lysat aus *Haemophilus influenzae* im murinen Modell der Pneumokokken-Pneumonie zu einer Verringerung der Erregerlast in der Lunge (67). Eine verbesserte Elimination von *S. pneumoniae* aus dem Lungenparenchym konnte in einer

weiteren Studie nach gemeinsamer Applikation von TLR-9- und TLR-2/6-Agonisten beobachtet werden (122). Auch der TLR-2/6 Agonist MALP-2 wurde bereits in verschiedenen pulmonalen Infektionsmodellen verwendet. So führte die lokale Applikation von MALP-2 in der Rattenlunge zu einer reduzierten Erregerlast und zu verbesserten klinischen Parametern nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (108). In einem Maus-Modell der primären Pneumokokken-Pneumonie führte die intratracheale Stimulation des angeborenen Immunsystems durch MALP-2 zu einem verringerten Nachweis von *S. pneumoniae* im peribronchialen und perivaskulären Lungenparenchym in der immunhistochemischen Darstellung. Des Weiteren wurde eine Reduktion der Bakteriämie durch MALP-2 Behandlung beobachtet (18). Eine Ausnahme bildet eine Studie, welche nach Immunstimulation mit dem TLR-3 Agonisten Poly-ICLC eine verringerte Erregerelimination von *Mycobacterium tuberculosis* in murinen Lungen durch eine ungünstige Modulation der Immunantwort beobachtete (123).

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der Stimulation mit MALP-2 auf die bakterielle Erregerelimination in einem Modell der vorbestehenden Influenza-A-Virus-Infektion analysiert. Dafür erfolgte eine Quantifizierung der koloniebildenden Einheiten in der gesamten Lunge. Dabei wurde eine Reduktion der bakteriellen Belastung nach MALP-2-Behandlung festgestellt. Somit verbessert die pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 offenbar die Erregerelimination gegenüber *S. pneumoniae* auch in der durch Influenzavirusinfektion vorgeschädigten murinen Lunge.

Ob MALP-2 über die bekannten Effekte bezüglich Leukozytenrekrutierung und Aktivierung von Phagozyten (s.o.) hinaus einen weiteren, spezifischeren Wirkmechanismus in der Influenzavirus-infizierten Lunge besitzt, ist noch nicht geklärt. Ein möglicher Angriffspunkt ist die Influenzavirus-induzierte Immunschwäche mit reduzierter Reaktion auf TLR-Stimulation. So führte in einer tierexperimentellen Studie die Influenzavirusinfektion zu einem verringerten Ansprechen von Makrophagen auf Stimulation verschiedener TLRs in der Mauslunge (64). TLR-2 ist für die Erkennung grampositiver Bakterien wie *S. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem von Bedeutung (124). In einer Studie führte MALP-2 nach pulmonaler Applikation zu einer Steigerung der Expression des TLR-2 (18) und kompensiert daher im aktuellen Modell möglicherweise den Influenza-assoziierten Defekt der TLR-vermittelten Immunantwort. Ein weiterer möglicher Mechanismus der MALP-2-Wirkung ist eine Reduktion der IL-10-Synthese. In einem murinen Modell der Influenzavirusinfektion kam es durch gesteigerte Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu einer gehemmten

Immunantwort gegenüber sekundärer bakterieller Infektion. Entsprechend konnte die Elimination von *S. pneumoniae* und die Überlebensrate bei sekundärer bakterieller Pneumonie nach Influenzavirusinfektion durch eine Hemmung der IL-10-Wirkung über spezifische IL-10-Antikörpern verbessert werden (60). Im *in vivo* Mausmodell der primären Pneumokokken-Pneumonie wurde eine Reduktion von IL-10 im bronchoalveolären Raum durch MALP-2 Applikation nachgewiesen (18). Auch das Zytokin IFN- γ wird in der Influenzavirusinfektion vermehrt sezerniert und geht einher mit einer reduzierten Phagozytose-Aktivität gegenüber bakteriellen Erregern. Daher führte eine Behandlung mit spezifischen Antikörpern gegen IFN- γ entsprechend zu einem verbesserten Überleben nach sequenzieller Infektion mit Influenza-A-Virus und *S. pneumoniae* (58). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Veränderung der Konzentration von IL-10 und IFN- γ nach Behandlung mit MALP-2 sind allerdings nicht statistisch signifikant. Weitere Studien sind notwendig um die Interaktion von Influenzavirus- und *S. pneumoniae*-Infektion und deren Modifikation durch MALP-2 aufzuklären.

4.4 MALP-2 erhöht die Überlebensrate bei sekundärer Pneumokokkenpneumonie

Die durch eine Immunstimulation gesteigerte Erregerabwehr kann zu einer Verbesserung der Überlebensrate nach bakterieller Infektion führen. So konnte in verschiedenen *in vivo* Studien ein protektiver Effekt der pulmonalen *Toll-like* Rezeptor-Stimulation beobachtet werden. Die pulmonale Instillation eines Lysates von *Haemophilus influenzae* als Aerosol führte zu einer verbesserten Überlebensrate in murinen Modellen der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* und einem weiten Feld anderer Erreger wie *Staphylococcus aureus*, den gramnegativen Erregern *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*, dem Influenza-A-Virus und dem Pilz *Aspergillus fumigatus* (67, 68, 125). Auch der TLR-9-Agonist CpG-ODN steigerte die Überlebensrate bei pulmonaler Infektion mit *K. pneumoniae* in der Maus (70). Die gleichzeitige synergistische Stimulation von TLR-2/6 und TLR-9 verbesserte ebenfalls die Überlebensrate bei pulmonaler Infektion mit *P. aeruginosa* (122). Auch in Tiermodellen der sekundären bakteriellen Pneumonie nach Influenzavirusinfektion konnte eine Reduktion der Letalität durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems der Lunge erreicht werden. So kam es in einem Mausmodell mit pulmonaler Überexpression von GM-CSF und damit einhergehend gesteigerter Aktivität im angeborenen Immunsystem zu einer deutlich verbesserten Überlebensrate nach sekundärer Infektion mit *Staphylococcus aureus* bei vorbestehender Infektion mit Influenza-A-Virus (126).

Das in der aktuellen Arbeit verwendete MALP-2 verhinderte bereits in einer früheren Studie nach intratrachealer Applikation die Translokation von *S. pneumoniae* in den Blutkreislauf, verbesserte die klinischen Verlaufsparemeter und senkte die Letalität der primären Pneumokokkenpneumonie (18).

Daher erfolgte nun in der vorliegenden Arbeit eine Untersuchung des Effektes von MALP-2 auf den klinischen Verlauf der sekundären Pneumonie durch *S. pneumoniae* bei vorbestehender Infektion mit Influenza-A-Virus. Die Applikation von MALP-2 erfolgte intratracheal in der Dosierung 0,5 µg pro Tier. In dieser Dosierung wurde in vorherigen Untersuchungen ein maximaler Effekt auf die Überlebensrate bei primärer Pneumokokkenpneumonie festgestellt (18). MALP-2-behandelte Tiere zeigten auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verbesserte approximative Überlebensrate im Vergleich zu den nichtbehandelten Tieren. Des Weiteren wiesen MALP-2-behandelte Mäuse nach Infektion mit *S. pneumoniae* einen geringeren Gewichtsverlust innerhalb der ersten 24 h und eine physiologischere Körpertemperatur gegenüber der Kontrollgruppe auf. Da die infizierten Tiere eine progrediente Hypothermie entwickelten, deutet die höhere Körpertemperatur auf einen milderen klinischen Verlauf hin. Der protektive Effekt einer Immunstimulation mit MALP-2 gegenüber einer Pneumokokken-Pneumonie konnte demnach auch in der durch Influenzavirusinfektion vorgeschädigten Lunge nachgewiesen werden.

Die Immunstimulation mit MALP-2 in Kombination mit einer Influenzavirusinfektion und einer sekundären Infektion mit *S. pneumoniae* birgt die Gefahr der Induktion einer überschießenden TLR-2 vermittelten Entzündungsreaktion. Eine übersteigerte systemische Entzündungsreaktion kann zum potenziell tödlichen *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) führen (127). Die Hyperinflammation, wie sie in der Frühphase der Sepsis vorkommt, wurde vielfach für die hohe Letalität der Sepsis verantwortlich gemacht (128). Die bei der Sepsis vorkommende überschießende Aktivierung von Entzündungszellen wird auch über TLR-2 vermittelt. So führte in einem Sepsis-Modell der Maus die Unterbrechung der inflammatorischen Aktivierung durch Antikörper gegen TLR-2 zu einer Verbesserung der Überlebensrate (112, 113). In einem murinen Modell der sequenziellen Influenzavirus-/Pneumokokkeninfektion führte die Behandlung mit einem bakteriziden β-Laktam-Antibiotikum zu einer massiven inflammatorischen Reaktion mit nekrotischer Lungenschädigung und hoher Letalität. Diese Reaktion wurde durch die übersteigerte Aktivierung von TLR-2 durch Bestandteile lysierter Bakterien vermittelt (129). Auch zeigte MALP-2 im Tierversuch bei extrem hoher Konzentration

eine letale toxische Wirkung mit überschießender systemischer Entzündungsreaktion (107). Andererseits findet sich bei der protrahierten Sepsis häufig eine starke Reduktion der Immunantwort mit geschwächter Erregerabwehr, verringerter Stimulierbarkeit von Immunzellen und ausgeprägtem Verlust von Leukozyten durch Apoptose (128). In der vorliegenden Arbeit stimulierte MALP-2 über TLR-2/TLR-6 die pulmonale Entzündungsreaktion bei Influenzavirusinfektion. Interessanterweise führte die MALP-2-Behandlung vor der sekundären *S. pneumoniae*-Infektion jedoch nicht zu einer weiteren Zytokinausschüttung bzw. Leukozytenrekrutierung. IL-6 im Blutplasma als Marker einer systemischen Entzündungsreaktion blieb ebenfalls unbeeinflusst von der MALP-2 Behandlung. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine MALP-2-Behandlung in wirksamer Dosierung vor der sekundären Infektion mit *S. pneumoniae* in der Influenzavirus-infizierten Lunge nicht zu einer überschießenden Immunreaktion führt.

Insgesamt verbessert die Stimulation mit dem Lipopeptid MALP-2 die Überlebensrate bei der sekundären murinen Pneumokokkenpneumonie. Der Nutzen der verbesserten Erregerelimination überwiegt im aktuellen Infektionsmodell gegenüber möglichen nachteiligen Effekten der zusätzlichen MALP-2-induzierten Entzündungsreaktion.

4.5 Ausblick

Patienten mit einer geschwächten Immunabwehr der Lunge haben ein deutlich erhöhtes Risiko, an einer bakteriellen Pneumonie zu erkranken. Gerade Patienten mit einer kurzzeitigen kompromittierten Immunabwehr könnten daher in besonderem Maße von einer präventiven Stimulation der angeborenen Immunantwort mit MALP-2 profitieren. Eine solche kurzzeitige Abwehrschwäche besteht unter anderem bei mechanischer Beatmung, der Immunparalyse bei Sepsis oder viralen Atemwegsinfektionen (5, 128, 130). Insbesondere während und kurz nach einer Influenzavirusinfektion besteht eine Prädisposition für die Entstehung einer bakteriellen Pneumonie (23). Die lokale Immunstimulation mit *Toll-like* Rezeptor-Agonisten hat in einer Reihe von tierexperimentellen Studien bereits ihr Potenzial in der Prävention der Pneumonie unterschiedlicher Genese ohne pulmonale Vorerkrankung gezeigt (18, 67-73).

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die intratracheale MALP-2-Behandlung das angeborene Immunsystem der Influenzavirus-vorgeschädigten Lunge stimuliert. Zudem bewirkte

die Immunstimulation eine Verbesserung der bakteriellen Erregerelimination ohne übermäßige inflammatorische Reaktion. Dies resultierte in einer Steigerung der Überlebensrate bei der sekundären Pneumokokkenpneumonie.

Aufgrund der begrenzten Wirkdauer des MALP-2 (97) ist für den Einsatz in der Prävention der sekundären bakteriellen Pneumonie vermutlich eine repetitive Gabe notwendig. Diese birgt die Gefahr einer Inflammations-assoziierten Schädigung der Lunge. Bisher wurden aber, in den verwendeten Dosierungen, weder in dieser Arbeit noch in der Literatur unerwünschte Wirkungen der MALP-2-Behandlung beobachtet.

Trotz moderner antibiotischer Therapie ist die Morbidität und Mortalität der ambulant erworbenen Pneumonie weiterhin hoch und es besteht Bedarf an innovativen Therapiestrategien (131). Zumal der Nutzen der antibiotischen Behandlung zunehmend von Resistenzen gegen die verfügbaren Antibiotika eingeschränkt wird (15). Da die Wirkung der Immunstimulation durch Aktivierung der angeborenen Immunantwort und nicht durch eine direkte Interaktion mit dem Erreger zustande kommt, ist sie vermutlich wenig vom Problem einer Resistenzentwicklung bzw. Selektion resistenter Stämme betroffen. Auch eine Toleranzentwicklung mit Abschwächung der Immunantwort und der antibakteriellen Wirkung wurde selbst bei wiederholter pulmonaler Immunstimulation über 8 Wochen in einer *in vivo* Studie von Evans et al. nicht beobachtet (125). Im Rahmen der Prävention von sekundären bakteriellen Pneumonien bei Influenza stehen bisher nur Impfungen gegen Influenzavirus und Pneumokokken zu Verfügung (30). Im Gegensatz zu Impfungen könnte die Immunstimulation jedoch auch noch angewendet werden, wenn bereits eine akute Virusinfektion besteht. Zusammenfassend ist die pulmonale Stimulation der angeborenen Immunantwort durch MALP-2 daher ein vielversprechender Ansatz zur Prävention sekundärer bakterieller Pneumonien. Weitere Studien sind notwendig, um den Nutzen der pulmonalen Immunstimulation auch beim Menschen beurteilen zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. **Naghavi M, Wang H, Lozano R, Davis A, Liang X, Zhou M, Vollset S, al. E.** Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;385(9963):117-71.
2. **Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gattermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, de Roux A, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T.** Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016. *Pneumologie*. 2016;70(03):151-200. Epub 29.02.2016.
3. **Pletz MW, Rohde G, Schutte H, Bals R, von Baum H, Welte T.** Epidemiologie und Erreger bei ambulant erworbener Pneumonie (CAP). *Dtsch Med Wochenschr*. 2011;136(15):775-80. Epub 2011/04/07. Epidemiologie und Erreger bei ambulant erworbener Pneumonie (CAP).
4. **File Jr TM.** Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: A cause for concern. *The American Journal of Medicine Supplements*. 2004;117(3, Supplement 1):39-50.
5. **Hament J-M, Kimpfen JLL, Fleer A, Wolfs TFW.** Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 1999;26(3-4):189-95.
6. **van der Poll T, Opal SM.** Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *The Lancet*. 2009;374(9700):1543-56.
7. **Bogaert D, De Groot R, Hermans PW.** Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *The Lancet infectious diseases*. 2004;4(3):144-54. Epub 2004/03/05.
8. **Lynch JP, 3rd, Zhanel GG.** Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2009;30(2):189-209. Epub 2009/03/20.
9. **Hof H, Dörries R.** Streptococcus pneumoniae. *Medizinische Mikrobiologie*. 4th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, KG; 2009. p. 326 - 8.
10. **Mitchell AM, Mitchell TJ.** Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2010;16(5):411-8. Epub 2010/02/06.

11. **Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW.** The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature reviews Microbiology*. 2008;6(4):288-301. Epub 2008/03/15.
12. **Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H.** Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical care medicine*. 2006;34(7):1947-54. Epub 2006/05/23.
13. **Kadioglu A, Andrew PW.** The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in immunology*. 2004;25(3):143-9. Epub 2004/03/24.
14. **Mitchell TJ.** Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Research in microbiology*. 2000;151(6):413-9. Epub 2000/08/29.
15. **Jones RN, Jacobs MR, Sader HS.** Evolving trends in *Streptococcus pneumoniae* resistance: implications for therapy of community-acquired bacterial pneumonia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;36(3):197-204.
16. **European Center for Disease Prevention and Control.** Antimicrobial resistance surveillance in Europe - Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2014. Stockholm: ECDC, 2015.
17. **Obaro SK, Adegbola RA, Banya WAS, Greenwood BM.** Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *The Lancet*. 1996;348(9022):271-2.
18. **Reppe K, Tschernig T, Luhrmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Muller HC, Kursar M, Schutte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.** Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2009;40(4):474-81. Epub 2008/10/22.
19. **Zucs P, Buchholz U, Haas W, Uphoff H.** Influenza associated excess mortality in Germany, 1985 - 2001. *Emerging Themes in Epidemiology*. 2005;2(1):6.
20. **Arnold S M.** Epidemiology of influenza. *Vaccine*. 2008;26, Supplement 4(0):D45-D8.
21. **Cox NJ, Subbarao K.** Influenza. *The Lancet*. 1999;354(9186):1277-82.
22. **Lagace-Wiens PR, Rubinstein E, Gumel A.** Influenza epidemiology--past, present, and future. *Critical care medicine*. 2010;38(4 Suppl):e1-9. Epub 2009/12/24.
23. **McCullers JA.** Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clinical microbiology reviews*. 2006;19(3):571-82. Epub 2006/07/19.

24. **Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen L-M, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO.** New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657.
25. **Zhu X, Yang H, Guo Z, Yu W, Carney PJ, Li Y, Chen L-M, Paulson JC, Donis RO, Tong S, Stevens J, Wilson IA.** Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012;109(46):18903-8.
26. **Hota S, McGeer A.** Antivirals and the Control of Influenza Outbreaks. *Clinical Infectious Diseases.* 2007;45(10):1362-8.
27. **Jefferson T, Jones Mark A, Doshi P, Del Mar Chris B, Heneghan Carl J, Hama R, Thompson Matthew J.** Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews* [Internet]. 2012; (1). Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD008965.pub3/abstract>.
28. **Renaud C, Kuypers J, Englund JA.** Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *Journal of Clinical Virology.* 2011;52(2):70-8.
29. **Treanor JJ, Hayden FG, Vrooman PS, Barbarash R, Bettis R, Riff D, Singh S, Kinnersley N, Ward P, Mills RG, Group ftUONS.** Efficacy and Safety of the Oral Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir in Treating Acute Influenza. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 2000;283(8):1016-24.
30. **Ständige Impfkommision (STIKO) am Robert Koch Institut.** *Epidemiologisches Bulletin* 34 / 2015. published on edoc: 2015-09-02T11:27:00Z
access: 2016-05-12T11:58:02Z: *Epidemiologie und Gesundheitsberichterstattung*; 2015.
31. **Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB.** Complications of viral influenza. *The American journal of medicine.* 2008;121(4):258-64. Epub 2008/04/01.
32. **von Baum H, Schweiger B, Welte T, Marre R, Suttorp N, Pletz MWR, Ewig S.** How deadly is seasonal influenza-associated pneumonia? The German Competence Network for Community-Acquired Pneumonia. *European Respiratory Journal.* 2011;37(5):1151-7.
33. **van der Sluijs KF, van der Poll T, Lutter R, Juffermans NP, Schultz MJ.** Bench-to-bedside review: bacterial pneumonia with influenza - pathogenesis and clinical implications. *Crit Care.* 2010;14(2):219. Epub 2010/05/13.

34. **Delclaux C, Azoulay E.** Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *The European respiratory journal Supplement*. 2003;42:10s-4s. Epub 2003/08/30.
35. **Duncker H-R, Kummer W.** Atemsystem. In: Drenckhahn D, editor. *Anatomie*. 16th ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2003. p. 533 - 83.
36. **Akira S, Uematsu S, Takeuchi O.** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801. Epub 2006/02/25.
37. **Rohmann K, Tschernig T, Pabst R, Goldmann T, Drömann D.** Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease. *Cell and tissue research*. 2011;343(1):167-74.
38. **Moresco EMY, LaVine D, Beutler B.** Toll-like receptors. *Current Biology*. 2011;21(13):R488-R93.
39. **Janssens S, Beyaert R.** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(4):637-46. Epub 2003/10/15.
40. **Takeda K, Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005;17(1):1-14. Epub 2004/12/09.
41. **Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A, Espevik T.** Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol*. 2001;69(3):474-81. Epub 2001/03/23.
42. **Mele T, Madrenas J.** TLR2 signalling: At the crossroads of commensalism, invasive infections and toxic shock syndrome by *Staphylococcus aureus*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42(7):1066-71.
43. **Murphy K.** *Janeway's Immunobiology*. 8th ed. New York: Garland Science; 2012.
44. **Luster AD.** Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1998;338(7):436-45.
45. **Brydon EWA, Morris SJ, Sweet C.** Role of apoptosis and cytokines in influenza virus morbidity. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005;29(4):837-50.
46. **Julkunen I, Melén K, Nyqvist M, Pirhonen J, Sareneva T, Matikainen S.** Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine*. 2000;19, Supplement 1(0):S32-S7.
47. **Plotkowski MC, Puchelle E, Beck G, Jacquot J, Hannoun C.** Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. *Am Rev Respir Dis*. 1986;134(5):1040-4.

48. **Pittet LA, Hall-Stoodley L, Rutkowski MR, Harmsen AG.** Influenza virus infection decreases tracheal mucociliary velocity and clearance of *Streptococcus pneumoniae*. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;42(4):450-60. Epub 2009/06/13.
49. **McCullers JA, Bartmess KC.** Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(6):1000-9. Epub 2003/03/28.
50. **Peltola VT, Murti KG, McCullers JA.** Influenza Virus Neuraminidase Contributes to Secondary Bacterial Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases*. 2005;192(2):249-57.
51. **King QO, Lei B, Harmsen AG.** Pneumococcal surface protein A contributes to secondary *Streptococcus pneumoniae* infection after influenza virus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009;200(4):537-45. Epub 2009/07/10.
52. **LeVine AM, Koeningsknecht V, Stark JM.** Decreased pulmonary clearance of *S. pneumoniae* following influenza A infection in mice. *Journal of virological methods*. 2001;94(1-2):173-86. Epub 2001/05/05.
53. **McNamee LA, Harmsen AG.** Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and immunity*. 2006;74(12):6707-21. Epub 2006/09/20.
54. **Engelich G, White M, Hartshorn KL.** Neutrophil survival is markedly reduced by incubation with influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: role of respiratory burst. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;69(1):50-6.
55. **Shahangian A, Chow EK, Tian X, Kang JR, Ghaffari A, Liu SY, Belperio JA, Cheng G, Deng JC.** Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(7):1910-20. Epub 2009/06/03.
56. **McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA.** Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell host & microbe*. 2007;2(4):240-9. Epub 2007/11/17.
57. **Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nature medicine*. 2001;7(12):1306-12.

58. **Sun K, Metzger DW.** Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection. *Nature medicine.* 2008;14(5):558-64. Epub 2008/04/29.
59. **Arredouani M, Yang Z, Ning Y, Qin G, Soininen R, Tryggvason K, Kobzik L.** The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *The Journal of experimental medicine.* 2004;200(2):267-72. Epub 2004/07/21.
60. **van der Sluijs KF, van Elden LJR, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, Goldman M, Jansen HM, Lutter R, van der Poll T.** IL-10 Is an Important Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection. *The Journal of Immunology.* 2004;172(12):7603-9.
61. **Nakamura S, Davis KM, Weiser JN.** Synergistic stimulation of type I interferons during influenza virus coinfection promotes *Streptococcus pneumoniae* colonization in mice. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(9):3657-65. Epub 2011/08/16.
62. **Seki M, Yanagihara K, Higashiyama Y, Fukuda Y, Kaneko Y, Ohno H, Miyazaki Y, Hirakata Y, Tomono K, Kadota J, Tashiro T, Kohno S.** Immunokinetics in severe pneumonia due to influenza virus and bacteria coinfection in mice. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology.* 2004;24(1):143-9. Epub 2004/08/06.
63. **Lee RM, White MR, Hartshorn KL.** Influenza A viruses upregulate neutrophil toll-like receptor 2 expression and function. *Scandinavian journal of immunology.* 2006;63(2):81-9. Epub 2006/02/16.
64. **Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, Lawrence T, van Rijt LS, Lambrecht BN, Sirard JC, Hussell T.** Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(2):323-9. Epub 2008/01/30.
65. **Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, Espinosa M, Landmann R.** Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infection and immunity.* 2005;73(12):8397-401. Epub 2005/11/22.
66. **Knapp S, Wieland CW, van 't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S, van der Poll T.** Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol.* 2004;172(5):3132-8. Epub 2004/02/24.

67. **Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, Moghaddam SJ, Scott BL, Melicoff E, Adachi R, Dickey BF, Tuvim MJ.** Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2008;177(12):1322-30. Epub 2008/04/05.
68. **Tuvim MJ, Evans SE, Clement CG, Dickey BF, Gilbert BE.** Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia. *PloS one.* 2009;4(1):e4176. Epub 2009/01/13.
69. **Karaolis DK, Newstead MW, Zeng X, Hyodo M, Hayakawa Y, Bhan U, Liang H, Standiford TJ.** Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infection and immunity.* 2007;75(10):4942-50. Epub 2007/07/25.
70. **Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM, Standiford TJ.** CpG Oligodeoxynucleotides Stimulate Protective Innate Immunity against Pulmonary Klebsiella Infection. *The Journal of Immunology.* 2004;173(8):5148-55.
71. **Cluff CW, Baldrige JR, Stöver AG, Evans JT, Johnson DA, Lacy MJ, Clawson VG, Yorgensen VM, Johnson CL, Livesay MT, Hershberg RM, Persing DH.** Synthetic Toll-Like Receptor 4 Agonists Stimulate Innate Resistance to Infectious Challenge. *Infection and immunity.* 2005;73(5):3044-52.
72. **Jean D, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, Leclercq R, Lafuma C, Brun-Buisson C, Harf A, Delclaux C.** Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced acute lung injury in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 1998;158(6):1702-8. Epub 1998/12/16.
73. **Shinya K, Okamura T, Sueta S, Kasai N, Tanaka M, Ginting T, Makino A, Einfeld A, Kawaoka Y.** Toll-like receptor pre-stimulation protects mice against lethal infection with highly pathogenic influenza viruses. *Virology journal.* 2011;8(1):97.
74. **Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, Karpoff N, Dai X, Das D, Sun LQ, Wang M, Salazar AM.** Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine.* 2009;27(25-26):3481-3.
75. **Hoogerwerf JJ, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Pater JM, de Boer A, Tanck M, Lundell DL, Her-Jenh C, Draing C, von Aulock S, van der Poll T.** Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2008;178(1):34-41. Epub 2008/04/12.
76. **Alfaro V, Goldblatt DL, Valverde GR, Munsell M, Quinton LJ, Walker AK, Dantzer R, Varadhachary A, Scott BL, Evans SE, Tuvim MJ, Dickey BF.** Safety,

tolerability, and biomarkers of the treatment of mice with aerosolized toll-like receptor ligands. *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5.

77. **Quentmeier H, Schmitt E, Kirchhoff H, Grote W, Muhlradt PF.** Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material induces interleukin-6 release in cultures of murine macrophages and human monocytes. *Infection and immunity*. 1990;58(5):1273-80. Epub 1990/05/01.

78. **Mühlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G.** Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(11):1951-8. Epub 1997/06/02.

79. **Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Muhlradt PF.** Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *European journal of immunology*. 2002;32(12):3337-47. Epub 2002/11/15.

80. **Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Mühlradt PF, Akira S.** Cutting Edge: Preferentially the R-Stereoisomer of the Mycoplasmal Lipopeptide Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Activates Immune Cells Through a Toll-Like Receptor 2- and MyD88-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. 2000;164(2):554-7.

81. **Okusawa T, Fujita M, Nakamura J-i, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T, Shibata K-i.** Relationship between Structures and Biological Activities of Mycoplasmal Diacylated Lipopeptides and Their Recognition by Toll-Like Receptors 2 and 6. *Infection and immunity*. 2004;72(3):1657-65.

82. **Kawai T, Akira S.** Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*. 2007;13(11):460-9. Epub 2007/11/22.

83. **Takeuchi O, Akira S.** Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.

84. **Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U, Beutler B.** CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*. 2005;433(7025):523-7.

85. **Garcia J, Lemercier B, Roman-Roman S, Rawadi G.** A *Mycoplasma fermentans*-derived Synthetic Lipopeptide Induces AP-1 and NF-κB Activity and Cytokine Secretion in Macrophages via the Activation of Mitogen-activated Protein Kinase Pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(51):34391-8.

86. **Vallabhapurapu S, Karin M.** Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology.* 2009;27:693-733. Epub 2009/03/24.
87. **Deiters U, Mühradt PF.** Mycoplasmal Lipopeptide MALP-2 Induces the Chemoattractant Proteins Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP-1 α), Monocyte Chemoattractant Protein 1, and MIP-2 and Promotes Leukocyte Infiltration in Mice. *Infection and immunity.* 1999;67(7):3390-8.
88. **Cole M, Cox S, Inman E, Chan C, Mana M, Helgerson S, Tawil B.** Fibrin as a delivery vehicle for active macrophage activator lipoprotein-2 peptide: in vitro studies. *Wound Repair and Regeneration.* 2007;15(4):521-9.
89. **Kaufmann A, Mühradt PF, Gemsa D, Sprenger H.** Induction of Cytokines and Chemokines in Human Monocytes by Mycoplasma fermentans-Derived Lipoprotein MALP-2. *Infection and immunity.* 1999;67(12):6303-8.
90. **Jörgens G, Bange F-C, Mühradt P, Pabst R, Maus U, Tschernig T.** Synthetic Lipopeptide MALP-2 Inhibits Intracellular Growth of Mycobacterium bovis BCG in Alveolar Macrophages—Preliminary Data. *Inflammation.* 2009;32(4):247-51.
91. **Wilde I, Lotz S, Engelmann D, Starke A, van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T.** Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes. *Medical microbiology and immunology.* 2007;196(2):61-71. Epub 2006/09/29.
92. **Zeckey C, Tschernig T, Hildebrand F, Frink M, Fromke C, Dorsch M, Krettek C, Barkhausen T.** Macrophage-activating lipopeptide-2 exerts protective effects in a murine sepsis model. *Shock.* 2010;33(6):614-9. Epub 2009/11/27.
93. **Deiters U, Barsig J, Tawil B, Mühradt PF.** The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Experimental Dermatology.* 2004;13(12):731-9.
94. **Shingu K, Kruschinski C, Luhrmann A, Grote K, Tschernig T, von Horsten S, Pabst R.** Intratracheal Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Reduces Metastasis in the Rat Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(3):316-21.
95. **Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Mühradt PF, Schmidt J, Marten A.** Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut.* 2004;53(3):355-61. Epub 2004/02/13.

96. **Schmidt J, Welsch T, Jager D, Muhlradt PF, Buchler MW, Marten A.** Intratumoural injection of the toll-like receptor-2//6 agonist /macrophage-activating lipopeptide-2/' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br J Cancer.* 2007;97(5):598-604.
97. **Lührmann A, Deiters U, Skokowa J, Hanke M, Gessner JE, Muhlradt PF, Pabst R, Tschernig T.** In Vivo Effects of a Synthetic 2-Kilodalton Macrophage-Activating Lipopeptide of *Mycoplasma fermentans* after Pulmonary Application. *Infection and immunity.* 2002;70(7):3785-92.
98. **Pabst R, Durak D, Roos A, Lührmann A, Tschernig T.** TLR2/6 stimulation of the rat lung: effects on lymphocyte subsets, natural killer cells and dendritic cells in different parts of the air-conducting compartments and at different ages. *Immunology.* 2009;126(1):132-9.
99. **Lührmann A, Tschernig T, Pabst R.** Stimulation of Bronchus-Associated Lymphoid Tissue in Rats by Repeated Inhalation of Aerosolized Lipopeptide MALP-2. *Pathobiology.* 2002;70(5):266-9.
100. **Fuchs B, Knothe S, Rochlitzer S, Nassimi M, Greweling M, Lauenstein HD, Nassenstein C, Muller M, Ebensen T, Dittrich AM, Krug N, Guzman CA, Braun A.** A Toll-like receptor 2/6 agonist reduces allergic airway inflammation in chronic respiratory sensitisation to Timothy grass pollen antigens. *International archives of allergy and immunology.* 2010;152(2):131-9. Epub 2009/12/18.
101. **Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, Muhlradt PF, Kirschning CJ, Weiss S, Guzmán CA.** The Mucosal Adjuvant Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Directly Stimulates B Lymphocytes via the TLR2 without the Need of Accessory Cells. *The Journal of Immunology.* 2005;174(10):6308-13.
102. **Rharbaoui F, Westendorf A, Link C, Felk S, Buer J, Gunzer M, Guzman CA.** The Mycoplasma-derived macrophage-activating 2-kilodalton lipopeptide triggers global immune activation on nasal mucosa-associated lymphoid tissues. *Infection and immunity.* 2004;72(12):6978-86. Epub 2004/11/24.
103. **Weigt H, Muhlradt PF, Emmendorffer A, Krug N, Braun A.** Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology.* 2003;207(3):223-33.
104. **Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, Muhlradt PF, Guzmán CA.** The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *European journal of immunology.* 2002;32(10):2857-65.

105. **Borsutzky S, Fiorelli V, Ebensen T, Tripiciano A, Rharbaoui F, Scoglio A, Link C, Nappi F, Morr M, Buttó S, Cafaro A, Mühlradt PF, Ensoli B, Guzmán CA.** Efficient mucosal delivery of the HIV-1 Tat protein using the synthetic lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *European journal of immunology*. 2003;33(6):1548-56.
106. **Knorr C, Hübschle T, Murgott J, Mühlradt P, Gerstberger R, Roth J.** Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Research*. 2008;1205(0):36-46.
107. **Galanos C, Gumenscheimer M, Mühlradt PF, Jirillo E, Freudenberg MA.** MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *Journal of Endotoxin Research*. 2000;6(6):471-6.
108. **Kerber-Momot T, Leemhuis D, Luhrmann A, Munder A, Tummler B, Pabst R, Tschernig T.** Beneficial effects of TLR-2/6 ligation in pulmonary bacterial infection and immunization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Inflammation*. 2010;33(1):58-64. Epub 2009/10/22.
109. **Mrabet-Dahbi S, Metz M, Dudeck A, Zuberbier T, Maurer M.** Murine mast cells secrete a unique profile of cytokines and prostaglandins in response to distinct TLR2 ligands. *Experimental Dermatology*. 2009;18(5):437-44.
110. **Fukuyama S, Kawaoka Y.** The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Current Opinion in Immunology*. 2011;23(4):481-6.
111. **Iwasaki A, Pillai PS.** Innate immunity to influenza virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(5):315-28.
112. **Gao H, Leaver S, Burke-Gaffney A, Finney S.** Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin Immunopathol*. 2008;30(1):29-40.
113. **Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Luppa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H, Kirschning CJ.** Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *The Journal of clinical investigation*. 2004;113(10):1473-81.
114. **Brandes M, Klauschen F, Kuchen S, Germain Ronald N.** A Systems Analysis Identifies a Feedforward Inflammatory Circuit Leading to Lethal Influenza Infection. *Cell*. 2013;154(1):197-212.
115. **Shirey KA, Lai W, Scott AJ, Lipsky M, Mistry P, Pletneva LM, Karp CL, McAlees J, Gioannini TL, Weiss J, Chen WH, Ernst RK, Rossignol DP, Gusovsky F, Blanco JCG,**

Vogel SN. The TLR4 antagonist Eritoran protects mice from lethal influenza infection. *Nature*. 2013;497(7450):498-502.

116. **Heggelund L, Müller F, Lien E, Yndestad A, Ueland T, Kristiansen KI, Espevik T, Aukrust P, Frøland SS.** Increased Expression of Toll-Like Receptor 2 on Monocytes in HIV Infection: Possible Roles in Inflammation and Viral Replication. *Clinical Infectious Diseases*. 2004;39(2):264-9.

117. **Tuvim MJ, Gilbert BE, Dickey BF, Evans SE.** Synergistic TLR2/6 and TLR9 Activation Protects Mice against Lethal Influenza Pneumonia. *PloS one*. 2012;7(1):e30596.

118. **Barnard DL.** Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*. 2009;82(2):A110-A22.

119. **Smith MW, Schmidt JE, Rehg JE, Orihuela CJ, McCullers JA.** Induction of pro- and anti-inflammatory molecules in a mouse model of pneumococcal pneumonia after influenza. *Comparative medicine*. 2007;57(1):82-9.

120. **McCullers JA, Rehg JE.** Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186(3):341-50. Epub 2002/07/23.

121. **Reppe K.** Pulmonale Immunstimulation mit Lipopeptid MALP-2: Einfluss auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie in der Maus [Dissertation]: Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2010.

122. **Duggan JM, You D, Cleaver JO, Larson DT, Garza RJ, Guzmán Pruneda FA, Tuvim MJ, Zhang J, Dickey BF, Evans SE.** Synergistic Interactions of TLR2/6 and TLR9 Induce a High Level of Resistance to Lung Infection in Mice. *The Journal of Immunology*. 2011;186(10):5916-26.

123. **Antonelli LR, Gigliotti Rothfuchs A, Goncalves R, Roffe E, Cheever AW, Bafica A, Salazar AM, Feng CG, Sher A.** Intranasal Poly-IC treatment exacerbates tuberculosis in mice through the pulmonary recruitment of a pathogen-permissive monocyte/macrophage population. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(5):1674-82. Epub 2010/04/15.

124. **Dessing MC, Florquin S, Paton JC, Van Der Poll T.** Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. *Cellular Microbiology*. 2008;10(1):237-46.

125. **Evans SE, Scott BL, Clement CG, Larson DT, Kontoyiannis D, Lewis RE, LaSala PR, Pawlik J, Peterson JW, Chopra AK, Klimpel G, Bowden G, Höök M, Xu Y, Tuvim MJ, Dickey BF.** Stimulated Innate Resistance of Lung Epithelium Protects Mice Broadly

against Bacteria and Fungi. American journal of respiratory cell and molecular biology. 2010;42(1):40-50.

126. **Subramaniam R, Barnes PF, Fletcher K, Boggaram V, Hillberry Z, Neuenschwander P, Shams H.** Protecting Against Post-influenza Bacterial Pneumonia by Increasing Phagocyte Recruitment and ROS Production. Journal of Infectious Diseases. 2014;209(11):1827-36.

127. **Rangel-Frausto M, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP.** The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (sirs): A prospective study. JAMA. 1995;273(2):117-23.

128. **Hotchkiss RS, Karl IE.** The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. New England Journal of Medicine. 2003;348(2):138-50.

129. **Karlstrom A, Heston SM, Boyd KL, Tuomanen EI, McCullers JA.** Toll-like receptor 2 mediates fatal immunopathology in mice during treatment of secondary pneumococcal pneumonia following influenza. The Journal of infectious diseases. 2011;204(9):1358-66. Epub 2011/09/09.

130. **Lorente L, Blot S, Rello J.** Evidence on measures for the prevention of ventilator-associated pneumonia. The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology. 2007;30(6):1193-207.

131. **Rodriguez A, Lisboa T, Blot S, Martin-Loeches I, Solé-Violan J, Mendoza D, Rello J.** Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. Intensive Care Med. 2009;35(3):430-8.

6 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Aqua ad iniectabilia (10 ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Avicel RC/CL	FMC Corporation (Philadelphia, PA, USA)
Bacto™ Todd Hewitt Broth	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Yeast Extract, Technical	BD Biosciences (Heidelberg)
Bepanthen® Augen-und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Bio-Plex®™ Mouse Cytokine 13-Plex	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex® Reagent Kit	BioRad Laboratories (München)
Bovine Serum Albumine	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Braunol®	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
BD FACS™ CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
DEAE-Dextranhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
BD FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
GlutaMAX™	Gibco (Carlsbad, CA, USA)
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH (Trittau)
Ketamin 10 %	WDT (Garbsen)
Kristallviolett	Carl Roth GmbH & CO (Karlsruhe)
MEM with Earle's Salts	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
MEM-Pulver	Gibco (Carlsbad, CA, USA)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Natriumchloridlösung, 0,9 % (10 ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)

Natriumchloridlösung, isotonisch (100 ml)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
PBS, Dulbecco with Ca & Mg	Biochrom AG (Berlin)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin)
Protease-Inhibitor cOmplete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, APC conjugated	Caltag Laboratories (Carlsbad, CA, USA)
rat anti-mouse GR-1, PE conjugated	BD Biosciences (Heidelberg)
Rompun 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA	Gibco (Carlsbad, CA, USA)

6.1.2 Geräte und Apparaturen

Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & CO.KG (Lauda-Königshofen)
Bio-Plex™ Millipore	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex™ Workstation	BioRad Laboratories (München)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Differentialdruckaufnehmer MPX Typ 399/2 und Validyne DP 45-14	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Druckaufnehmer P75 Typ 379	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
FACS Calibur™ (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
Fiberoptik-Laryngoskop für Kleinnager	Welch Allyn GmbH & CO.KG (Jungingen)
IKA®-Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kühlschrank (4 °C)/Gefrierschrank (-80 °C)	Engmann Kühleysteme GmbH (Mannheim)

Megafuge 1.0R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit Axiocam und LSM 5 Pascal)	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
Mikroskop Labolux 12 Typ: 020-435.025	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH (Wertheim-Mondfeld)
Photometer UvikonXS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Plexiglaskammer (Größe 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Plugsys®-Grundgerät mit Messmodulen (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Rektalsonde physitemp Model BAT-12	physitemp Instruments, Inc. (Clifton, NJ, USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Software Pulmodyn® W	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Variomag® Elektronikrührer Mono	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
Waage Model CS 200	Ohaus Corporation (Parsippany, NJ, USA)
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

6.1.3 Verbrauchsmaterialien

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BD Falcon 12-well Multiwell Plate.	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon Zellkulturflasche, 250ml, belüftet	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount™ Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 µl)	Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden)
Falcon Blue Max™ (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Brüssel, Belgien)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit™ II (2 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipak™ (1 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Venenverweilkanüle BD Neoflon™ (24 G)	BD Biosciences (Heidelberg)

6.2 Abkürzungen

AGP	<i>aminoalkyl glucosaminide phosphates</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrom</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BALT	<i>bronchus-associated lymphoid tissue</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAP	<i>community-acquired pneumonia</i> , ambulante erworbene Pneumonie
CbpA	<i>choline-binding protein A</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG-ODN	<i>CpG-oligodeoxynucleotide</i>
d	Tage
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Gauge
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
h	Stunden
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HE	Hämatoxylin-Eosin
I.E.	internationale Einheiten

i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferon gamma
IKK α	<i>IκB kinase α</i>
IKK β	<i>IκB kinase β</i>
IL	Interleukin
IPML	isoliert perfundierte Mauslunge
IRAKs	<i>IL-1 receptor-associated kinases</i>
I κ Bs	<i>NF-κB inhibitors</i>
KC	<i>keratinocyte-derived cytokine; CXCL1</i>
KM	Körpermasse
LD50	Letale Dosis für 50 % der Mäuse
LPS	Lipopolysaccharid
MALP-2	<i>macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MARCO	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MCP-1	<i>macrophage chemoattractant protein-1; CCL2</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i>
MDHM	<i>Mycoplasma fermentans-derived high-molecular-weight material</i>
MEM	<i>modified eagle medium</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
MIP-2	<i>macrophage inflammatory protein 2</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NA	Neuraminidase
NaCl 0,9 %	isotone Kochsalzlösung
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NEMO	<i>NF-κB essential modifier</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

NO	Stickstoffmonoxid
n.d.	nicht detektierbar
OD	Optische Dichte
PAFR	<i>platelet activating factor receptor</i>
Pam3Cys	<i>N-α-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-L-cysteine</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll proteins</i>
pfu	<i>plaque forming units</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PsaA	<i>pneumococcal surface adhesin A</i>
PspA	<i>Pneumococcal Surface Protein A</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i> ; CCL5
rpm	<i>rounds per minute</i>
<i>S. pneumoniae (S.pn.)</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , Pneumokokken
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
sec	Sekunden
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
TAK1	<i>transforming growth factor-β-activated kinase-1</i>
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF6	<i>TNF receptor associated factor 6</i>
vs.	<i>versus</i>
μ l	Mikroliter

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
Abbildung 2: Influenza-A-Virus	13
Abbildung 3: Struktur des MALP-2	22
Abbildung 4: Signaltransduktion von TLR-2/6	22
Abbildung 5: Schema Studiendesign	28
Abbildung 6: Schematischer Versuchsablauf Teil 1.	40
Abbildung 7: Leukozytendifferenzierung in der BALF nach MALP-2-Applikation	41
Abbildung 8: Zytokinkonzentration in der BALF nach MALP-2-Applikation	42
Abbildung 9: Leukozytendifferenzierung im Blut nach MALP-2-Applikation	44
Abbildung 10: Interleukin-6-Konzentration im Blutplasma	45
Abbildung 11: Klinische Parameter im Verlauf von 10 d nach Influenzavirusinfektion	46
Abbildung 12: Approximative Überlebensrate bei Influenzavirusinfektion und MALP-2-Behandlung	46
Abbildung 13: Schematischer Versuchsablauf Teil 2	47
Abbildung 14: Leukozytendifferenzierung in der BALF nach sekundärer <i>S. pneumoniae</i>-Infektion	48
Abbildung 15: Zytokinkonzentration in der BALF bei sekundärer bakterieller Pneumonie	50
Abbildung 16: Leukozytendifferenzierung im Blut bei sekundärer <i>S. pneumoniae</i>-Pneumonie	51
Abbildung 17: Interleukin-6-Konzentration im Blutplasma bei sekundärer <i>S. pneumoniae</i>-Pneumonie	52
Abbildung 18: Histologische Untersuchung der Lunge in HE-Färbung	55

Abbildung 19: Anteil der Lungenabschnitte mit entzündlichen Veränderungen an der Gesamtlunge.....	55
Abbildung 20: Viruslast in der Lunge 7 d nach Influenzavirusinfektion	56
Abbildung 21: Bakterienlast in der Lunge 1 d nach sekundärer <i>S. pneumoniae</i> -Infektion ..	57
Abbildung 22: Bakterienlast im Blut 1 d nach sekundärer <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	57
Abbildung 23: Approximative Überlebensrate nach MALP-2-Behandlung bei Influenza und sekundärer Pneumokokkenpneumonie.....	58
Abbildung 24: Körpermasse [%] im Verlauf der Influenza/ <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	59
Abbildung 25: Körpertemperatur [°C] im Verlauf der Influenza/ <i>S. pneumoniae</i> -Infektion.....	60
6.4 Tabellenverzeichnis	
Tabelle 1: Untersuchungsgruppen.....	27
Tabelle 2: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren.....	30

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Peter Radünzel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des Lipopeptides MALP-2 auf den Verlauf der sekundären Pneumokokkenpneumonie nach Influenzavirusinfektion im murinen Modell“ 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 etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, 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.“

Berlin 28.08.2017

Peter Radünzel

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Peter Radünzel hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Reppe K, **Radünzel P**, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M. Pulmonary Immunostimulation with MALP-2 in Influenza Virus-Infected Mice Increases Survival after Pneumococcal Superinfection. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4617-29.

Beitrag im Einzelnen:

- a) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Konzeption und die Planung der Experimente erfolgte in Zusammenarbeit von P.R., K.R. und M.W. Die Planung und Koordinierung der einzelnen Teilerperimente erfolgte durch P.R.
- b) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente und Analysen wurden überwiegend von P.R. selbstständig durchgeführt und ausgewertet. An der Infektion und Behandlung der Tiere war K.R. zusätzlich beteiligt. Die spezielle histologische Aufarbeitung und Auswertung der Gewebe erfolgte durch K.D. und A.G. am Institut für Tierpathologie der FU Berlin.
- c) Schreiben der Publikation: Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts wurde vom Erstautor durchgeführt. An der Verbesserung des Entwurfs und der Revision des Manuskripts entsprechend der Gutachterkommentare hatten alle Koautoren (u.a. auch P.R.) Anteil. Die zusätzlichen Experimente wurden von P.R. in Zusammenarbeit mit K.R. durchgeführt.

Prof. Dr. med. Martin Witzenrath

Peter Radünzel

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Reppe K, **Radünzel P**, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, Gruber AD, Suttorp N, Witzenrath M. Pulmonary Immunostimulation with MALP-2 in Influenza Virus-Infected Mice Increases Survival after Pneumococcal Superinfection. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4617-29.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Promotionsarbeit begleitet und unterstützt haben.

Dem Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp danke ich für die Möglichkeit in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie forschen und arbeiten zu dürfen.

Meinem Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Martin Witzenrath danke ich für die Bereitstellung eines spannenden und vielseitigen Promotionsthemas, für seine Förderung und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Ich danke Dr. Katrin Reppe, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand für die engagierte Betreuung und Einarbeitung und die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Kooperationspartnern auch außerhalb der Klinik: Insbesondere Dr. Kristina Dietert und Prof. Achim Gruber vom Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin danke ich für die Durchführung der histologischen Untersuchung. Den Herren Prof. Peter Mühlradt und Prof. Thomas Tschernig danke ich für die Bereitstellung von MALP-2. Herrn PD Dr. Thorsten Wolff vom Robert-Koch-Institut danke ich für die Abgabe des verwendeten Influenza-A-Virus.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Kollegen der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, insbesondere den anderen Doktoranden und den Mitarbeitern im Forschungslabor am Campus Mitte für die stets angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Ermutigung bei dieser langjährigen Arbeit und auch für die hin und wieder notwendige Ablenkung.