

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

Eingereicht über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Die Bedeutung von Surfactantprotein A für die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maren-Verena Zemlin
Tierärztin
aus Neuss

Berlin 2007

Journal-Nr.: 3172

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. N. Suttorp
Dritter Gutachter: PD Dr. Dr. P. Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Mice, animal models, lungs, respiratory diseases, Streptococcus pneumoniae,
bacteraemia, surfactants, immune response

Tag der Promotion: 06.03.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN-10: 3-86664-402-7

ISBN-13: 978-3-86664-402-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2007
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

» Man sieht nur mit dem Herzen gut. Das Wesentliche ist für die Augen unsichtbar. «

Antoine de Saint-Exupéry aus `Der kleine Prinz`

In Gedenken an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	11
1 Einleitung.....	13
2 Schrifttum	14
2.1 <i>Ambulant erworbene Pneumonie</i>	<i>14</i>
2.2 <i>Lunge und Immunabwehr.....</i>	<i>16</i>
2.3 <i>Zytokine</i>	<i>18</i>
2.4 <i>Surfactant</i>	<i>19</i>
2.5 <i>Surfactantproteine</i>	<i>21</i>
2.6 <i>Struktur und Funktion des Surfactantprotein A.....</i>	<i>22</i>
3 Material.....	30
3.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	<i>30</i>
3.2 <i>Geräte und Apparaturen.....</i>	<i>31</i>
3.3 <i>Präparationsplatz zur Erfassung von Kenngrößen der Atmungsmechanik</i>	<i>32</i>
3.4 <i>Antikörper.....</i>	<i>33</i>
3.5 <i>DNA-Isolierung und PCR-Reagenzien.....</i>	<i>33</i>
3.6 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>34</i>
3.7 <i>Bakterien</i>	<i>35</i>
3.8 <i>Versuchstiere</i>	<i>35</i>
4 Methoden.....	37
4.1 <i>Studiendesign.....</i>	<i>37</i>

Inhaltsverzeichnis

4.2	Tierhaltung	38
4.3	Genotypisierung mittels DNA-Isolierung und PCR	39
4.4	Herstellung eines Arbeitsstocks.....	40
4.5	Ansatz des Mediums zur Anzucht von <i>S. pneumoniae</i>	41
4.6	Anzucht von <i>S. pneumoniae</i>	41
4.7	Infektion der Mäuse mit <i>S. pneumoniae</i>	42
4.8	Blutdruckmessung, arterielle Blutentnahme und Gewinnung der BALF.....	42
4.9	Ermittlung der Bakterienlast in Blut und BALF.....	43
4.10	Differenzierung der Leukozyten in Blut und BALF	43
4.11	Zytokinquantifizierung mit dem Bio-Plex Cytokine Assay	45
4.12	Erfassung von Kenngrößen der Atmungsmechanik.....	46
4.13	Ermittlung der pulmonalen Schrankenstörung	47
4.14	Histologie	49
4.15	Statistik.....	50
5	Ergebnisse	51
5.1	Genotypisierung von <i>SP-A^{-/-}</i> , <i>SP-A^{+/-}</i> und <i>WT</i> Mäusen	51
5.2	<i>SP-A^{-/-}</i> , <i>SP-A^{+/-}</i> und <i>WT</i> Mäuse zeigen nach der Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> keine Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild.....	52
5.3	<i>SP-A^{-/-}</i> Mäuse zeigen eine höhere Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit.....	53
5.4	<i>SP-A</i> hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge	54
5.5	<i>SP-A</i> hat keinen Einfluss auf das histologische Bild der Pneumokokkenpneumonie... 57	
5.6	<i>SP-A^{-/-}</i> Mäuse weisen eine erhöhte Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Lunge auf.....	59

Inhaltsverzeichnis

5.7	<i>SP-A hat keinen Einfluss auf die Veränderung des pulmonalen Gasaustauschs, die Schrankenstörung und Kenngrößen der Atmungsmechanik</i>	61
5.8	<i>SP-A zeigt weder Einfluss auf die bakterielle Translokation aus der Lunge in die systemische Zirkulation noch auf die Ausbildung einer Pneumokokkensepsis</i>	63
5.9	<i>SP-A hat im Mausmodell keinen Einfluss auf den klinischen Ausgang der schweren Pneumokokkenpneumonie</i>	66
5.10	<i>Auch bei Verwendung von niedrigeren Infektionsdosen beeinflusst SP-A den Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie nicht</i>	67
6	Diskussion	70
6.1	<i>Pulmonale Abwehr</i>	70
6.2	<i>Inflammation und Kenngrößen der Atmungsmechanik</i>	73
6.3	<i>Bakterielle Translokation von der Lunge in die systemische Zirkulation und Ausbildung einer Pneumokokkensepsis</i>	77
6.4	<i>Klinischer Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie</i>	79
6.5	<i>Heterozygot SP-A-defiziente (SP-A^{+/-}) Mäuse</i>	80
6.6	<i>Fazit und Ausblick</i>	80
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	85
9	Literaturverzeichnis	87
	Danksagung	95
	Selbstständigkeitserklärung	97

Abkürzungsverzeichnis

ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AM	Alveolarmakrophagen
Aqua dest.	Aqua destillata
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C1qR	<i>C1q Receptor</i>
CAP	<i>Community-acquired Pneumonia</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cfu	<i>Colony Forming Units</i>
CL	Collectin
CMV	Cytomegalie Virus
DC	<i>Dendritic Cell</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
F _i O ₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>

Abkürzungsverzeichnis

HSA	Humanes Serum Albumin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
IRDS	<i>Infant Respiratory Distress Syndrom</i>
KC	<i>Keratinocyte Chemoattractant</i> (Homolog zu humanem IL-8)
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
OD	Optische Dichte
P _a O ₂	O ₂ -Partialdruck im arteriellen Blut
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehydlösung
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RSV	<i>Respiratory Syncycial Virus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (syn. Pneumokokken)
SP-A	Surfactantprotein A
SP-A ^{-/-} Mäuse	homozygot SP-A-defiziente Mäuse
SP-A ^{+/-} Mäuse	heterozygot SP-A-defiziente Mäuse

Abkürzungsverzeichnis

SP-B (-C, -D)	Surfactantprotein B (C, D)
TGF- β	<i>Transforming Growth factor-β</i>
THY	Todd Hewitt-Bouillion
TMB	<i>Tetramethylbenzidine Liquid Substrate</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
WT Mäuse	Wildtyp Mäuse

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	Gegenüberstellung der Definitionen von ALI und ARDS
Tabelle 2:	Funktionen der Collectine SP-A und SP-D im Vergleich
Tabelle 3:	Interaktion von SP-A mit verschiedenen Pathogenen
Tabelle 4:	Studiendesign
Tabelle 5:	Primer-Sequenzen zur Überprüfung der Versuchsmäuse auf Homo- bzw. Heterozygotie
Abbildung 1:	Surfactant im Alveolarraum
Abbildung 2:	Struktur der Collectine
Abbildung 3:	Genotypisierung
Abbildung 4:	Bakterienlast in der BALF
Abbildung 5:	Differentialzellbild in der BALF
Abbildung 6:	Differentialzellbild im Blut
Abbildung 7:	Histologische Untersuchung
Abbildung 8:	Zytokinkonzentration in der BALF
Abbildung 9:	Kenngößen der Atmungsmechanik und Schrankenstörungen in der Lunge
Abbildung 10:	Bakterienlast im Blut
Abbildung 11:	Zytokinkonzentration im Plasma
Abbildung 12:	Sepsisparameter
Abbildung 13:	Mortalität
Abbildung 14:	Dosisreihe

1 Einleitung

Die ambulant erworbene Pneumonie (*Community-acquired Pneumonia*, CAP) stellt eine der häufigsten lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten in Deutschland dar (54; 66). Der häufigste Erreger der CAP ist *Streptococcus (S.) pneumoniae* (9; 54). Aus Studien ist bekannt, dass Pneumonien mit einem erniedrigten Spiegel des Surfactantproteins A (SP-A) in der bronchoalveolären Lavage assoziiert sind (3; 18). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass SP-A eine zentrale Komponente im Abwehrsystem der Lunge darstellt. So ist SP-A in der Lage, sowohl in vitro als auch im Mausmodell, an eine Vielzahl pulmonaler Infektionserreger zu binden und zu einer rascheren Beseitigung der in die Lunge eingedrungenen Pathogene beizutragen (60; 69). Aus in vitro Untersuchungen ist zudem bekannt, dass SP-A auch die Phagozytose von *S. pneumoniae* steigern kann (20; 38; 52). Welche Rolle das Surfactantprotein A in vivo im Zusammenhang mit einer Pneumokokkenpneumonie spielt, ist bislang jedoch noch unbekannt.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es daher, die Rolle des Surfactantproteins A für die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu analysieren. Es wurden dazu Untersuchungen am Ganztier unter Verwendung gentechnisch veränderter Mäuse durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Projektes sind von besonderer Bedeutung für die Abschätzung des therapeutischen Potentials von rekombinantem SP-A bei der schweren Pneumokokkenpneumonie des Menschen.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

- Welche Bedeutung hat SP-A für die *Abwehrkompetenz* gegenüber Pneumokokken in der Lunge, und welche Rolle spielt es für die Ausbildung einer Bakteriämie bzw. Sepsis?
- Welche Bedeutung hat SP-A für die pulmonale bzw. die systemische *inflammatorische Reaktion* bei der Pneumokokkenpneumonie?
- Welche Rolle spielt SP-A für die *pulmonale Funktionsstörung* bei der Pneumokokkenpneumonie, hinsichtlich Gasaustauschfunktion, Integrität der alveolokapillären Barriere und pulmonaler Compliance?
- Welche Bedeutung hat SP-A für den *klinischen Verlauf* der Pneumokokkenpneumonie?

2 Schrifttum

2.1 Ambulant erworbene Pneumonie

In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 800.000 Patienten an einer ambulant erworbenen Pneumonie (*Community-acquired Pneumonia*, CAP). Etwa 250.000 dieser Patienten müssen im Krankenhaus stationär versorgt werden. Die CAP ist damit eine der häufigsten Ursachen für eine Krankenhauseinweisung und stellt darüber hinaus die sechsthäufigste Todesursache in Deutschland dar. An einer ambulant erworbenen Pneumonie versterben in der Klinik 6-8% der Patienten in der Akutphase der Erkrankung, weitere 5% im darauffolgenden halben Jahr. Die CAP ist zudem ein bedeutender Kostenfaktor für das Gesundheitssystem (54; 66).

Der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie ist *Streptococcus pneumoniae*. (9; 54) Es handelt sich hierbei um grampositive, bekapselte Diplokokken. *S. pneumoniae* wächst auf Blutagar in flachen, glattrandigen Kolonien unter Ausbildung einer vergrünenden Hämolyse (α -Hämolyse). Pneumokokken sind fakultativ anaerob; ein Zusatz von CO₂ zur Atmosphäre begünstigt die Anzüchtung der meisten Stämme. Im Gegensatz zu anderen vergrünend wachsenden Streptokokken ist *Streptococcus pneumoniae* gallelöslich und optochinempfindlich (19). Pneumokokken synthetisieren eine Reihe verschiedener Faktoren, die zur Pathogenität des Erregers beitragen. Dies sind im Einzelnen die Polysaccharidkapsel, die Zellwand und verschiedene Proteine, wie Pneumolysin (ein Toxin mit hämolytischen Eigenschaften), Neuraminidase, Hyaluronidase und Autolysin (31). Die Polysaccharidkapsel von *S. pneumoniae* stellt den wichtigsten Virulenzfaktor dar und schützt den Erreger vor Phagozytose. Es lassen sich 90 verschiedene Kapseltypen (Serotypen) unterscheiden, wobei diese unterschiedlich häufig vorkommen. Über 90% der Erkrankungen werden von nur 23 dieser Serotypen verursacht (54). Der Kontakt mit Pneumokokken führt allerdings nicht in jedem Fall zur Ausbildung einer Pneumonie, häufig kommt es nur zu einer passageren oder auch dauerhaften Besiedelung des oberen Respirationstraktes. Querschnittsstudien zeigen, dass etwa 50% aller Kinder und 5% aller Erwachsenen kolonisiert sind. In dieser Zeit kann es durch Mikroaspiration oder direkte Invasion des Erregers zur Erkrankung kommen (54). Im Erkrankungsfall sind Verläufe mit rein pulmonaler Manifestation der Infektion und überwiegend guter Prognose zu beobachten. In einer erheblichen Anzahl von Fällen nimmt

die Pneumokokkenpneumonie aber auch einen schweren Verlauf mit akutem Lungenversagen, Sepsis und konsekutivem Multiorganversagen; die Prognose dieser Fälle ist sehr ernst (13). Die Ursachen für die unterschiedlichen Verläufe sind unklar: auf der einen Seite sind vermutlich erregerbedingte Einflussgrößen wie Stamm- oder Serotyp-spezifische Pathogenitätsfaktoren von Bedeutung (Kapselpolysaccharide, Pneumolysin, Proteine, Enzyme), auf der anderen Seite haben auch wirtsabhängige Faktoren einen erheblichen Einfluss auf die individuelle Immunkompetenz gegenüber *S. pneumoniae*. So erhöhen z.B. eine immunsuppressive Therapie, eine funktionelle oder anatomische Asplenie, AIDS oder chronische Lungenerkrankungen, ebenso wie ein angeborener Mangel an Komplementfaktoren oder Immunglobulinen das Risiko, an einer schweren Pneumokokkenpneumonie zu erkranken. Vermutlich determinieren auch Genpolymorphismen von Abwehrfaktoren der angeborenen oder erworbenen Immunität den Verlauf einer Pneumokokkeninfektion. Weitere Erkrankungen, die neben einer Pneumonie von *S. pneumoniae* verursacht werden können, sind Sinusitis, Otitis media und Meningitis (31).

In schweren Fällen kann eine Pneumokokkenpneumonie zu einem akuten Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrom, ARDS) führen. Zur respiratorischen Insuffizienz kommt es durch eine diffuse Schädigung des Lungenparenchyms, die Ventilations-, Perfusions- und Verteilungsstörungen, ein Permeabilitätslungenödem, die Ausbildung hyaliner Membranen und den Abbau von Surfactant nach sich ziehen kann. Als funktionelle Störungen treten beim ARDS typischerweise eine arterielle Hypoxämie, eine verminderte Compliance der Lunge und eine erhöhte Totraumventilation durch Ventilations-Perfusions-Verteilungsstörungen auf (4; 64). Im Jahr 1992 wurde auf der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz die Definition des ARDS präzisiert und von der mildereren Form des akuten Lungenversagens (Acute Lung Injury, ALI) abgegrenzt (5) (siehe Tabelle 1). Neben einer Pneumonie kann das ARDS auch durch andere direkte Lungenschädigungen wie z.B. nach Aspiration von Mageninhalt, Inhalation toxischer Gase oder Beinahe-Ertrinken ausgelöst werden. Systemische inflammatorische Ereignisse wie z.B. Sepsis, Polytrauma oder akute Pankreatitis können indirekt zu einer Lungenschädigung führen und ebenfalls ein ARDS auslösen.

Tabelle 1: **Gegenüberstellung der Definitionen von ALI und ARDS.** modifiziert nach (5)

	ALI (Acute Lung Injury)	ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrom)
Beginn	akut	akut
Oxygenierung	$P_aO_2/F_iO_2 \leq 300$ mmHg	$P_aO_2/F_iO_2 \leq 200$ mmHg
Radiologie Thorax	diffuse Verschattungen beidseits	diffuse Verschattungen beidseits
pulmonalkapillärer Verschlussdruck	≤ 18 mmHg (falls gemessen) oder fehlender klinischer Anhalt für erhöhten linksatrialen Druck	≤ 18 mmHg (falls gemessen) oder fehlender klinischer Anhalt für erhöhten linksatrialen Druck

Oftmals kommt es trotz rechtzeitiger Antibiotikatherapie zu einem schweren Verlauf der Pneumokokkenpneumonie mit Ausbildung eines ARDS und einer Sepsis. Hierfür sind möglicherweise Störungen des pulmonalen Immunsystems bzw. eine Dysregulation der inflammatorischen Abwehrreaktion in der Lunge verantwortlich.

2.2 Lunge und Immunabwehr

Die Lunge stellt eine der größten Kontaktflächen zur Umwelt dar und ist über die Atemluft ständig einer großen Anzahl von Schadstoffen, Allergenen und Infektionserregern (wie Bakterien oder Viren) ausgesetzt. Verschiedenste Mechanismen sind an der Aufrechterhaltung der Sterilität in den unteren Atemwegen und der Lunge beteiligt. Dazu gehören die Filtereinrichtungen im Nasopharynxbereich und den oberen Atemwegen, sowie mechanische Reflexe wie Niesen oder Husten, und ebenso der stetige Abtransport des Bronchialsekrets über den Mukoziliarapparat. Partikel oder Pathogene, die eine Größe von $5\mu\text{m}$ unterschreiten, können bis in die Alveolen gelangen. Zur Elimination auch solcher Erreger ist die Lunge mit einem komplexen System angeborener, unspezifischer Abwehrmechanismen ausgestattet. Hierzu zählen Surfactant (insbesondere mit den Surfactantproteinen A und D), Immunzellen der unspezifischen Abwehr (wie Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten), sowie das Komplementsystem (68; 69).

Das Immunsystem verfügt über angeborene (unspezifische) und erworbene (spezifische) Abwehrmechanismen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und Granulozyten) bilden eine erste Verteidigungslinie gegenüber eindringenden Erregern und sind vor allem in der Abwehr von bakteriellen Infektionen bedeutsam. Nicht immer ist allerdings eine vollständige Beseitigung der Pathogene allein durch die angeborene Immunität möglich. Zudem können einige Erreger nicht von den angeborenen Immunzellen erkannt werden. Die erworbene Immunität wird durch die Lymphozyten und spezifische Antikörper vermittelt. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: B-Lymphozyten, die nach ihrer Aktivierung zu Plasmazellen differenzieren und antigenspezifische Antikörper freisetzen, sowie T-Lymphozyten. Letztere unterteilen sich in zytotoxische T-Zellen, die in der Lage sind virusinfizierte Zellen abzutöten, T-Helferzellen und T-Suppressorzellen. Sowohl B- als auch T-Lymphozyten bilden nach Kontakt mit einem spezifischen Antigen Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere Immunantwort ermöglichen. Das angeborene und das erworbene Immunsystem arbeiten jedoch nicht getrennt voneinander, sondern die Abwehrmechanismen sind miteinander verwoben. So sind die Zellen des angeborenen Immunsystems an der Beseitigung der durch spezifische Immunzellen detektierten Pathogene ebenso beteiligt wie an der Regulation der Immun- und Entzündungsreaktion.

Das angeborene unspezifische Immunsystem ist nicht darauf ausgerichtet, viele verschiedene Antigene zu erkennen. Es ist vielmehr in der Lage, bestimmte Gruppen hochkonservierter Strukturen zu identifizieren, die von einer Vielzahl von Mikroorganismen exprimiert werden. Alveolarmakrophagen stellen durch ihre Befähigung zur Phagozytose die wichtigsten unspezifischen Immunzellen im Alveolarraum dar. Bei der Phagozytose handelt es sich um einen komplexen Vorgang, bei dem es nach Erkennen, Bindung und Aufnahme letztendlich zur Zerstörung eines Pathogens durch den Phagozyten kommt. Makrophagen beseitigen dabei den größten Teil der eingedrungenen Fremdstoffe und Pathogene ohne Auslösen einer Inflammation. Eine Entzündungsreaktion wird meist erst ausgelöst, wenn weitere Immunzellen zur Unterstützung der Makrophagenreaktion in die Lunge rekrutiert werden. Aktivierte Komplementkomponenten können durch Opsonisierung von Mikroorganismen die Phagozytosekapazität von Makrophagen steigern. Das Komplementsystem stellt einen weiteren Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar, das u.a. durch bestimmte Muster auf bakteriellen Oberflächen aktiviert werden kann und zu einer Kaskade von proteolytischen

Reaktionen führt. Neben den Alveolarmakrophagen und dem Komplementsystem sind auch neutrophile Granulozyten unverzichtbare Bestandteile des angeborenen Immunsystems. Sie sind sowohl zur Phagozytose als auch zur Produktion von zytotoxischen Radikalen befähigt, und tragen so erheblich zur Beseitigung von eingedrungenen Mikroorganismen bei. Neutrophile Granulozyten sind unter physiologischen Bedingungen nicht im Alveolarraum anzutreffen. Sie zirkulieren im Blut, wobei ein Großteil der neutrophilen Granulozyten einen Pool im pulmonalen Gefäßbett bildet. Erst wenn Alveolarmakrophagen allein nicht mehr in der Lage sind, die in die Lunge eingedrungenen Fremdstoffe und Pathogene zu beseitigen, werden die neutrophilen Granulozyten aus dem pulmovaskulären Pool, sowie weitere Immunzellen, in den Alveolarraum rekrutiert. Diese Rekrutierung erfolgt u.a. durch die Synthese und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aus aktivierten Makrophagen (29).

2.3 Zytokine

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und G-CSF, sowie die Chemokine KC, MCP-1 und MIP-1 α in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit (BALF) und in Plasmaproben gemessen, sie werden deshalb im Folgenden kurz vorgestellt.

Zytokine sind kleine Proteine (~ 25 kDa), die im Organismus von den verschiedensten Zellen als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren Reaktionen auslösen. Sie können autokrin wirken und das Verhalten der Zelle beeinflussen die sie freisetzt, oder parakrin, d.h. durch Beeinflussung benachbarter Zellen, sowie zum Teil endokrin, indem sie auf entfernt liegende Zellen einwirken. Letzteres hängt zum einen davon ab, ob sie in den Blutkreislauf gelangen, zum anderen aber auch von ihrer Halbwertszeit. IL-1 β wird u.a. von Makrophagen und Epithelzellen sezerniert und führt zur Aktivierung von T-Zellen und anderen Makrophagen. IL-1 β wird auch als proinflammatorisches Zytokin bezeichnet. IL-10 hingegen wird zu den antiinflammatorischen Zytokinen gezählt, da es, aus T-Zellen und Makrophagen freigesetzt, ein wirksamer Inhibitor sämtlicher Makrophagenfunktionen ist. IL-6 stammt aus T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen und fördert das Wachstum von T- und B-Zellen, sowie die Produktion von Proteinen der akuten Phase. IL-6 hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen.

Der Wachstumsfaktor G-CSF stimuliert die Entwicklung und Differenzierung neutrophiler Zellen und wird von Fibroblasten und Monozyten gebildet.

Eine Untergruppe der Zytokine bilden die Chemokine, kleine Proteinmoleküle (8-10 kDa) mit der Eigenschaft von Chemoattraktoren, die in der frühen Phase einer Infektion freigesetzt werden und Zellen mit den passenden Rezeptoren veranlassen, zur Quelle der sezernierten Chemokine zu wandern (gerichtete Chemotaxis). Sie veranlassen z.B. Monozyten und neutrophile Granulozyten aus dem Blut in die Lunge einzuwandern. Aber auch Lymphozyten als Bestandteil der spezifischen Abwehr können chemotaktisch an den Ort des Entzündungsgeschehens rekrutiert werden. Die Chemokine locken die Leukozyten nicht nur an den Ort der Infektion, sondern ermöglichen ihnen auch den Übertritt vom Blutstrom ins Gewebe. Sie wandeln die „Roll“-bewegung der Leukozyten entlang der Endothelzellen im Bereich des Infektionsherdes in eine stabile Bindung um, indem sie bei den Adhäsionsmolekülen, den sogenannten Leukozyten-Integrinen, eine Konformationsänderung hervorrufen. Ein Leukozyt kann sich daraufhin zwischen den Endothelzellen hindurchschieben und so die Wand eines Blutgefäßes passieren. Die Chemokine KC (das Homolog bei der Maus zum humanen IL-8), MCP-1 und MIP-1 α werden von einer Reihe von Zellen sezerniert, so z.B. von Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, Fibroblasten und Keratinozyten. Die Funktionen dieser Chemokine ergänzen sich, so veranlasst KC neutrophile Granulozyten den Blutkreislauf zu verlassen und in die umgebenden Gewebe einzuwandern, während MCP-1 und MIP-1 α die Auswanderung von Monozyten aus den Gefäßen und damit ihre Entwicklung zu Gewebsmakrophagen steuern. Daneben wirken sie auch auf z.B. T-Zellen, NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) und dendritische Zellen chemotaktisch (30).

2.4 Surfactant

Bevor in die Alveolen eingedrungene Pathogene mit den Effektorzellen des Abwehrsystems in der Lunge interagieren, treffen diese auf einen die gesamte Alveolarfläche bedeckenden Oberflächenfilm, das Surfactantsystem. Der Begriff Surfactant leitet sich aus dem Englischen ab und ist eine Abkürzung für Surface Active Agent, was soviel wie oberflächenaktiver Stoff bedeutet. Entdeckt wurde Surfactant in den 50er-Jahren, erstmals therapeutisch eingesetzt wurde synthetisches Surfactant in den 80er-Jahren beim sogenannten Atemnotsyndrom der

Frühgeborenen (IRDS infant respiratory distress syndrom), das auf einem Mangel an Surfactant beruht (10; 11).

Surfactant wird von Typ II-Pneumozyten gebildet, in speziellen Organellen, den Lamellarkörperchen gespeichert und bei Bedarf aus diesen freigesetzt. Es gibt demnach zwei Fraktionen von Surfactant, die intrazelluläre Speicher- und Abbauf orm und die extrazelluläre Form, die in den Alveolarraum sezerniert wird. Angaben zur Zusammensetzung des Surfactant beziehen sich jeweils auf die letztgenannte Fraktion, die mit Hilfe einer BAL gewonnen werden kann (69).

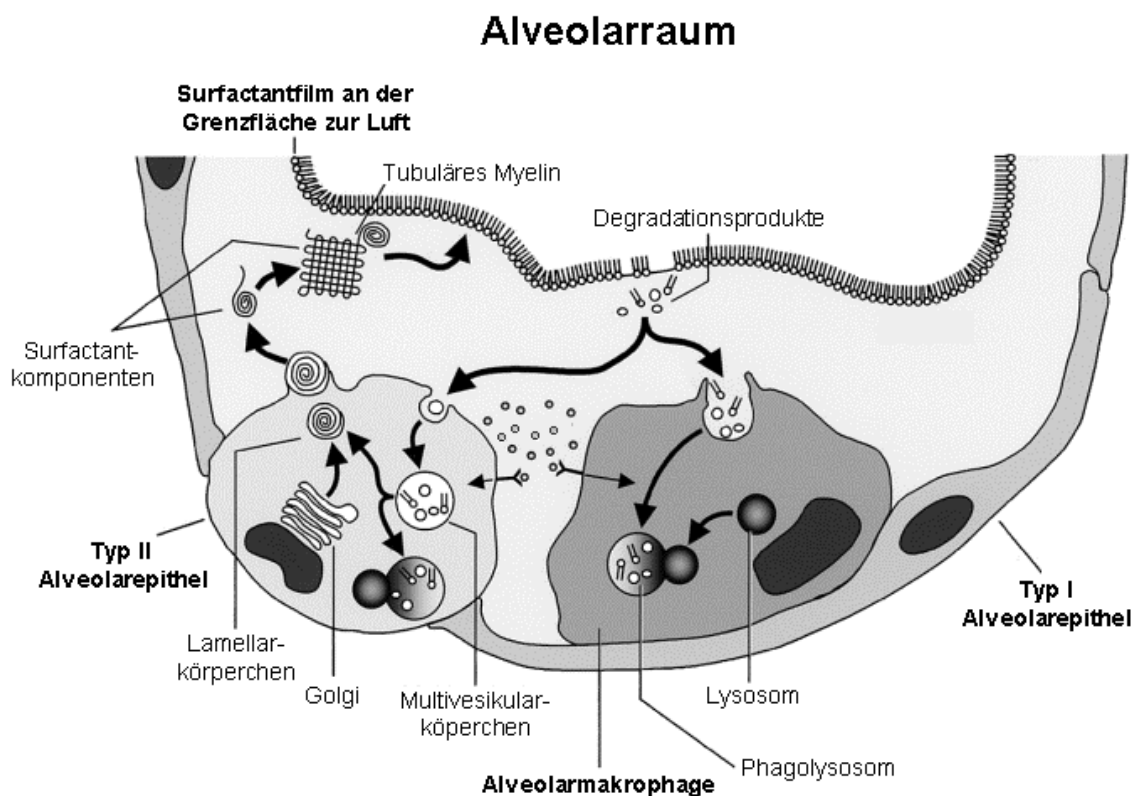


Abbildung 1: **Surfactant im Alveolarraum.** modifiziert nach (62)

Beim Surfactant handelt es sich um ein Gemisch aus Lipiden und Proteinen, wobei die Lipide mit 90% den größten Anteil bilden. Die restlichen 10% entfallen zum einen auf Proteine (8%), zum anderen auf Kohlenhydrate (2%), die kovalent an Proteine und Lipide gebunden sind.

Die Lipidfraktion besteht zu 90% aus Phospholipiden, wobei Phosphatidylcholin das mengenmäßig häufigste und zudem funktionell wichtigste Phospholipid darstellt. Es ist die bedeutendste Surfactantkomponente in Bezug auf die Reduktion der Oberflächenspannung. In geringen Mengen finden sich auch Cholesterin, Triacylglycerol und freie Fettsäuren im Surfactantgemisch (10; 69). Bemerkenswert ist die nahezu gleiche Zusammensetzung des Surfactant bei allen Säugetieren. Dies ermöglicht unter anderem den therapeutischen Einsatz von z.B. Rindersurfactant beim Menschen (10).

Die Surfactantschicht an der Luft-Wasser-Grenzfläche stellt sich in einer Modellbetrachtung als Monolayer dar, welcher aus den amphiphilen Phospholipiden zusammengesetzt ist. Dabei ragen die hydrophoben Acyl-Seitenketten in die apolare Luftschicht, während die hydrophilen Phosphatgruppen mit der wässrigen Phase in Wechselwirkung treten. Dieser Monolayer ermöglicht die dynamische Veränderung der Oberflächenspannung, indem er während der Ein- und Ausatmung im Wechsel ausgedehnt und wieder komprimiert wird (55).

Die Aufgaben und Funktionen von Surfactant sind sehr vielfältig: die wohl bedeutendste Funktion ist die Senkung der Oberflächenspannung der Alveolen auf etwa $1/10$ im Vergleich zur reinen Luft-Wasser-Grenzfläche, wodurch eine gleichzeitige Belüftung von Alveolen unterschiedlichen Durchmessers ermöglicht und die für die Atemtätigkeit aufzuwendende Kraft reduziert wird. Daneben verhindert Surfactant die Austrocknung der empfindlichen Alveolarmembran, ist am Sekrettransport beteiligt und trägt zum Schutz vor O_2 -Radikalen bei. Darüber hinaus vermag das Surfactantsystem gewebezerstörende Entzündungsreaktionen im Alveolarraum abzumildern. So kann die empfindliche alveolokapilläre Membran vor Schäden bewahrt werden und die Gasaustauschfunktion bleibt weiterhin sichergestellt. Mit den hydrophilen Surfactantproteinen A und D beinhaltet das Surfactantgemisch zudem wichtige Komponenten des pulmonalen Immunsystems (6; 10).

2.5 Surfactantproteine

Neben den für die lokale Immunabwehr bedeutsamen hydrophilen Surfactantproteinen A und D sind zwei weitere Surfactantproteine bekannt, die hydrophoben Surfactantproteine B und C. Diese vier verschiedenen Surfactantproteine wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit den Buchstaben A bis D (SP-A, SP-B, SP-C und SP-D) benannt. Mit Ausnahme von SP-C

sind die Surfactantproteine nicht ausschließlich in der Lunge lokalisiert, sie sind – wenn auch in sehr geringen Mengen – in anderen Geweben nachgewiesen worden, so zum Beispiel im Magen-Darm-Trakt, im Mittelohr, im Gehirn und in den Nieren (32; 48; 63; 69). Die Funktion der Surfactantproteine in diesen Organen ist weitgehend unklar, für SP-A wird ein Beitrag zur lokalen Abwehr vermutet (33).

Die hydrophoben Proteine SP-B und SP-C sind maßgeblich an der Senkung der Oberflächenspannung beteiligt, indem sie den Einbau der Phospholipide und deren Anordnung innerhalb des Surfactantfilms steuern. Ein Fehlen dieser beiden Proteine, z.B. durch eine Mutation bedingt, führt zu schweren Atemstörungen des Neugeborenen, oft mit Todesfolge. Die hydrophilen Proteine, besonders SP-A, sind für die biophysikalische Surfactantfunktion eher von untergeordneter Bedeutung, sie stehen überwiegend im Dienste des pulmonalen Immunsystems und der Infektabwehr. So zeigen SP-A-defiziente Mäuse keine Beeinträchtigungen in Kenngrößen der Atmungsmechanik oder des Surfactant-Lipid-Metabolismus. Bei SP-D-defizienten Tieren zeigen sich zwar Störungen in der Surfactant-Homöostase und der Funktion der Alveolarmakrophagen, die Beeinträchtigungen sind aber bei weitem nicht so schwerwiegend wie beim Fehlen der hydrophoben Proteine (28; 50; 60).

2.6 Struktur und Funktion des Surfactantprotein A

Das Surfactantprotein A gehört (ebenso wie SP-D) zu einer Familie von Proteinen, die als Collectine bezeichnet werden, einer Abkürzung für Collagenous C-type Lectins. Lectine sind Proteine, die meist aus Pflanzen stammen, aber auch bei Bakterien und Tieren vorkommen, und spezifisch mit bestimmten Kohlenhydraten reagieren. Charakterisiert ist die Collectinfamilie durch das Vorhandensein einer kollagenähnlichen Domäne im Molekül, sowie einer als CRD (Carbohydrate-recognition Domain) oder Lectin-Domäne bezeichneten Region. Neben den beiden Lungen-Collectinen SP-A und SP-D gehören auch das humane Serum-Collectin MBL (Mannose-binding Lectin), sowie die bovinen Serumlectine Conglutinin, CL-43 und CL-46 zu dieser Familie (22; 69).

Der Grundaufbau aller Collectine ist gleich: N-terminal findet sich eine nicht-kollagenartige Region, auf die eine kollagenähnliche Domäne mit sich wiederholender Glycin-X-Y Sequenz (wobei an der Stelle X jede beliebige Aminosäure stehen kann, an der Stelle Y jedoch sehr oft

Hydroxyprolin zu finden ist) folgt, welche in eine α -helikal gewundene Schleife (Halsregion) übergeht. C-terminal liegt die „kohlenhydratbindende“ Lectindomäne, die calciumabhängig die Interaktion mit einer Reihe von Pathogenen vermitteln kann. Jeweils drei der gerade beschriebenen Untereinheiten formen ein Trimer. In der weiteren räumlichen Anordnung unterscheiden sich SP-A und SP-D, während die Struktur von MBL der von SP-A sehr ähnlich ist. SP-A ist ein Octadecamer (18-mer), zusammengesetzt aus sechs Trimeren, die jeweils durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, wobei die entstehende Struktur an einen Blumenstrauß erinnert. SP-D hingegen ist aus nur vier Trimeren aufgebaut, die von einer Disulfidbrücke im Mittelpunkt zusammengehalten werden. SP-D ist also ein Dodecamer (12-mer), und hat Ähnlichkeit mit zwei gekreuzten Hanteln (69). Einen anschaulichen Überblick bietet Abbildung 2.

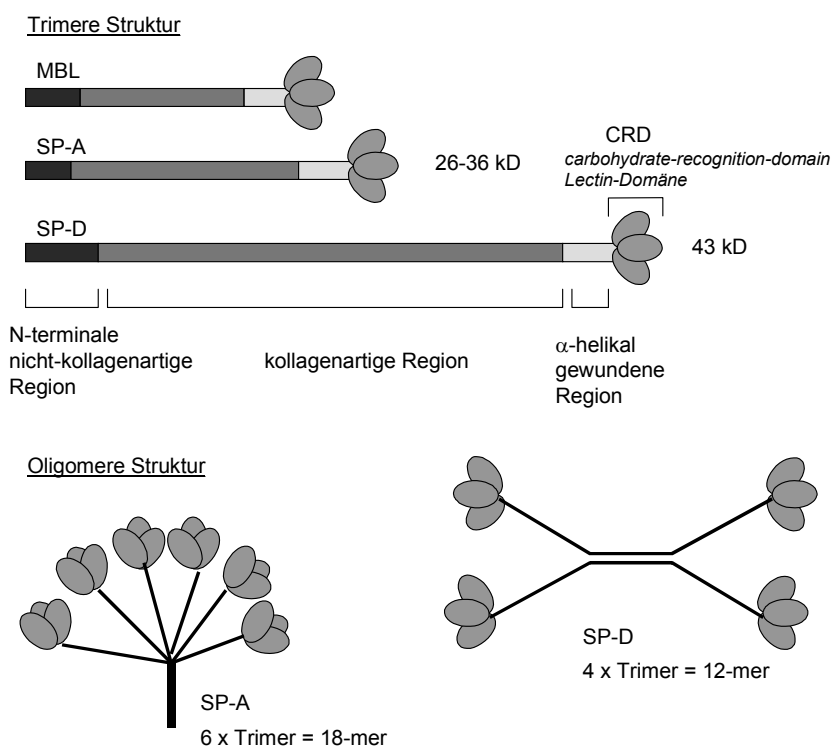


Abbildung 2: **Struktur der Collectine.** modifiziert nach (69)

Die Surfactantproteine werden in den Typ II-Alveolarzellen synthetisiert, in geringem Maße sind bei bestimmten Spezies (z.B. Ratten) jedoch auch andere Lungenzellen, wie etwa Clarazellen, zu deren Bildung befähigt. Das Surfactantprotein A ist maßgeblich an der

Ausbildung der extrazellulären Reserveform des Surfactants, des so genannten tubulären Myelins beteiligt. Hierbei handelt es sich um ein Netzwerk von Surfactant-Phospholipiden an der Oberfläche der Alveolen, das als Präkursorform des Grenzflächenfilms gilt. Die Ausbildung dieser speziellen Surfactant-Aggregate ist nur in Anwesenheit von SP-A möglich. SP-A selber ist in dieses Netzwerk integriert, seine CRDs sind jeweils in den Ecken der Netzwerkstruktur lokalisiert, während die N-terminalen Domänen frei in den Innenraum ragen. Diese besondere Anordnung von SP-A ermöglicht den Aufbau einer ersten „Verteidigungslinie“ gegenüber eindringenden Pathogenen, ohne dass dadurch die Oberflächenaktivität des Surfactant beeinflusst wird (50; 68; 69). SP-A ist an der Kontrolle der Sekretion von Surfactant und an der Wiederaufnahme von Surfactantkomponenten durch die Typ II-Pneumozyten beteiligt, wobei es die Zusammensetzung des intraalveolären Surfactant nicht zu beeinflussen vermag. Darüber hinaus bietet SP-A den Oberflächenbestandteilen des Surfactant Schutz vor Radikalen sowie funktionellen Inhibitoren und senkt die Aktivität der Phospholipase A₂ (6; 10; 50; 57).

In Tabelle 2 sind die wichtigsten Funktionen der Collectine SP-A und SP-D im Vergleich dargestellt:

Tabelle 2: **Funktionen der Collectine SP-A und SP-D im Vergleich.**

	SP-A	SP-D
<u>Aufgaben in der Immunabwehr:</u>		
Agglutination bestimmter Mikroorganismen	+	++
Opsonisierung bestimmter Mikroorganismen	++	+
Regulation der Entzündungsreaktion	+	+
<u>Aufgaben im Zusammenhang mit Surfactant:</u>		
Organisation des tubulären Myelins	+	-
Schutz vor Inaktivierung durch Gerinnungsfaktoren	+	-

Einfluss auf Surfactant-Homöostase - +

Aufgaben im Zusammenhang mit der Lungenstruktur:

Regulation des Lungen-Remodelings - +

Allgemein lassen sich die Aufgaben von SP-A in der Infektabwehr in drei Bereiche gliedern:

1. Steigerung der Phagozytose von eindringenden Pathogenen durch Zellen des Immunsystems, 2. Regulation der Entzündungsreaktion und 3. direkte antibakterielle Wirkung. Dabei ist es jedoch stark von der Art des Pathogens abhängig, welche Auswirkungen die Interaktion von SP-A mit dem jeweiligen Erreger hat.

SP-A kann über verschiedene Wege die Phagozytose von bestimmten Pathogenen aktivieren. So ist SP-A in der Lage, mit Hilfe der CRDs an Pathogene zu binden und diese zu Aggregaten zusammenzufassen. Die so entstehenden Aggregate können von den phagozytierenden Zellen eher erkannt werden als einzelne Pathogene, und damit ist eine effektivere Phagozytose möglich. Des Weiteren kann SP-A nach Bindung eines Pathogens über bestimmte Oberflächenrezeptoren direkt mit Immunzellen (z.B. Makrophagen) interagieren und so zu einer gesteigerten Phagozytoserate beitragen (69). In Ausnahmefällen, abhängig von der Art des Erregers, führt die Interaktion von Phagozyten mit SP-A zu einer verminderten Pathogenaufnahme. So senkt SP-A nach Bindung von *Pneumocystis carinii* die Phagozytoserate von Alveolarmakrophagen deutlich (36). Darüber hinaus kann SP-A die Funktion eines aktivierenden Liganden übernehmen und die Phagozytoserate der Zielzellen steigern. Dabei ist der eingedrungene Erreger bereits durch ein anderes Opsonin (z.B. IgG) gebunden, SP-A steigert nachfolgend die Phagozytose über die Bindung an den C1qR-Rezeptor der Phagozyten. Ein weiterer Weg zur Phagozytosesteigerung durch SP-A ist die Erhöhung der Zahl von Oberflächenrezeptoren auf den Phagozyten, die der Pathogenerkennung dienen (69). Darüber hinaus ist SP-A in der Lage, durch die Förderung der Chemotaxis (70), ebenso wie durch die Aktivierung von Immunzellen und die Verstärkung der Ausschüttung zytotoxischer Radikale („respiratory burst“) (25) die Phagozytose und Beseitigung von Pathogenen zu verbessern.

Das Collectin SP-A spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen in der Lunge, es ist ein Immunmodulator. SP-A ist an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, wie Makrophagen, Granulozyten, Dendritischen Zellen und T-Zellen beteiligt und es beeinflusst somit indirekt auch die Produktion von Zytokinen und zytotoxischen Radikalen (wie Superoxid und Stickoxid). Dabei kann die Entzündungsantwort sowohl verstärkt als auch abgeschwächt werden, abhängig vom gebundenen Rezeptor und dem Aktivierungszustand der Zielzelle. So wird die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren nach Bindung von SP-A an Immunzellen über den CD91-Calreticulin-Komplex (12) oder den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) (17) erhöht, während eine Bindung an das Signal-inhibitory Regulatory Protein- α (SIRP- α) (12) oder TLR2 (59) die Ausschüttung senkt. Neben dem gebundenen Rezeptor ist auch der Aktivierungszustand der Zielzelle von Bedeutung. So führt SP-A nach LPS-Aktivierung zu einer vermehrten Freisetzung von reaktiven Metaboliten wie z.B. Stickoxid aus Makrophagen, wenn diese Makrophagen zuvor durch INF- γ aktiviert wurden. Bleibt diese vorherige Aktivierung aus, unterdrückt SP-A die LPS-induzierte Freisetzung der Stickoxide aus Makrophagen (61). Darüber hinaus beeinflusst auch der jeweils mit SP-A interagierende Erreger die Freisetzung der reaktiven Metaboliten. So vermindert SP-A die Produktion von Stickoxid in Zellen, die zuvor durch INF- γ aktiviert und anschließend mit *Mycoplasma pulmonis* inkubiert wurden (24). Dagegen erhöht SP-A die Synthese von reaktiven Metaboliten als Antwort auf Bacillus Calmette-Guérin (65). Inflammatorische Mediatoren wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) werden durch SP-A ebenfalls in Abhängigkeit vom einwirkenden Pathogen entweder hoch- oder herunterreguliert. SP-A vermindert beispielsweise die Freisetzung von TNF nach Kontakt mit LPS oder bestimmten intakten Bakterien (23; 51; 56). Im Gegensatz dazu erhöht SP-A die TNF-Produktion in Anwesenheit von „rauhem“ LPS (58).

Die Collectine modulieren darüber hinaus indirekt die adaptive Immunantwort, indem sie sowohl die Differenzierung von Dendritischen Zellen (DC) als auch die Proliferation von T-Zellen beeinflussen. SP-A inhibiert ebenso wie der Komplementfaktor C1q die Expression von MHC-II und CD86-Rezeptoren auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen und verhindert so die Reifung der DC. Die DC selbst produzieren durch die Stimulation mit SP-A inhibitorische Mediatoren, wie z.B. IL-10 und TGF- β , was als negatives Feedback den oben beschriebenen Effekt weiter verstärkt. Durch diese Mechanismen unterbleiben sowohl die

DC-Reifung als auch die damit zusammenhängende Proliferation der T-Zellen. Darüber hinaus kontrolliert SP-A die T-Zellantwort im Gewebe und kann so zur Minimierung des Gewebeschadens durch Entzündungsmediatoren beitragen. Im Gegensatz zu SP-A fördert SP-D die Reifung von Dendritischen Zellen nach Phagozytose eines Pathogens, ebenso wie SP-A verhindert es jedoch die weitere Proliferation von T-Zellen (7; 69).

SP-A wirkt durch die Zerstörung von bakteriellen Zellwandstrukturen direkt bakterizid gegenüber bestimmten Bakterienspezies wie *Escherichia coli* und kann so unabhängig von einer Erregeraggregation und nachfolgender Phagozytose zur Elimination von eindringenden Mikroorganismen beitragen. Der Mechanismus dieser antibakteriellen Wirkung ist allerdings noch nicht bis ins Detail bekannt (69; 71).

Die Interaktion von SP-A mit verschiedenen Pathogenen wurde in zahlreichen in vitro Arbeiten untersucht. Dabei hängt es jedoch stark vom Erregertyp ab, wie sich der Kontakt von SP-A mit dem jeweiligen Pathogen auswirkt. SP-A ist in der Lage, an gramnegative Bakterien (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*), grampositive Bakterien (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*), Viren (Influenza A, RSV, CMV), und Pilze (*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*) zu binden und vereinzelt auch zu einer Aggregation der Erreger beizutragen (siehe Tabelle 3; (60)). Darüberhinaus kann SP-A die Phagozytose zahlreicher Pathogene steigern und so die Elimination dieser Erreger beschleunigen. Die durch SP-A verbesserte intrazelluläre Aufnahme von Mikroorganismen führt allerdings nicht in jedem Fall auch zu einer gesteigerten Erregerbeseitigung, da z.B. intrazelluläre Pathogene über diesen Mechanismus leichter in ihre jeweiligen Zielzellen gelangen können und dadurch eine Infektion und Erkrankung gefördert statt verhindert wird. So kann *Mycobacterium tuberculosis* die Bindung an SP-A als Vehikel zur Infektion von Makrophagen nutzen und sich sogar weiter vermehren, da tuberkulozide Stickstoffverbindungen in Anwesenheit von SP-A vermindert freigesetzt werden (53). SP-A fördert zudem die Aufnahme von Cytomegalievirus durch Pneumozyten Typ II und Alveolarmakrophagen und trägt so zur leichteren Infektion mit diesem Virus bei (67).

Tabelle 3: Interaktion von SP-A mit verschiedenen Pathogenen. nach (60)

Erreger	Bindung	Aggregation	Phagozytose ↑
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+ (keine Wirkung als Opsonin)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+		+
<i>Haemophilus influenzae</i>	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+
Gruppe A Streptokokken	+	+	+
Gruppe B Streptokokken	+	(+)	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+		+
<i>Pneumocystis carinii</i>	+		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+		+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	+		
Bacillus Calmette-Guérin	+		+
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+		+ (keine Wirkung als Opsonin)
Influenza A Virus	+	(+)	
Respiratory Syncycial Virus	+		+
Cytomegalie Virus	+		+ (keine Wirkung als Opsonin)

Zahlreiche in vivo Versuche an SP-A-defizienten Mäusen, die mit verschiedenen Bakterien, Viren oder Pilzen infiziert wurden, bestätigen die bereits in vitro gesehenen Effekte von SP-A auf Erregerabwehr und Entzündungsmodulation in der Lunge. SP-A^{-/-} Mäuse wiesen Defizite in der Beseitigung von Streptokokken der Gruppe B (GBS) (35; 39; 42; 43), *Pseudomonas aeruginosa* (35; 41), *Haemophilus influenzae* (43), *Mycoplasma pulmonis* (24; 26), *Pneumocystis carinii* (2; 47), *Pneumocystis murina* (2; 45; 46), *Escherichia coli* K12 (2; 71), Influenza A Virus (44) und Respiratory Syncycial Virus (RSV) (40) auf. Die Ursache hierfür

lag in einer erniedrigten Phagozytoserate der Alveolarmakrophagen (39; 41-43), und einer verminderten Freisetzung von zytotoxischen Radikalen wie z.B. Stickoxid oder Superoxid durch Alveolarmakrophagen (2; 26; 42; 43). Bei SP-A^{-/-}-Mäusen ließen sich im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erhöhte Mengen von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF α , IL-6 und MIP-2 in der BALF bzw. im Lungenhomogenat nachweisen (40; 41; 45). Darüber hinaus waren bei Infektionen von SP-A^{-/-} Mäusen ein vermehrter Einstrom von Neutrophilen in die Lunge und ein größerer Gewebeschaden im Vergleich zu Wildtyp Mäusen zu beobachten. Dies ließ die Autoren vermuten, dass SP-A die Entzündungsantwort entscheidend beeinflusst und so die im Lungengewebe durch Infektion und Inflammation entstehenden Schäden zu begrenzen vermag (60; 69). Eine Behandlung der SP-A^{-/-} Mäuse mit exogenem SP-A korrigierte die auftretenden Defekte in der Immunabwehr (40; 42; 49).

Patienten mit einer Pneumokokkenpneumonie versterben häufig trotz adäquater und rechtzeitig einsetzender Antibiotikatherapie an einer fulminanten Sepsis und einem ARDS. Es ist bekannt, dass ARDS und Pneumonie mit erniedrigten SP-A Spiegeln in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit assoziiert sind. Bislang ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob es sich hierbei um die Ursache oder die Folge dieser Erkrankungen handelt (3; 16; 21; 37). Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass SP-A die Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* fördert. So konnte gezeigt werden, dass SP-A an *S. pneumoniae* Serotyp 25 bindet (52) und die Phagozytose von Pneumokokken des Serotyp 19 und 23 durch neutrophile Granulozyten steigert (20). Darüberhinaus verbessert SP-A die Pneumokokkenphagozytose durch Hochregulation des Scavengerrezeptors A auf Alveolarmakrophagen, unabhängig von der Bindung der Bakterien (38). Über die Funktion von Surfactantprotein A bei der Phagozytose von *S. pneumoniae* in vivo ist dagegen bis jetzt nichts bekannt. Ebenso ist auch die Bedeutung von SP-A für die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie in vivo noch vollständig ungeklärt.

3 Material

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe)
Beatmungsgas (100% O ₂)	Abteilung Technische Gase (Charité, Berlin)
Bioplex™ 7-Plex Zytokine Reagent Kit	BioRad Laboratories GmbH (München)
Braunol® (Povidon-Jod-Lösung)	BRAUN AG (Melsungen)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Cellwash	BD Biosciences (Heidelberg)
Facs™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Human Albumin ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories (USA)
Human Albumin Grifols® 20% (200g Alb./1000ml)	Grifols Deutschland GmbH (Langen)
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml)	Pfizer Pharmacia (Karlsruhe)
Liquemin® N25000 (Heparin-NaCl 5000I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Natrium-Chlorid-Lösung (0,9%)	BRAUN AG (Melsungen)
PBS (Phosphat Buffered Saline) (Dulbecco's PBS (1x))	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Protease-Inhibitor complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Prenzborg)

Material

Rompun 2%® (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
THY (Todd Hewitt-Bouillion)	BD Biosciences (Heidelberg)
TMB (Tetramethylbenzidine Liquid Substrate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tween®20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Yeast-Extrakt (Hefeextrakt 0,5%)	BD Biosciences (Heidelberg)

3.2 Geräte und Apparaturen

Agarose Gelkammer Sub-Cell® GT	BioRad Laboratories GmbH (München)
Autoklav (tuttnauer Systec 2540EL)	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg)
Beatmungsgerät MiniVent Type 845	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Bioplex™ Millipore	BioRad Laboratories GmbH (München)
Blutdruckmessgerät Hellige	Servomed (Neunkirchen)
Brutschrank (Heraeus, Typ BB6220 O ₂)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Druckmess-Set, 1fach REF ST-33B	Smiths Medical Deutschland (Kirchseeon)
Elektrophorese-Netzgerät PowerPac 200	BioRad Laboratories GmbH (München)
FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschrank –80°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
IKA® -Schüttler MTS 2	IKA Werke (Staufen)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kühlschrank 4°C (Liebherr Profi line)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)

Material

Magnetrührer (Variomag Electronicrührer Mono)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Mikroskop Laborlux 12	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Mikroskop Stemi DV 4	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Photometer (UVIKON _{XS})	Bio-Tek Instruments (USA)
Radiometer ABL 700 Serie	Radiometer (Willich)
Rektalsonde (physitemp Model BAT-12)	physitemp Instruments Inc (USA)
Schüttelwasserbad GFL Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Sicherheitsarbeitsbank (Heraeus Sorvall, Typ HS12)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Surgivet Isotec 4	Johnson Rd. (Wisconsin, USA)
Thermocycler Biometra® T ₁ Thermoblock	Biometra GmbH (Göttingen)
Vacusaft comfort	IBS, Integra Biosciences (Schweiz)
Vortexer (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries (USA)
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation (USA) über VWR
Zentrifuge Heraeus (Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products (Hanau)

3.3 Präparationsplatz zur Erfassung von Kenngrößen der Atmungsmechanik

Differenz-Druckaufnehmer (Differential pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
--	--

Material

Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Messmodule (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, IsmatecSA)	ISMATEC (Schweiz)
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Unterdruckkammer (Isolates Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

3.4 Antikörper

Rat Anti-Mouse GR-1 PE (neutrophil granulocytes; clone RB6-8C5)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Rat Anti-Mouse CD45 PerCP (pan-leucocytes; clone 30-F11)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Rat Anti-Mouse CD19 APC	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Rat Anti-Mouse F4-80 APC (alveolar macrophages; clone BM8)	Caltag Laboratories (USA)
Mouse BD Fc-Block™ (pan-leucocytes; clone 2.4G2)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)

3.5 DNA-Isolierung und PCR-Reagenzien

Puregene® Cell Lysis Solution	Gentra Systems (Minneapolis, USA)
Puregene® DNA Hydration Solution	Gentra Systems (Minneapolis, USA)
Ethanol reinst	Merck (Darmstadt)

Material

Primer SPA/Neo	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Primer SPA/ExIn1	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Primer GAPDH	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Gene Amp [®] dNTP's	Applied Biosystems (CA, USA)
Primer SPA/ExIn2	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
PCR-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Puregene [®] Precipitation Solution	Gentra Systems (Minneapolis, USA)
Propanol	Merck (Darmstadt)
Puregene [®] Proteinase K Solution	Gentra Systems (Minneapolis, USA)
Puregene [®] RNase A Solution	Gentra Systems (Minneapolis, USA)
Taq-Polymerase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)

3.6 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon [™] 5ml Polypropylen Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon [™] 5ml Polystyrene Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount [™] Tubes	BD Biosciences (Heidelberg)
Blutagarplatten (Columbia mit 5% Schafblut)	BD Biosciences (Heidelberg)
Cryo Tube [™] Vials	Nunc A/S (Dänemark)
Cuvettes No. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)

Material

Einmal Impfschlingen (farblos, 1µl)	Nunc (Wiesbaden)
Falcon Blue Max™ Jr. (15ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon Blue Max™ (50ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Gebrauchsfertige Filtereinheit FP 30/0,45 CA-S	Schleicher&Schuell GmbH (Dassel)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Belgien)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (rot, Häma)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reaktionsgefäß (1ml/1,5ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten Falcon (2ml/5ml/25ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit™ II (2ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipack™ (1ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

3.7 Bakterien

Die Mäuse wurden mit Bakterien der Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert.

3.8 Versuchstiere

Mäuse, die homozygot (SP-A^{-/-}) oder heterozygot (SP-A^{+/-}) SP-A-defizient sind, zeigen keinerlei Unterschiede im Wachstum oder der Reproduktion im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (WT), solange die Tiere unter pathogenfreien Bedingungen gehalten werden. Auch die Lungenstruktur, das Lungenvolumen und die Compliancewerte der Lunge, die Morphologie

der Typ II-Pneumozyten, sowie die Zusammensetzung und der Metabolismus des Surfactant weisen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen keine Veränderungen auf. Bei SP-A-defizienten Mäusen ist die Menge und Zusammensetzung der anderen Surfactantproteine (SP-B, SP-C und SP-D) unverändert, es kommt also zu keiner kompensatorischen Erhöhung der anderen Surfactantproteine. Die Anordnung des Surfactant in Form des tubulären Myelins ist bei SP-A-defizienten Tieren nur vereinzelt zu finden, da hauptsächlich SP-A für die Ausbildung des tubulären Myelins verantwortlich ist (28; 34). SP-A^{-/-} Mäuse zeigen allerdings eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl von pulmonalen Infektionserregern (69).

Für die Versuche wurden, jeweils männliche und weibliche, homozygot SP-A-defiziente Mäuse und heterozygot SP-A-defiziente Mäuse eingesetzt. SP-A^{-/-} Mäuse (C57Bl/6-Hintergrund) wurden als Zuchtpaare von amerikanischen Wissenschaftlern zur Verfügung gestellt (Jeffrey A. Whitsett, Section of Neonatology, Perinatal and Pulmonary Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, USA ; Sadis Matalon, Department of Anesthesiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA) und die weitere Zucht und Haltung von homo- und heterozygoten Tieren erfolgte in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité (FEM, Campus Benjamin Franklin). Als Kontrollen dienten männliche und weibliche Wildtyp Mäuse (C57Bl/6, Inzuchtstamm), die von der Firma Charles River bezogen wurden.

Die Tiere wurden in einem Alter von 8-10 Wochen verwendet und hatten eine Körpermasse von 18-22g (Weibchen) bzw. 20-25g (Männchen).

Die Versuche wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (G-0223/05).

4 Methoden

4.1 Studiendesign

		Gruppe 1 cfu BALF/Blut, Diff. BALF/Blut, p _a O ₂ , Laktat, Blutdruck	Gruppe 2 Zytokine (Tiere stammen aus Gruppe 1)
WT	Kontrolle	n = 5	n = 3
SP-A ^{+/-}	Kontrolle	n = 5	n = 1
SP-A ^{-/-}	Kontrolle	n = 5	n = 3
WT	24h	n = 13	n = 6
SP-A ^{+/-}	24h	n = 5	n = 5
SP-A ^{-/-}	24h	n = 8	n = 5
WT	48h	n = 12	n = 6
SP-A ^{+/-}	48h	n = 5	n = 5
SP-A ^{-/-}	48h	n = 7	n = 5

		Gruppe 3 HSA	Gruppe 4 Histo	Gruppe 5 Atmungsmechanik (Tiere stammen aus Gruppe 3+4)
WT	Kontrolle	n = 1	/	n = 1
SP-A ^{+/-}	Kontrolle	/	/	/
SP-A ^{-/-}	Kontrolle	n = 1	/	n = 1
WT	24h	/	/	/
SP-A ^{+/-}	24h	/	/	/
SP-A ^{-/-}	24h	/	/	/
WT	48h	n = 4	n = 3 (1)	n = 8
SP-A ^{+/-}	48h	/	/	/
SP-A ^{-/-}	48h	n = 4	n = 3 (1)	n = 8

Methoden

		Gruppe 6 g / °C (Tiere stammen aus Gruppe 1+3)	Gruppe 7 5x10 ⁴	Gruppe 8 2,5x10 ⁵	Gruppe 9 1x10 ⁶
		Dosisreihe (Kontrollen stammen aus Gruppe 1)			
WT	Kontrolle	/	n = 5	n = 5	n = 5
SP-A ^{+/-}	Kontrolle	/	n = 5	n = 5	n = 5
SP-A ^{-/-}	Kontrolle	/	n = 5	n = 5	n = 5
WT	24h	n = 13	n = 3	n = 4	n = 5
SP-A ^{+/-}	24h	(n = 5)	/	/	/
SP-A ^{-/-}	24h	n = 8	n = 3	n = 4	n = 5
WT	48h	n = 20	n = 3	n = 4	n = 5
SP-A ^{+/-}	48h	(n = 5)	/	/	/
SP-A ^{-/-}	48h	n = 15	n = 3	n = 4	n = 5

	Gruppe 10 Mortalität
WT	n = 69
SP-A ^{+/-}	n = 38
SP-A ^{-/-}	n = 31

Tabelle 4: **Studiendesign.** Daten für Tiere in Klammern sind nicht im Ergebnisteil dargestellt.

4.2 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte während der Versuche in geschlossenen Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) mit einem Lichtzyklus von 12 Stunden, wobei ständiger Zugang zu Wasser und pelletiertem Futter vorhanden war.

4.3 Genotypisierung mittels DNA-Isolierung und PCR

Zur Überprüfung der Versuchs- und Zuchttiere auf Homo- und Heterozygotie wurde den Tieren im Alter von 4 Wochen eine Schwanzbiopsie von etwa 0,5cm Länge entnommen und bei -80°C eingefroren.

Die DNA-Isolierung wurde wie folgt durchgeführt:

In ein 1,5ml-Reaktionsgefäß wurden 600 μl Puregene[®] Cell Lysis Solution und 3 μl Puregene[®] Proteinase K Solution vorgelegt und die Schwanzspitze darin über Nacht bei 56°C in einem Schwenkbad inkubiert. Am nächsten Tag schloss sich die Zugabe von 2 μl Puregene[®] RNase A Solution und ein 25maliges Schwenken des Reaktionsgefäßes an. Es folgte eine Inkubation im Trockenschrank bei 37°C für 30min. Nach einer 20minütigen Abkühlungsphase wurde in das Reaktionsgefäß 200 μl Puregene[®] Precipitation Solution gegeben, danach dieses für 20sek geschüttelt und für 3min bei 13.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 μl Propanol 100% wurde das Reaktionsgefäß etwa 30mal geschwenkt und anschließend für 2min bei 13.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. In das Reaktionsgefäß wurden 200 μl Ethanol 70% gegeben und dieses für etwa 3min zum Waschen der DNA geschwenkt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000g wurde der Überstand abpipettiert und das Reaktionsgefäß anschließend im Trockenschrank für 10min bei 37°C getrocknet. Abschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl Puregene[®] DNA Hydration Solution und die Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht.

Zur Durchführung der PCR wurden 10 μl isolierte DNA mit 90 μl Aqua dest. verdünnt, wobei 2 μl dieser Verdünnung für die PCR eingesetzt wurden.

PCR-Ansatz (für 1 Probe):

10xPCR Puffer I	5,4 μl
10 mM dNTP's	3,6 μl
(-) Primer 1, 2 bzw. 3 (10pmol)	5,2 μl
(+) Primer 1, 2 bzw. 3 (10pmol)	5,2 μl

Methoden

Aqua dest.	26µl
Taq-Polymerase	1,6µl
	46µl gesamt + 2µl DNA-Verdünnung

Primer 1: SPA/Neo	FWD 5' > TGG AGA GGC TAT TCG GGT ATG ACT GGG < 3' REV 5' > ATG CAG CCG CCG CAT TGC AT < 3' (Annealing-Temperatur: 65°C Zyklenanzahl: 40)
Primer 2: SPA/ExIn1	FWD 5' > TGC AAT GGG ACA GAA GTT TG < 3' REV 5' > AGG CTC TCC CTT GTC TCC AT < 3' (Annealing-Temperatur: 58°C Zyklenanzahl: 32)
Primer 3: SPA/ExIn2	FWD 5' > CAC TAG GCT CTT TGG CCT TC < 3' REV 5' > GGA CCT CCA TTA GCA TGT GG < 3' (Annealing-Temperatur: 57°C Zyklenanzahl: 35)

Tabelle 5: **Primer - Sequenzen zur Überprüfung der Versuchsmäuse auf Homo- bzw. Heterozygotie**

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis ausgewertet.

4.4 Herstellung eines Arbeitsstocks

Zur Herstellung eines Arbeitsstocks von *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) wurde der Keim auf Columbia Blutagar mit 5% Schafblut ausgestrichen (Verdünnungsausstrich) und über Nacht im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am nächsten Tag wurden 2-3 Einzelkolonien mit einer sterilen Öse von der Platte abgenommen und erneut ausgestrichen und unter denselben Bedingungen wie zuvor bebrütet. Dann konnten

sämtliche Kolonien mit einem sterilen Wattestäbchen von der Platte abgenommen und in ein Kryoröhrchen, welches mit 1,5ml eines Einfriermediums (80% THY + 20% Glycerol) befüllt war, suspendiert werden. Der Arbeitsstock wurde bei -80°C gelagert.

4.5 Ansatz des Mediums zur Anzucht von *S. pneumoniae*

Die Nährlösung zur Anzucht von *S. pneumoniae* wurde aus 30g Todd Hewitt-Bouillon, die in 1l Aqua dest. mittels Magnetrührer gelöst wurde, und einem Zusatz von 0,5% Yeast Extrakt (5g) hergestellt. Das Medium wurde in sterile Glasflaschen verteilt und bei 115°C für 10min autoklaviert.

Das ebenfalls für die Kokkenanzucht benötigte Fetale Kälberserum (FCS) wurde zunächst bei 56°C für 30min hitzeinaktiviert, portionsweise in 50ml Falcons bei -20°C gelagert und vor Gebrauch der Portion durch eine gebrauchsfertige Filtereinheit 30/0,45 steril filtriert.

4.6 Anzucht von *S. pneumoniae*

S. pneumoniae wurde in Form eines Arbeitsstockes bei -80°C gelagert. Der Arbeitsstock wurde in einem Kühlblock zur Sterilbank transportiert. Dort wurden die Bakterien auf 6 Columbia Blutagarplatten mit 5% Schafblut ausgestrichen und für 8-10 Stunden im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) bebrütet. Danach wurden die Kokken von den Platten mittels steriler Wattestäbchen abgenommen und in ein Nährmedium aus 18ml THY und 2ml FCS pro Ansatz überführt. Die Bakterien-Lösung wurde auf eine optische Dichte (OD) von 0,03-0,05 (gemessen bei 600nm) eingestellt. Die Kokken wurden danach im Brutschrank inkubiert (37°C , 5% CO_2); nach 2 Stunden erfolgte die erste Messung der OD. Die Bebrütung erfolgte bis zum Erreichen einer OD von etwa 0,3. Nach Ermittlung des verbliebenen Volumens der Kokkenlösung wurde diese bei 3100rpm für 10min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde verworfen, die am Gefäßboden abgesetzten Kokken aufgerüttelt und das Volumen der Lösung erneut bestimmt. Es erfolgte abhängig von der zuvor eingestellten OD (eine OD von 0,1 entspricht einer Konzentration von 1×10^8 cfu/ml) und dem verbliebenen Volumen eine Verdünnung der Lösung mit PBS, um eine Konzentration von 1×10^9 Kokken pro ml (Stammlösung) zu erhalten. Je nach verwendeter Infektionsdosis wurde in weiteren

Verdünnungsschritten die gewünschte Konzentration der Infektionslösung eingestellt. Jede Maus erhielt pro Nasenloch 10µl dieser Infektionslösung. Zur Kontrolle der richtigen Einstellung der Infektionsdosis wurden Proben der Infektionslösung auf Blutagarplatten ausgestrichen. Diese wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und die cfu ausgezählt.

4.7 Infektion der Mäuse mit *S. pneumoniae*

Zur Infektion wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus 90mg/kgKM Ketamin und 15mg/kgKM Xylazin i.p. narkotisiert. Nach Markierung, Ermittlung der Körpertemperatur und Wiegen der Tiere wurden diese unter der Sterilbank in einem speziell angefertigten Kasten an den oberen Schneidezähnen aufgehängt. Die Infektion erfolgte intranasal mittels einer 10µl Pipette, wobei pro Nasenloch jeweils 10µl der zuvor hergestellten Infektionslösung appliziert wurden. Uninfizierte Kontrolltiere erhielten 10µl PBS je Nasenloch. Im Anschluss an die Infektion wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt und nach dem vollständigen Erwachen aus der Narkose in den Tierraum zurückgebracht.

4.8 Blutdruckmessung, arterielle Blutentnahme und Gewinnung der BALF

Die Blutdruckmessung, arterielle Blutentnahme und Gewinnung der BALF erfolgte 24h bzw. 48h nach der Infektion. Nach Kontrolle des Allgemeinbefindens, der Körpertemperatur und der Körpermasse der Mäuse wurden diese mit einem Gemisch aus 90mg/kgKM Ketamin und 15mg/kgKM Xylazin narkotisiert. Das Operationsfeld wurde mit Braunol gereinigt und bei vollständigem Eintritt der Narkose erfolgte nach Eröffnung der Haut im Halsbereich und Freipräparation der Trachea die Intubation mittels einer Metallkanüle. Die Beatmung erfolgte mit 100% O₂ (F_iO₂=1), einer Frequenz von 150 Zügen/min und einem Atemzugvolumen von 150µl. Im weiteren Verlauf wurde unter dem Mikroskop die linke A. carotis freipräpariert und zwei Ligaturen gesetzt, eine etwa in der Mitte des Gefäßes, die noch nicht zugezogen wurde, die zweite wurde möglichst weit cranial angelegt und zugezogen. Das caudale Ende der A. carotis wurde mit einer Klemme verschlossen. Das Gefäß wurde nun im oberen Drittel etwa zur Hälfte eingeschnitten und ein heparinetränkter Metallkatheter mit daran angeschlossener Druckaufnehmer eingeführt und die noch lockere Ligatur darüber

festgezogen. Die caudale Klemme wurde entfernt und es erfolgte über das an den Druckaufnehmer angeschlossene Messgerät die Registrierung des Arteriellen Mitteldrucks. Im Anschluss daran wurde der Katheteranschluss vom Druckaufnehmer entfernt und über eine aufgesteckte Spritze, die ein mit Heparin getränktes Schwämmchen enthielt, Blut aus der A. carotis entnommen. Die Blutgasanalyse und die Bestimmung der Laktatkonzentration wurden im Gerät ABL von Radiometer durchgeführt. Das verbliebene arterielle Blut wurde bei 4000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -80°C eingefroren. Vor Entnahme der BALF wurde das Abdomen eröffnet, das Zwerchfell vorsichtig entfernt und der Thorax aufgeklappt. Die BALF wurde mit 2 x 800µl einer eiskalten PBS-Lösung mit enthaltenem Proteinase-Inhibitor (completeTM Mini, 1 Tbl./10ml) durchgeführt. Die gewonnene BALF wurde sofort in 5ml Polypropylen Round-Bottom Tubes auf einen Kühlblock verbracht.

4.9 Ermittlung der Bakterienlast in Blut und BALF

Zur Ermittlung der Bakterienlast im Blut bzw. in der BALF wurden verschiedene Verdünnungen der zuvor gewonnenen Proben auf Columbia Blutagar mit 5% Schafblut ausgestrichen. Je 5µl des Blutes wurden pur, sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 zusammen mit 100µl PBS aufgetragen, je 5µl der BALF in Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10.000. Die Platten wurden für 16h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert und die cfu unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung und der aufgetragenen Menge von 5µl ausgezählt.

4.10 Differenzierung der Leukozyten in Blut und BALF

Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur von BD Biosciences (FACS steht für Fluorescence Activated Cell Sorter). Dieses Analysegerät ist mit einem Argonlaser (488 nm) und einer roten Laserdiode (633 nm) ausgestattet und ermöglicht die gleichzeitige Messung von bis zu 4 Farben. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen durch eine Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Suspendierte Einzelzellen werden durch hydrodynamische

Fokussierung einzeln hintereinander an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe, Gestalt und spezifischer Anfärbung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren gemessen werden. Eine gleichzeitige Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, und für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügen.

Zur Differenzierung der Blutleukozyten wurden 60µl des gewonnenen arteriellen Blutes in ein EDTA-Blutröhrchen überführt. In ein Trucount-Röhrchen (BD Biosciences) wurden auf die Ecken des enthaltenen Siebs jeweils 5µl folgender Fluoreszenzantikörper vorgelegt: GR-1 PE, CD45 PerCP und CD19 APC. Dazu wurden 50µl Blut aus dem EDTA-Blutröhrchen pipettiert. Nach kurzem Aufschütteln erfolgte eine Inkubation für 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 450µl BD-Lyse zugegeben und die Proben für weitere 10min unter gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Analyse der Proben mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur durchgeführt. Es wurde die Gesamtleukozytenzahl/µl sowie die Fraktionen von Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten bestimmt.

Zur Differenzierung der Leukozyten in der BALF wurde die BAL Flüssigkeit zentrifugiert (2200rpm, 32g, 10min, 4°C), der Überstand wurde abgenommen und für die Zytokinbestimmung bei -80°C gelagert. Der im Röhrchen verbliebene Rest wurde mit PBS auf 1ml aufgefüllt. 5µl Methylenblau und 5µl BALF-Probe wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gemischt und damit eine Neubauer-Zählkammer zur Ermittlung der Zellzahl befüllt. Es wurden die Zellen in allen 4x16 Quadranten ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die ermittelte Zellzahl auf die Gesamtmenge von 1ml umgerechnet ($\text{Zahl} \times 2 \times 10.000 = \text{Zahl/ml}$). Danach wurde das Probenröhrchen mit PBS aufgefüllt und für 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Probe kurz aufgerüttelt und mit 2µl Fc-Block für einige Minuten inkubiert. In ein 5ml Polystyrene Round-BottomTube wurden pro 300.000 Zellen je 3µl folgender Fluoreszenzantikörper vorgelegt: GR-1 PE, CD45 PerCP und F4-80 APC. Die gesamte Probenmenge wurde dann auf die vorgelegten Antikörper pipettiert und für 30min im Kühlschrank bei 8°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500µl BD-Lyse zugegeben und die Probe für weitere 10min unter gleichen Bedingungen

inkubiert. Nach Auffüllung der Probe mit Cellwash wurden diese erneut für 5min bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Probe kurz aufgerüttelt und mit 1-2ml Cellwash aufgefüllt. Im Anschluss daran wurde die Analyse der Probe mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur durchgeführt. Es wurden insgesamt 20.000 Zielzellen ausgezählt und die Fraktionen von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten bestimmt. Aus den gemessenen prozentualen Anteilen der Zellen und der zuvor ermittelten Gesamtzellzahl wurden die absoluten Zahlen von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten berechnet.

4.11 Zytokinquantifizierung mit dem *Bio-Plex Cytokine Assay*

Das gewonnene Plasma bzw. der BALF-Überstand wurden zur Quantifizierung von 7 Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1 α) eingesetzt. Dazu wurde das *Bio-Plex Protein Array System* der Firma Biorad in Form eines *Bio-Plex Mouse 7-Plex Assays* eingesetzt, mit welchem mehrere Zytokine gleichzeitig aus einer Probe analysiert werden können.

Bei dieser Methode handelt es sich um die modifizierte Form eines Sandwich-Immunoassays. An Polystyrenkügelchen (so genannte Beads), die im Innern eine Mischung aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen mit jeweils spezifischer Absorptions- und Emissionswellenlänge besitzen, werden spezifische Antikörper für die zu messenden Zytokine gebunden. Auf diese Weise erhält jedes gebundene Zytokin über die eingefärbten Beads, an die es spezifisch gebunden ist, eine eigene „spektrale Adresse“, an Hand derer das Zytokin im *Bio-Plex Array Reader* identifiziert werden kann. Um eine Quantifizierung der Zytokine vornehmen zu können, werden die Proben zunächst mit einem Dektektionsantikörper, der ebenfalls spezifisch an ein bestimmtes Zytokin bindet, jedoch an einem anderen Epitop, inkubiert. Anschließend erfolgt über Streptavidin eine Kopplung an Phycoerythrin (PE). Während der Messung im *Bio-Plex Array Reader* werden die spezifisch angefärbten Beads aufgrund der ihnen eigenen Fluoreszenz durch einem roten Laser (635 nm) identifiziert und durch einen simultan strahlenden grünen Laser (532 nm) erfolgt die Messung der durch PE hervorgerufenen Emission pro Bead. Dabei ist die Menge an „PE-Fluoreszenz“ (ausgehend

vom an die Zytokine gebundenen PE) proportional zur Menge der enthaltenen Zytokine. Durch Extrapolation auf eine Standardkurve wird die Ermittlung der Zytokinkonzentration in der Probe möglich.

Zur Durchführung des Assays wurde zunächst aus einer Stocklösung (500 ng/ml) und Probenmedium in 7 Verdünnungsstufen (jeweils 1:4) eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. Die Beads wurden gemäß der dem Kit beiliegenden Information gelöst. Die 96-Loch Mikrotiterplatte wurde mit 150µl Messpuffer pro Vertiefung befeuchtet und die Flüssigkeit sodann mittels Vakuumfiltration wieder abgesogen. Je Vertiefung wurden 50µl Bead-Lösung aufgetragen und anschließend wurde die Platte zweimal mit 100µl/Vertiefung Waschpuffer gewaschen. Nun wurden 50µl/Vertiefung Standard bzw. Probe zugefügt und die Platte auf einem Schüttler für 30sek bei 1100rpm kurz aufgerüttelt und anschließend für 30min bei 300rpm im Dunkeln inkubiert. Danach wurde dreimal mit 100µl/Vertiefung Waschpuffer gewaschen und in jede Vertiefung 25µl Detektionsantikörper gegeben. Erneut wurde die Platte für 30sek bei 1100rpm kurz aufgerüttelt und anschließend für 30min bei 300rpm im Dunkeln inkubiert. Die Herstellung der Streptavidin-PE-Lösung erfolgte gemäß der dem Kit beiliegenden Information. Bevor 50µl/Vertiefung Streptavidin-PE-Lösung auf die Platte aufgebracht wurde, erfolgten noch drei Waschschrte mit jeweils 100µl/Vertiefung Waschpuffer. Erneut wurde die Platte für 30sek bei 1100rpm kurz aufgerüttelt, dann für 30min bei 300rpm im Dunkeln inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Die in den Vertiefungen enthaltenen Beads wurden mit 150µl/Vertiefung Messpuffer resuspendiert. Nach Aufrütteln der Platte für 30sek bei 1100rpm erfolgte die Messung der Proben im *Bio-Plex Array Reader*.

4.12 Erfassung von Kenngrößen der Atmungsmechanik

Die Präparation der Mäuse wurde 48h nach der Infektion mit Pneumokokken in der Konzentration von 5×10^6 cfu bzw. der Gabe von PBS bei den Kontrolltieren durchgeführt.

Zur Präparation wurden die Mäuse nach Kontrolle des Allgemeinbefindens, der Körpertemperatur und der Körpermasse mit einem Gemisch aus 100mg/kgKM Ketamin und 20mg/kgKM Xylazin i.p. narkotisiert. Das Operationsfeld wurde mit Braunol gereinigt und die Tiere auf dem Rücken liegend in einer speziellen Perfusionskammer (Firma Hugo Sachs

Elelektronik) aus Plexiglas, die aus einer doppelwandigen flachen Wanne und einem dicht abschließenden Deckel besteht, fixiert. In diese Kammer waren alle für die Ventilation und Perfusion der Lunge notwendigen Anschlüsse eingebaut. Die Haut wurde nach vollständigem Narkoseeintritt mit einem medianen Schnitt vom Beckeneingang bis zum Kinn eröffnet. Danach erfolgte die Freilegung der Trachea mit anschließender Intubation mittels Trachealkanüle. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft und einer Frequenz von 90 Atemzügen/min, wobei die Inspirationszeit 50% des gesamten Atemzyklus einnahm. Das Abdomen wurde nun bis zum Xyphoid in der Medianen eröffnet und seitliche Entlastungsschnitte angelegt. Vorsichtig wurde ein Loch ins Zwerchfell geschnitten, um Zugang zum Herz zu erlangen und 50 μ l Heparin (1:2 Gemisch mit NaCl) intracardial applizieren zu können. Nach vollständiger Entfernung des Zwerchfells wurde der Thorax median aufgeschnitten und nach Entfernung von Verklebungen oder Verwachsungen vollständig aufgeklappt und fixiert. Es wurde eine lockere Ligatur um die A. pulmonalis gelegt, die linke Kammer durch Entfernung der Herzspitze eröffnet und eine Inzision der rechten Kammer vorgenommen. Danach wurde in die rechte Kammer ein Metallkatheter eingeführt und in der A. pulmonalis mittels der zuvor gelegten Ligatur fixiert. Über diesen Katheter wurde die Lunge mit NaCl (0,9%) perfundiert. Die Kammer wurde geschlossen und es erfolgte der Wechsel von Überdruck- zur Unterdruckbeatmung (min: -9,0cmH₂O / max: -4,5cmH₂O). Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Aufzeichnung der dynamischen Compliance (C_{dyn}) und der pulmonalen Resistance (R_L) für die Dauer von 5min.

4.13 Ermittlung der pulmonalen Schrankenstörung

Eine Stunde vor der eigentlichen Präparation wurde den Mäusen, die in einer speziell angefertigten Schachtel fixiert wurden, 1mg Humanes Serum Albumin (HSA – gelöst in einem Volumen von 75 μ l NaCl) in die Schwanzvene appliziert. HSA lässt sich mittels eines ELISA-Kits im Plasma und in der BALF nachweisen. Je größer der Quotient aus gemessener Konzentration in der BALF und im Plasma war, desto größer war das Ausmaß der infolge der Lungenentzündung eingetretenen Schrankenstörung der alveolokapillären Barriere.

Die Präparation der Mäuse wurde 48h nach der Infektion mit Pneumokokken in der Konzentration von 5×10^6 cfu bzw. der Gabe von PBS bei den Kontrolltieren wie unter 4.12

beschrieben durchgeführt. Die Entnahme von venösem Blut erfolgte über die V. cava caudalis. Abschließend wurde die Lunge zweimal mit jeweils 650µl einer eiskalten PBS-Lösung mit enthaltenem Proteinase-Inhibitor (completeTM Mini, 1 Tbl./10ml) lavagiert. Die BALF wurde gepoolt und bei -80°C tiefgefroren. Das venöse Blut wurde bei 4000rpm für 10min bei 4°C zentrifugiert und das gewonnene Plasma ebenfalls bei -80°C eingefroren.

Das Human Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, USA) wurde zur Messung der HSA-Konzentration in der BALF und im Plasma eingesetzt.

Die für den ELISA verwendeten Puffer wurden wie folgt hergestellt:

- Coating Puffer: (0.05 M , pH 9,6)
2,63 g Natrium Carbonat/ 500ml Aqua dest.
- 10x Grundpuffer: (500mM Tris Base, 1,4M NaCl , pH 8,0)
60,5 g Tris Base /l Aqua dest. + 81,8 g NaCl /l Aqua dest.
Für den Gebrauch wurde der Puffer 1:10 (50ml+450ml Aqua dest.) verdünnt.
- Waschpuffer: (50mM Tris Base, 0,14 M NaCl , 0,05% Tween20)
500 ml 1x Grundpuffer + 250µl Tween20
- Postcoat Puffer: (50mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA)
500ml 1x Grundpuffer + 5g BSA
- Probenpuffer: (50mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween20)
500ml 1x Grundpuffer + 5g BSA + 250µl Tween20
- 2Mol H₂SO₄: 98,1g/l → 1 Mol
100ml/l → 1 Mol
200ml/l → 2 Mol (200ml auf 800ml A.dest)

Zur Durchführung des ELISA wurden zunächst 110µl des ersten Antikörpers (goat anti-Human Albumin-affinity purified) in 11ml Coating Puffer gelöst. Jeweils 100µl dieser Mischung wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60min bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit in den Vertiefungen

abgeschlagen und die Platte zweimal mit 200µl Waschpuffer/Vertiefung gewaschen. Anschließend wurde in jede Vertiefung 200µl Postcoat Puffer pipettiert, 30min bei Raumtemperatur inkubiert und danach wurde die Platte zweimal wie zuvor beschrieben gewaschen. Die Herstellung der Standard-Verdünnungsreihe erfolgte gemäß der dem Kit beiliegenden Information. Nun wurden 100µl/Vertiefung Standard bzw. Probe zugefügt. Anschließend wurde die Platte 60min bei Raumtemperatur inkubiert und fünfmal gewaschen. 1µl des zweiten Antikörpers (goat anti-Human Albumin-HRP conjugate) wurden zunächst in 700µl Probenpuffer gelöst und im Anschluss pro Vertiefung 100µl dieser Mischung aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 60min erfolgten erneut fünf Waschschrte. Als Substrat für die Farbreaktion wurden 100µl TMB/Vertiefung pipettiert und 10-15min inkubiert. Mit 100µl 2Mol H₂SO₄/Vertiefung wurde die Farbreaktion gestoppt und die Platte bei 450nm im ELISA-Reader gemessen. Als Messgerät diente ein Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit der dazugehörigen Software (WinRead Anthos).

Anschließend wurde der Quotient aus gemessener Konzentration in der BALF und im Plasma ermittelt.

4.14 Histologie

Die Mäuse wurden 48h nach der Infektion mit Pneumokokken in der Konzentration von 5×10^6 cfu wie unter 4.11 beschrieben präpariert. Nach Aufzeichnung der dynamischen Compliance (C_{dyn}) und der pulmonalen Resistance (R_L) wurde die Lunge mitsamt Trachea und Herz aus dem Thorax entfernt. Über die Trachea wurde die Lunge mit 4 %iger gepufferter Paraformaldehydlösung (PFA) befüllt (Druck: 15 cmH₂O), nach 15min wurde die Trachea ligiert und die Lunge in ein Gefäß mit PFA verbracht. Vor der Herstellung der histologischen Schnitte wurde die Lunge in ein Gefäß mit PBS eingebettet.

Der linke Lungenflügel und die drei rechten Lungenflügel wurden getrennt voneinander in Parafin eingebettet, geschnitten und mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gefärbt. An zwei oder mehr Schnitte eines Lungenflügels erfolgte die verblindete Auswertung durch zwei verschiedene Untersuchern. Dabei wurden jeweils die Anzahl und Ausdehnung

der PMN-Infiltrate im gesamten Schnitt von den Untersuchern unabhängig voneinander beurteilt, ohne dass den Untersuchern die Gruppenzugehörigkeit der Schnitte bekannt war.

4.15 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM ausgedrückt. Als statistische Tests wurde der t-Test bzw. eine One-way ANOVA mit Tukey Post Test angewendet. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant angenommen. Unterschiede in den Kaplan-Meier Survival Kurven wurden mit dem log-rank Test analysiert.

5 Ergebnisse

5.1 Genotypisierung von SP-A^{-/-}, SP-A^{+/-} und WT Mäusen

Zur Überprüfung der Versuchs- und Zuchtmäuse auf Homo- und Heterozygotie wurde den Tieren eine Schwanzbiopsie entnommen, daraus die DNA isoliert und mittels PCR vervielfältigt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt.

Der eingesetzte Primer 1 (SPA/Neo) führte zur Vervielfältigung der sogenannten Neomycin-Kassette, einem Genabschnitt, der im Austausch zum originären SP-A Gen bei SP-A-defizienten Mäusen eingefügt wurde. Die Proben der Mäuse SPA 1, SPA 2, SPA 4 und SPA 5 zeigten jeweils deutliche Banden, während die Proben der Mäuse WT 1 und WT 2 keine Banden aufwiesen. Bl (Blank) bezeichnete die Negativkontrolle. Bei den Mäusen mit der Bezeichnung SPA handelte es sich demnach um gentechnisch veränderte Mäuse, während die Mäuse mit der Bezeichnung WT Wildtyp Mäuse waren, die nicht über die Neomycin-Kassette verfügen. (Abbildung 3, Primer 1)

Die Primer 2 (SPA/ExIn1) bzw. Primer 3 (SPA/ExIn2) führten zur Vervielfältigung von zwei unterschiedlichen Ausschnitten aus dem SP-A Gen. Die Proben der Mäuse SPA 1 und SPA 2, sowie die der Tiere WT 1 und WT 2 zeigten jeweils bei Primer 2 und 3 Banden. Dagegen waren für die Proben der Mäuse SPA 4 und SPA 5 keine Banden nachweisbar. Die Mäuse mit der Bezeichnung WT 1 und WT 2 wurden durch Anwendung des Primers 1 bereits als Wildtyp Mäuse identifiziert. Mittels der Primer 2 bzw. 3 konnte hier zwischen heterozygot (SP-A^{+/-}) und homozygot (SP-A^{-/-}) SP-A-defizienten Mäusen unterschieden werden. Da bei SP-A^{+/-} Mäusen noch ein originäres SP-A Gen vorhanden ist, wiesen die Proben dieser Mäuse bei Einsatz von Primer 2 bzw. 3 Banden auf, bei den Mäusen mit der Bezeichnung SPA 1 und SPA 2 handelte es sich demnach um heterozygot SP-A-defiziente Mäuse. Dagegen ist bei SP-A^{-/-} Mäusen kein originäres SP-A Gen mehr vorhanden und somit wiesen Proben dieser Mäuse keine Banden auf. Dies war bei den Proben der Mäuse SPA 4 und SPA 5 der Fall. (Abbildung 3, Primer 2 und 3)

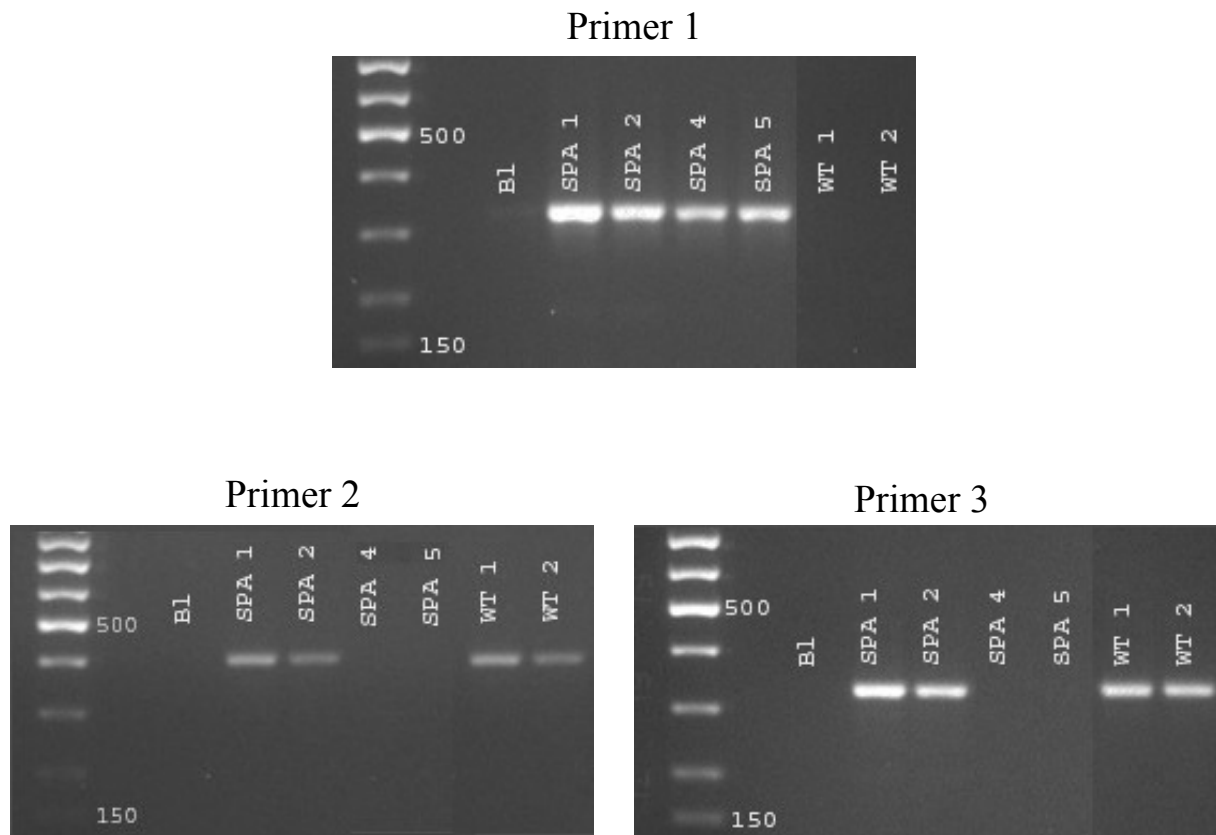


Abbildung 3: **Genotypisierung.** Nach Isolierung der DNA aus Schwanzbiopsien von WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen wurde diese mittels PCR vervielfältigt und in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Primer 1 (SPA/Neo) ist bei SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen vorhanden. Primer 2 (SPA/ExIn1) bzw. Primer 3 (SPA/ExIn2) ist nur bei WT und SP-A^{+/-} Mäusen zu finden.

5.2 SP-A^{-/-}, SP-A^{+/-} und WT Mäuse zeigen nach der Infektion mit *S. pneumoniae* keine Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild

Der klinische Allgemeinzustand der Versuchstiere wurde unter Berücksichtigung der Dämmerungs- und Nachtaktivität der Mäuse anhand von Habitus und Verhalten der Tiere beurteilt. Diese subjektiven Beurteilungskriterien wurden durch objektive Messwerte wie Ermittlung der Körpermasse und der Körpertemperatur ergänzt.

Dabei zeigten sowohl SP-A^{-/-} Mäuse als auch SP-A^{+/-} und WT Mäuse 24h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* ein gestörtes Allgemeinbefinden, erkennbar an leicht gesträubtem Fell und an einem leicht verminderten Fluchtverhalten. Ein Großteil der

infizierten Mäuse nahm in Ruhe eine zusammengekrümmte Sitzposition ein und zeigte eine Dyspnoe. Darüber hinaus wiesen die Mäuse einen mäßigen Gewichtsverlust und eine z.T. deutliche Hypothermie auf. Der klinische Allgemeinzustand war bei allen infizierten Mäusen 48h nach der Infektion deutlich schlechter als nach 24h. Alle Mäuse zeigten 48h nach der Infektion ein deutlich gestörtes Allgemeinbefinden mit stark gestäubtem Fell, Blässe von Ohren und Schwanz, sowie ein stark eingeschränktes Fluchtverhalten. Zudem saßen und liefen alle Mäuse mit aufgekrümmtem Rücken und zeigte eine z.T. starke Dyspnoe. Alle Mäuse verloren stark an Gewicht und wiesen eine deutliche Hypothermie auf. Unterschiede im klinischen Erscheinungsbild gab es zwischen SP-A^{-/-}, SP-A^{+/-} und WT Mäusen sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion nicht.

Kontrollmäuse, die transnasal PBS erhalten haben, zeigten weder 24h noch 48h nach der Kontrollinfektion Störungen im klinischen Erscheinungsbild oder im Verhalten.

5.3 SP-A^{-/-} Mäuse zeigen eine höhere Bakterienlast in der bronchoalveolären Lavage Flüssigkeit

WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert. Die Erregermenge in der BALF wurde nach 24h bzw. 48h bestimmt. Die ermittelte Bakterienlast in der BALF war nach 24h bei WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen ähnlich hoch (Abbildung 4A). Dagegen war die Zahl der Pneumokokken in der BALF von SP-A^{-/-} Mäusen 48h nach der Infektion signifikant höher als bei WT ($p < 0,001$) bzw. SP-A^{+/-} Mäusen ($p < 0,01$) (Abbildung 4B).

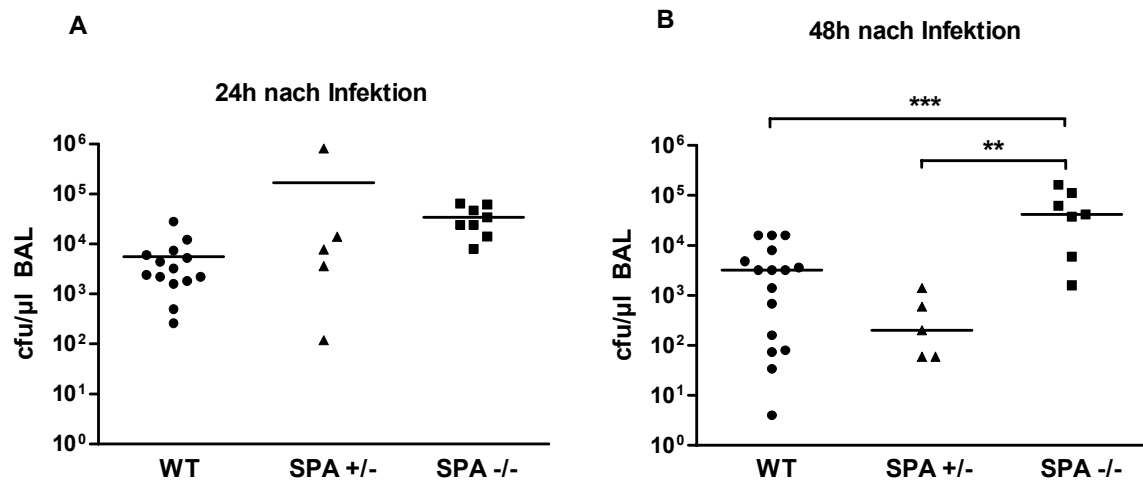


Abbildung 4: **Bakterienlast in der BALF.** WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die cfu in der BALF wurden 24h (A) und 48h (B) nach der Infektion ermittelt. ** p < 0.01; *** p < 0.001.

5.4 SP-A hat keinen Einfluss auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge

WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert, entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Die prozentualen Anteile an Alveolarmakrophagen (AM), polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Lymphozyten wurden 24h bzw. 48h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die Absolutzellzahlen errechnet (Abbildung 5). In Bezug auf die Gesamtzellzahl in der BALF war zwischen WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen zu keinem untersuchten Zeitpunkt ein Unterschied feststellbar (Abbildung 5A). Die Zahl an PMNs war bei WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* gleich (Abbildung 5C). In der Menge an AM in der BALF gab es zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen weder 24h noch 48h nach der Infektion einen Unterschied. Allerdings wiesen SP-A^{+/-} Mäuse 48h nach der Infektion eine größere Zahl an AM auf als WT und SP-A^{-/-} Mäuse (Abbildung 5B). Die in der BALF nachgewiesene Lymphozytenmenge war bei WT und SP-A^{-/-} Mäusen sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion gleich. Dagegen war die Zahl an Lymphozyten in der BALF

von SP-A^{+/-} Mäusen 48h nach der Infektion höher im Vergleich zu WT und SP-A^{-/-} Mäusen (Abbildung 5D).

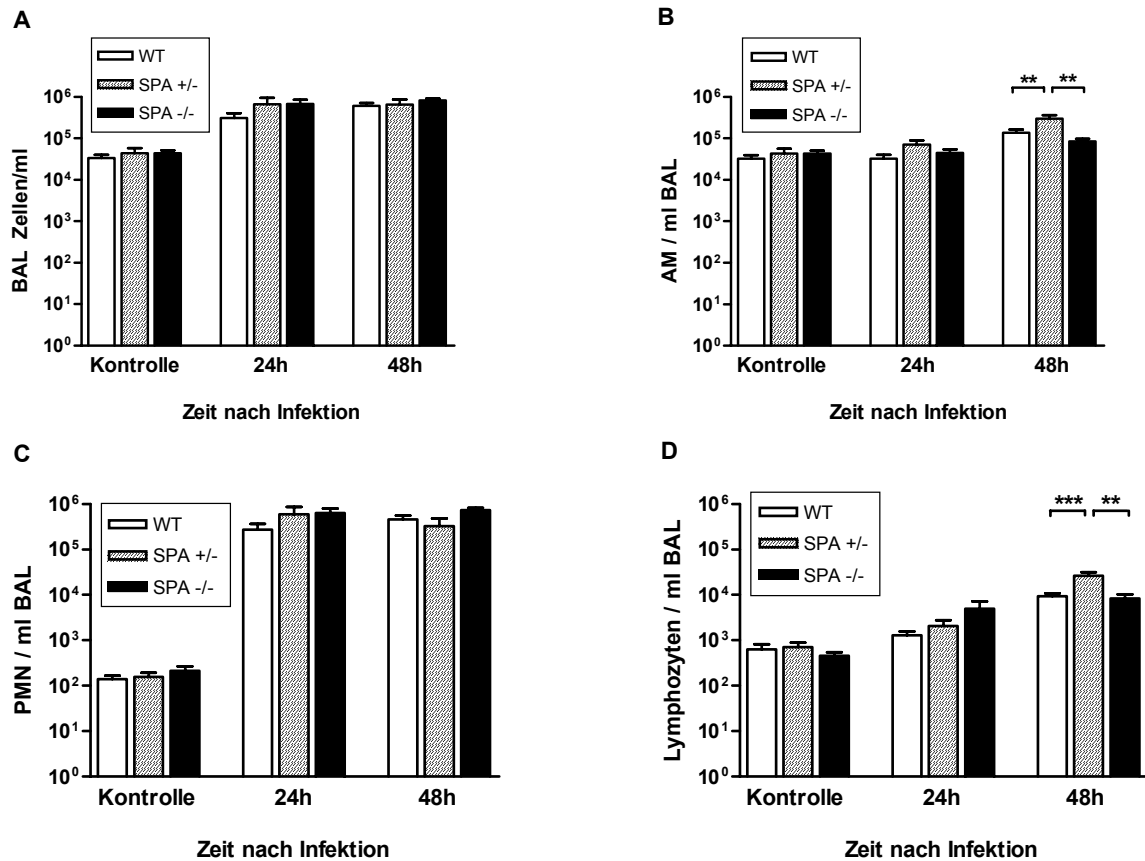


Abbildung 5: **Differentialzellbild in der BALF.** Von WT, SP-A^{+/-} and SP-A^{-/-} Mäusen wurde 24h bzw. 48h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) BALF entnommen. Kontrollmäuse erhielten 20 μ l PBS. Die Gesamtleukozytenzahl in der BALF (A) wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zahl der Alveolarmakrophagen (B), der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (C) und der Lymphozyten (D) wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM. (WT n=12-13, SP-A^{+/-} n=5, SP-A^{-/-} n=7-8). ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Bei diesen Tieren wurden zusätzlich im Blut die Gesamtleukozyten sowie die prozentualen Anteile an Monozyten, PMN und Lymphozyten bestimmt (Abbildung 6). Die Leukozytenzahl war bei WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen zu allen untersuchten Zeitpunkten gleich hoch (Abbildung 6A). SP-A^{-/-} Mäuse zeigten 24h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* eine

Ergebnisse

geringere Granulozytose als WT Mäuse. Allerdings war 48h nach der Infektion zwischen WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen kein Unterschied mehr feststellbar (Abbildung 6C). Die Zahl der Monozyten im Blut war sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion bei WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen gleich (Abbildung 6B). Auch bei der Menge an Lymphozyten war zwischen WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied feststellbar (Abbildung 6D).

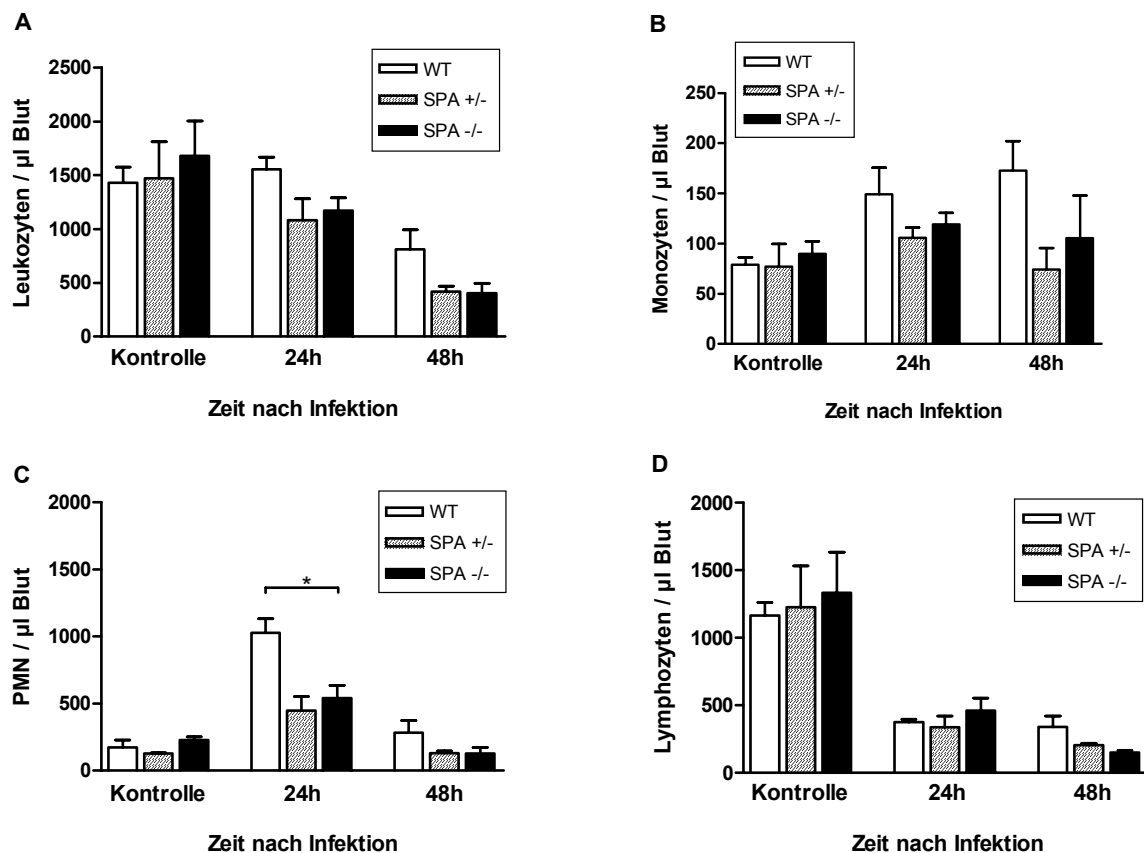


Abbildung 6: **Differentialzellbild im Blut.** WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen wurde 24h bzw. 48h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) arterielles Blut entnommen. Kontrollmäuse erhielten 20µl PBS. Die Gesamtleukozytenzahl im Blut (A), die Zahl der Monozyten (B), der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (C) und der Lymphozyten (D) wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM. (WT n=12-13, SP-A^{+/-} n=5, SP-A^{-/-} n=7-8). * p < 0,05.

5.5 SP-A hat keinen Einfluss auf das histologische Bild der Pneumokokkenpneumonie

WT und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert und 48h später präpariert. Die histologischen Schnitte wurden von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Bei WT Mäusen fanden sich große perivaskuläre Infiltrate von neutrophilen Granulozyten (Abbildung 7A), während SP-A^{-/-} Mäuse vermehrt multifokale Ansammlungen von Neutrophilen aufwiesen (Abbildung 7B). Insgesamt war jedoch kein Unterschied zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen in der quantitativen Gesamtausdehnung der Infiltrate feststellbar.

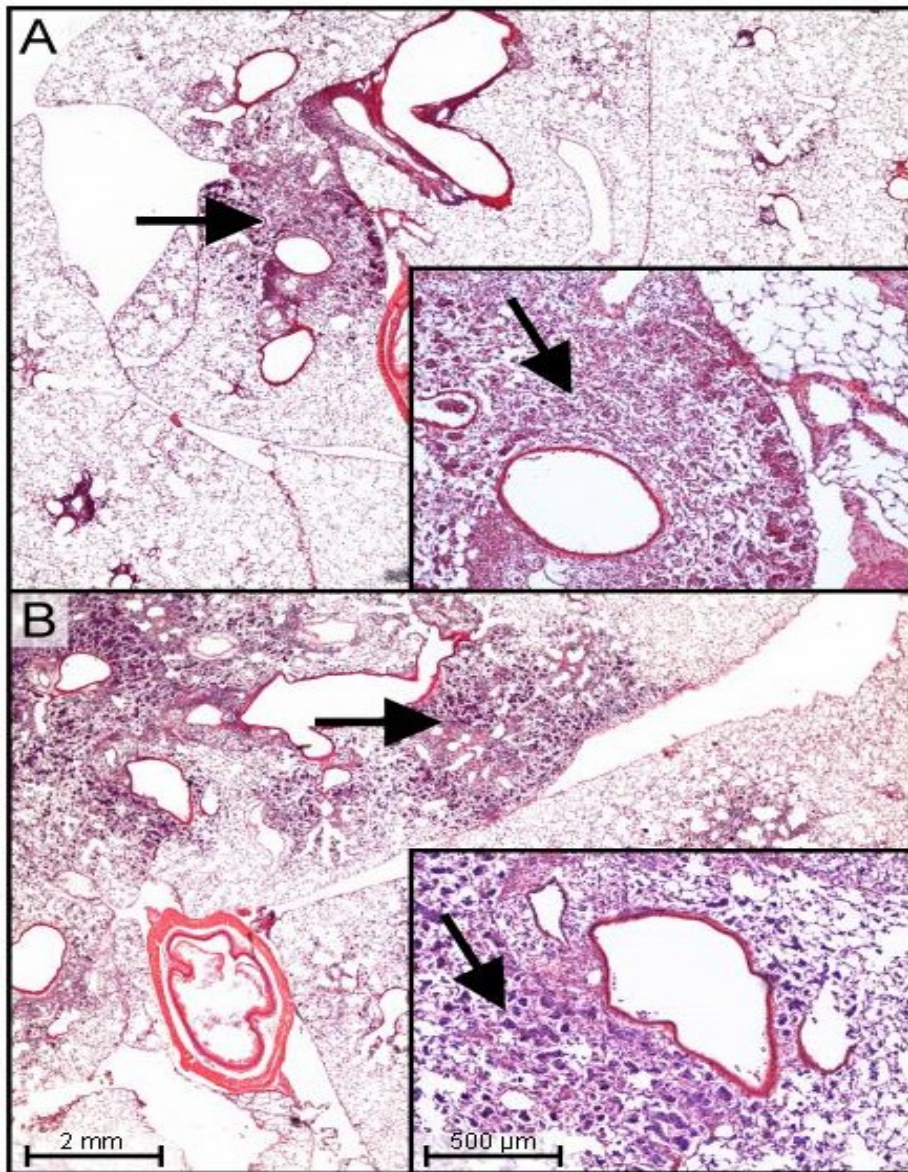


Abbildung 7: **Histologische Untersuchung.** WT (A) und SP-A^{-/-} (B) Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die Lungen wurden 48h nach der Infektion entnommen und mit PFA fixiert. Nach Einbettung in Parafin wurden histologische Schnitte angefertigt und diese mit H/E gefärbt. (n=3) Die Pfeile deuten auf Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten.

5.6 SP-A^{-/-} Mäuse weisen eine erhöhte Produktion von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen in der Lunge auf

WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert, entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Nach 24h bzw. 48h wurde BALF entnommen und darin die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1 α gleichzeitig mittels *Bioplex Assay* gemessen (Abbildung 8). Bei SP-A^{-/-} Mäusen kam es im Vergleich zu WT und SP-A^{+/-} Mäusen besonders 48h nach der Infektion zu einem deutlichen Anstieg der Produktion proinflammatorischer Zytokine, beispielhaft wurde dafür die Konzentration von IL-1 β gemessen (Abbildung 8A). Gleichzeitig waren bei SP-A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT und SP-A^{+/-} Mäusen sowohl 24h als auch 48h nach der Infektion höhere Konzentrationen des antiinflammatorischen IL-10 messbar (Abbildung 8B). Die ermittelte Konzentration an IL-6 als Marker-Zytokin für eine Entzündungsreaktion war bei SP-A^{-/-} Mäusen ebenfalls höher als bei WT und SP-A^{+/-} Mäusen (Abbildung 8C). Bei SP-A^{-/-} Mäusen ließ sich darüberhinaus 24h bzw. 48h nach der Infektion eine gesteigerte Produktion der Chemokine KC, MCP-1 und MIP-1 α im Vergleich zu WT bzw. SP-A^{+/-} Mäusen nachweisen (Abbildung 8 E-G). Zusätzlich wiesen SP-A^{-/-} Mäuse besonders 24h nach der Infektion eine größere Menge des Wachstumsfaktors und PMN-Aktivators G-CSF in der BALF auf (Abbildung 8D).

Ergebnisse

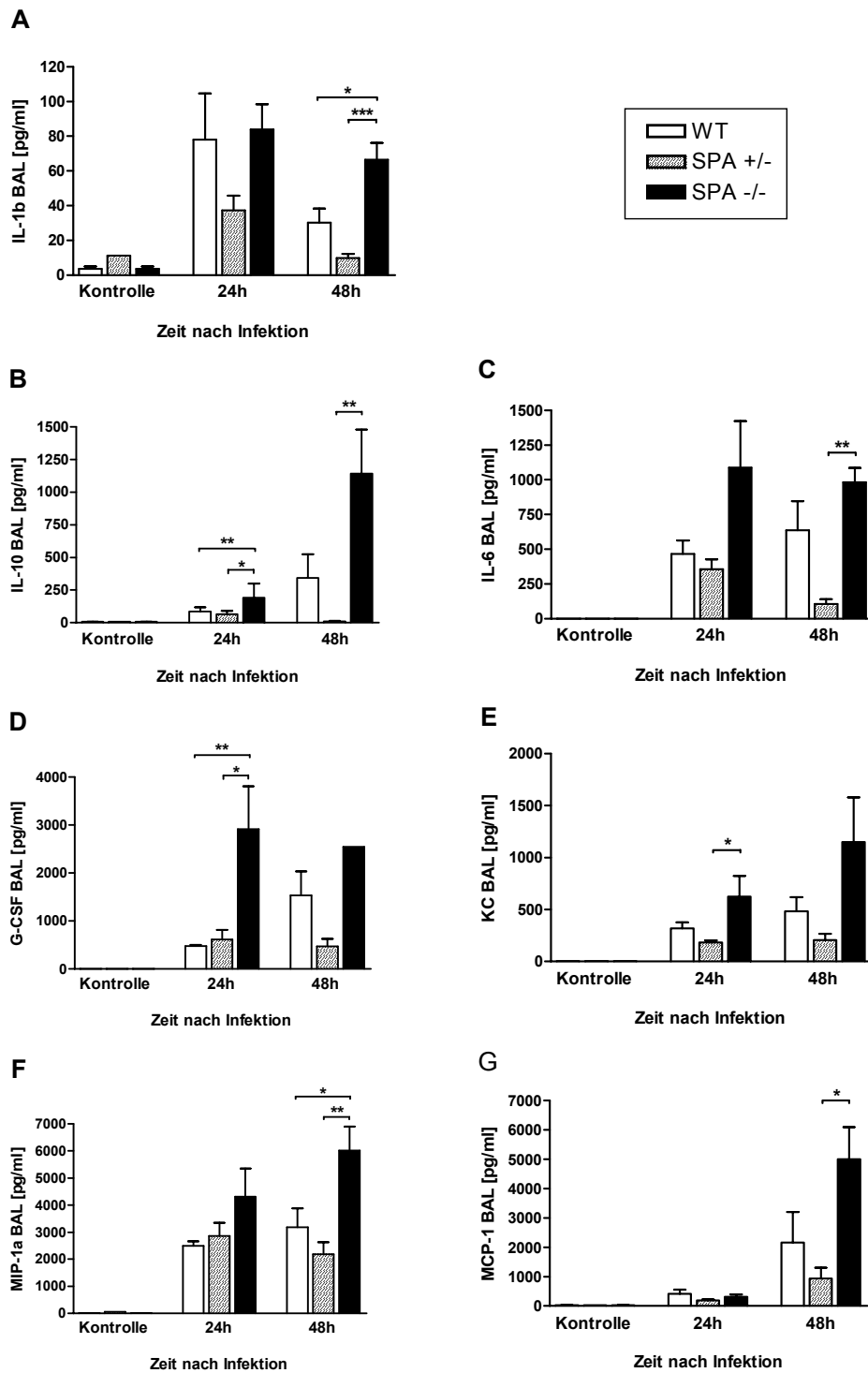


Abbildung 8: **Zytokinkonzentration in der BALF.** Die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1 α wurden in der BALF von WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen 24h bzw. 48h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) gleichzeitig mittels *Bioplex Assay* gemessen. Entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM. (n = 5-6). * p < 0,05, ** p < 0,01; *** p < 0,001.

5.7 SP-A hat keinen Einfluss auf die Veränderung des pulmonalen Gasaustauschs, die Schrankenstörung und Kenngrößen der Atmungsmechanik

WT und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert, die Kontrollmäuse erhielten PBS. Der Oxygenierungsindex wurde 24h und 48h nach der Infektion gemessen, die Kenngrößen der Atmungsmechanik und das Ausmaß der Schrankenstörungen wurden 48h nach der Infektion ermittelt. Bei allen Tieren war eine starke Abnahme des Oxygenierungsindex im Verlauf der Pneumonie zu beobachten. Interessanterweise entwickelten SP-A^{-/-} Mäuse 48h nach der Infektion ein ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) mit einem Oxygenierungsindex < 200 mmHg. Dagegen entsprachen die bei WT Mäusen nach 48h gemessenen p_aO_2/F_iO_2 Werte < 300 mmHg nur der Ausbildung eines ALI (*Acute Lung Injury*). Die Unterschiede zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen waren jedoch zu keinem untersuchten Zeitpunkt signifikant (Abbildung 9A). Die Werte für SP-A^{+/-} Mäuse sind nicht dargestellt; es waren keine Unterschiede zu WT Mäusen feststellbar. Während der Pneumokokkenpneumonie konnte eine vermehrte Durchlässigkeit der Lungengefäße und somit die Ausbildung einer Schrankenstörung in der Lunge 48h nach der Infektion sowohl bei WT als auch bei SP-A^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden. Unterschiede im Ausmaß der Schrankenstörung waren zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen jedoch nicht feststellbar (Abbildung 9B). Auch für die Kenngrößen der Atmungsmechanik dynamische Compliance (C_{dyn}) und pulmonale Resistance (R_L) ergaben sich 48h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* keine Unterschiede zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen (Abbildung 9 C, D).

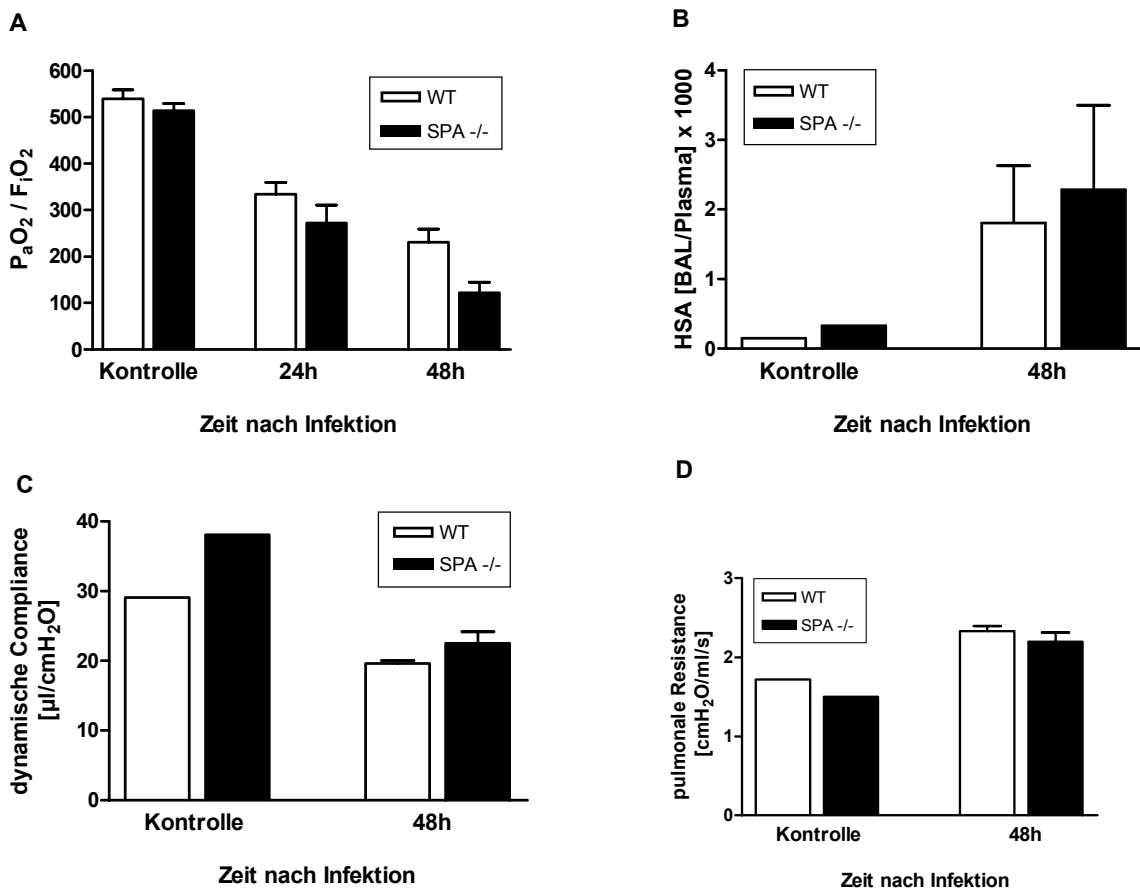


Abbildung 9: **Kenngrößen der Atmungsmechanik und Schrankenstörungen in der Lunge.** Die Messungen wurden an WT und SP-A^{-/-} Mäusen 24h bzw. 48h nach Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) vorgenommen. Die Kontrollmäuse erhielten PBS. (A) Die Mäuse wurden mit $F_iO_2=1$ für 10min beatmet, danach wurde arterielles Blut für die p_aO_2 Analyse entnommen und der Oxygenierungsindex bestimmt (ausgedrückt als p_aO_2/F_iO_2). n=7-8. (B) Eine Stunde nach der intravenösen Gabe von 1mg Humanen Serum Albumin (HSA) wurde BALF und venöses Blut entnommen. Die HSA Konzentration in BALF und Plasma wurde im ELISA ermittelt und als HSA BALF/Plasma Quotient x 1000 dargestellt. n=4. (C, D) Die isolierten Lungen wurden mittels Unterdruck beatmet und die Werte für die dynamische Compliance (C_{dyn}) und die pulmonale Resistance (R_L) wurden 5min lang kontinuierlich aufgezeichnet. n=8. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM.

5.8 SP-A zeigt weder Einfluss auf die bakterielle Translokation aus der Lunge in die systemische Zirkulation noch auf die Ausbildung einer Pneumokokkensepsis

WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert. Die Erregermenge im Blut wurde nach 24h bzw. 48h bestimmt. Unterschiede in der Bakterienlast im Blut konnten bei WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen weder 24h noch 48h nach der Infektion festgestellt werden (Abbildung 10).

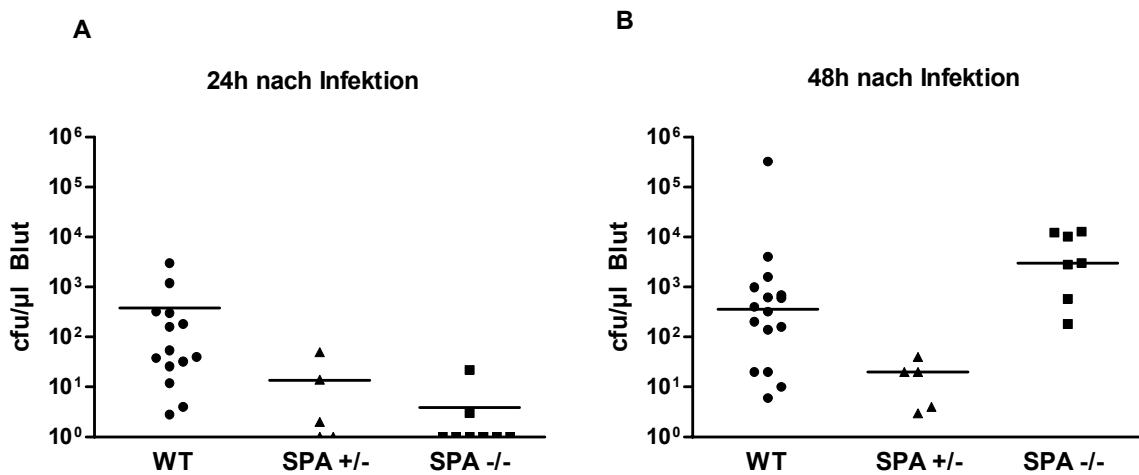


Abbildung 10: **Bakterienlast im Blut.** WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Die cfu im Blut wurden 24h (A) und 48h (B) nach der Infektion ermittelt.

Um die systemische inflammatorische Antwort bei der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen, wurden WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse intranasal mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* infiziert, entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Nach 24h bzw. 48h wurde Blut entnommen und darin die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1 α gleichzeitig mittels *Bioplex Assay* gemessen (Abbildung 11). SP-A^{-/-} Mäuse zeigten zwar zu allen Zeitpunkten eine tendenziell höhere Zytokinsynthese im Plasma verglichen mit WT und SP-A^{+/-} Mäusen. Signifikante Unterschiede zu WT bzw. SP-A^{+/-} Mäusen ließen sich jedoch nur für das Chemokin MIP-1 α (Abbildung 11F) und den Wachstumsfaktor G-CSF (Abbildung 11D) 24h nach der Infektion ermitteln.

Ergebnisse

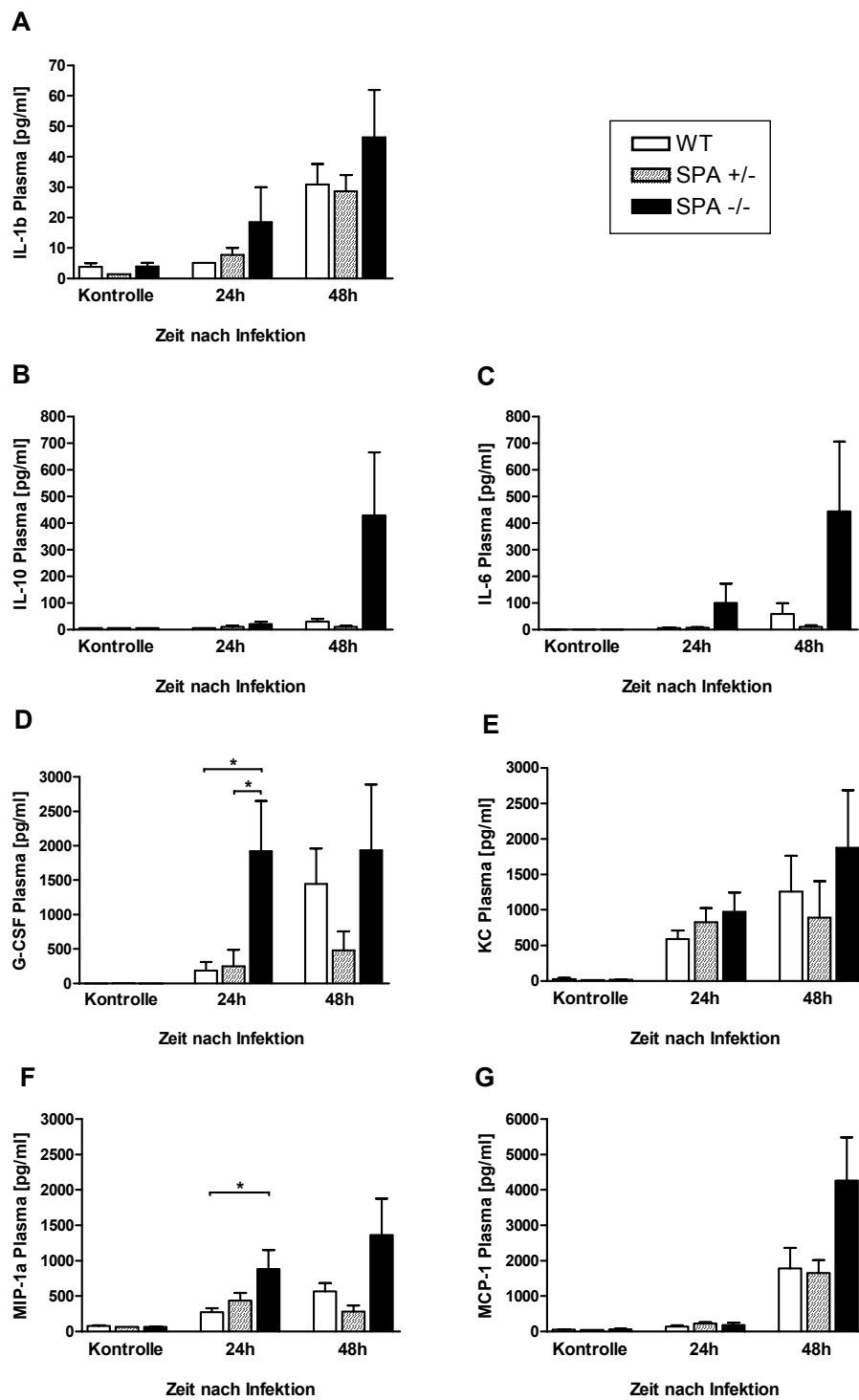


Abbildung 11: **Zytokinkonzentration im Plasma.** Die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, G-CSF, KC, MCP-1 und MIP-1 α wurden im Plasma von WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäusen 24h bzw. 48h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) gleichzeitig mittels *Bioplex Assay* gemessen. Entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM. (n = 5-6). * p < 0.05.

Um das klinische Bild einer im Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie auftretenden Sepsis erfassen zu können, wurden 24h bzw. 48h nach intranasaler Infektion mit 5×10^6 cfu von *S. pneumoniae* bei WT und SP-A^{-/-} Mäusen Laktatwert, arterieller Mitteldruck, sowie Gewichtsverlust und Abfall der Körpertemperatur als klinische Parameter einer Sepsis erfasst (Abbildung 12). Die Daten für SP-A^{+/-} Mäuse sind nicht dargestellt, es waren keine Unterschiede zu WT Mäusen ermittelbar.

Der Verlust an Körpermasse war 24h nach der Infektion bei WT Mäusen höher als bei SP-A^{-/-} Mäusen. Dieser Unterschied war nach 48h jedoch nicht mehr nachweisbar (Abbildung 12C). Die Abnahme des arteriellen Mitteldrucks war zu allen untersuchten Zeitpunkten bei WT und SP-A^{-/-} Mäusen gleich ausgeprägt (Abbildung 12B). Der Laktatwert war bei SP-A^{-/-} Mäusen 24h nach der Infektion höher als bei WT Mäusen. Dieser Unterschied war nach 48h jedoch nicht mehr nachweisbar (Abbildung 12A). Der Abfall der Körpertemperatur war 24h nach der Infektion bei SP-A^{-/-} Mäusen höher als bei WT Mäusen, nach 48h zeigten WT und SP-A^{-/-} Mäuse eine gleich stark ausgeprägte Hypothermie (Abbildung 12D).

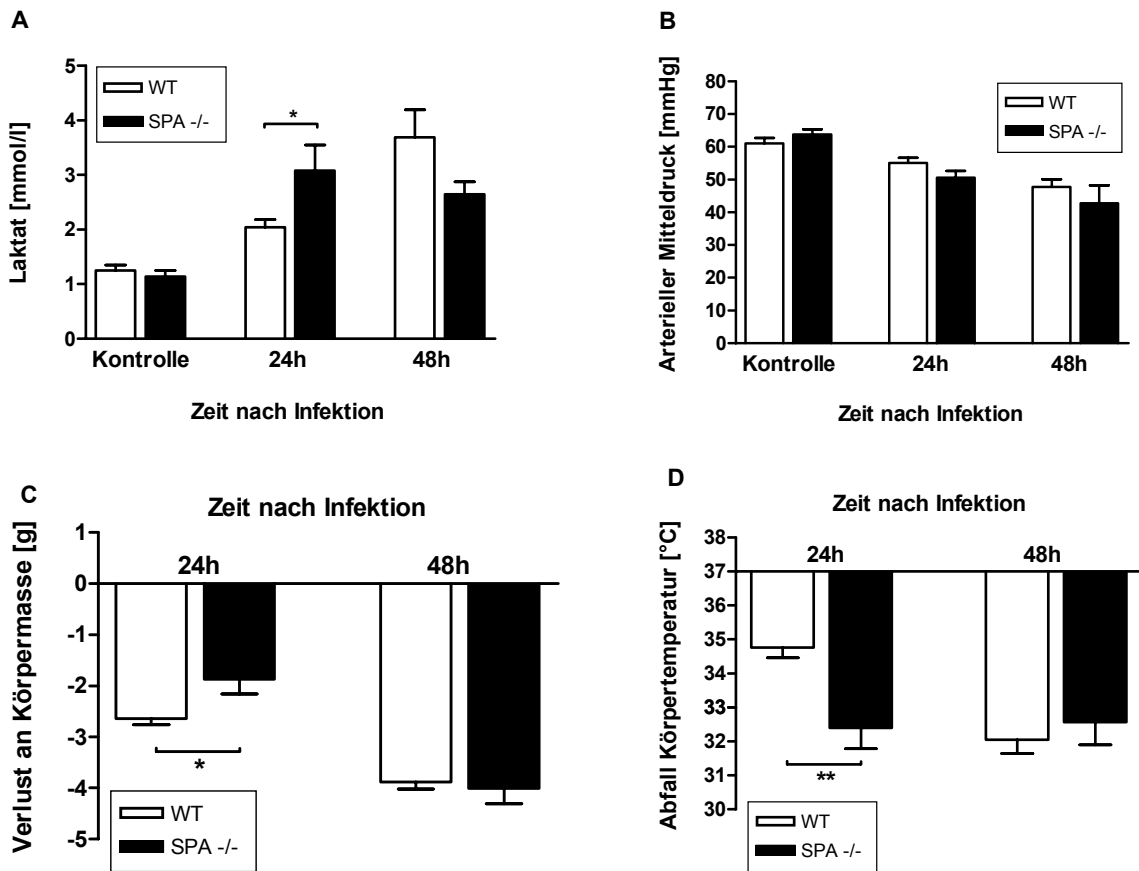


Abbildung 12: **Sepsisparameter.** Die Messungen wurden an WT und SP-A^{-/-} Mäusen 24h (n=8) bzw. 48h (n=7) nach Infektion mit 5x10⁶ cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) vorgenommen. Die Kontrollmäuse erhielten PBS. Es wurde der Laktatwert aus arteriellem Blut bestimmt (A), der Arterielle Mitteldruck über ein Kathetersystem in der A. carotis aufgezeichnet (B), sowie der Verlust an Körpermasse (C) und die Körpertemperatur (D) wurden überwacht. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte ± SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01.

5.9 SP-A hat im Mausmodell keinen Einfluss auf den klinischen Ausgang der schweren Pneumokokkenpneumonie

WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5x10⁴ cfu (letale Dosis 50 - LD50) von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Das Überleben der Tiere wurde alle 24h über 10 Tage registriert (Abbildung 13). Die Überlebensrate der SP-A^{-/-} Mäuse war mit 35,5% tendenziell niedriger als bei WT (59,4%) und SP-A^{+/-} Mäusen (63,1%). Die beobachteten Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (p = 0,16).

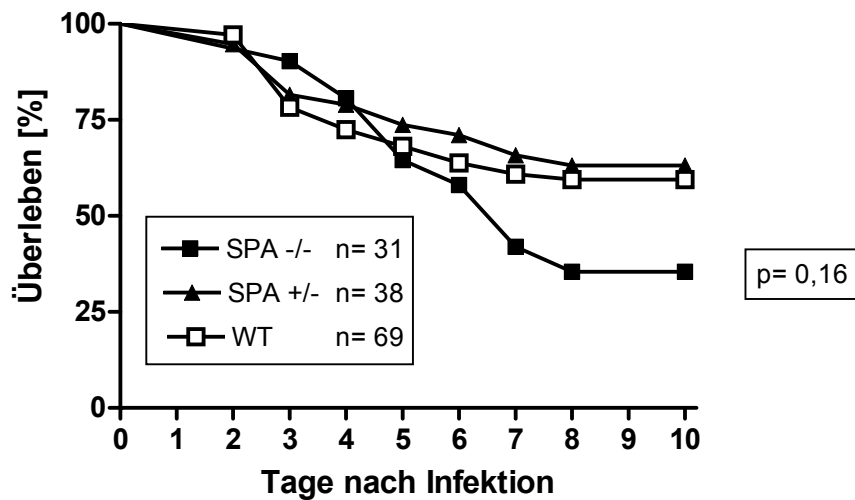


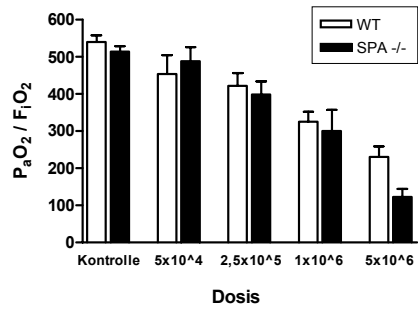
Abbildung 13: **Mortalität.** WT, SP-A^{+/-} und SP-A^{-/-} Mäuse wurden intranasal mit 5×10^4 cfu von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Das Überleben der Tiere wurde alle 24h über 10 Tage registriert.

5.10 Auch bei Verwendung von niedrigeren Infektionsdosen beeinflusst SP-A den Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie nicht

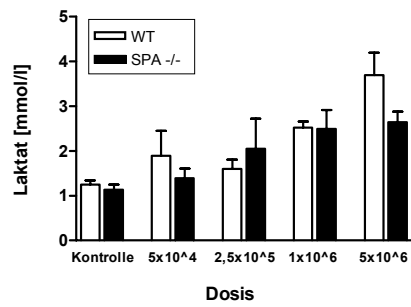
Um einen Einfluss der Wahl der Infektionsdosis auf die bisher dargestellten Ergebnisse auszuschließen, wurden WT und SP-A^{-/-} Mäuse mit unterschiedlich hohen Dosen von *S. pneumoniae* intranasal infiziert (5×10^4 , $2,5 \times 10^5$, 1×10^6 und 5×10^6), entsprechende Kontrollmäuse erhielten PBS. Dabei entsprach die niedrigste verwendete Infektionsdosis einer LD50 und die höchste einer LD100. Alle vorher schon beschriebenen Messungen (bis auf die Zytokinbestimmungen) wurden 48h nach der Infektion durchgeführt (Abbildung 14). Auch die Verwendung von niedrigeren Infektionsdosen konnte zwischen WT und SP-A^{-/-} Mäusen keinen Unterschied aufzeigen. Der Effekt von SP-A auf die Erregerelimination in der Lunge war erst bei der höchsten verwendeten Dosis evident (Abbildung 14F – vgl. Abbildung 4B).

Ergebnisse

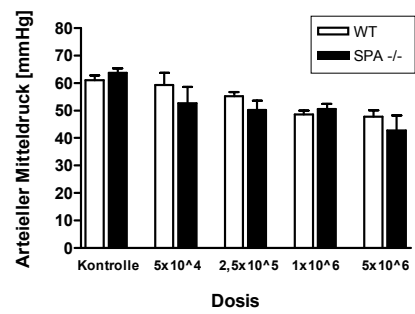
A



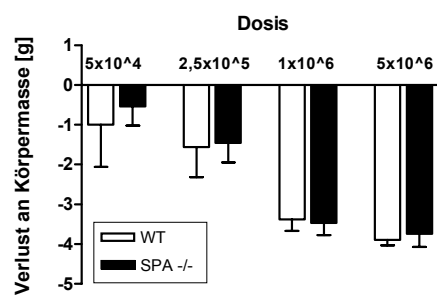
B



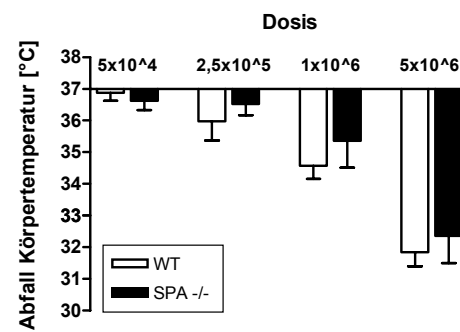
C



D



E



Ergebnisse

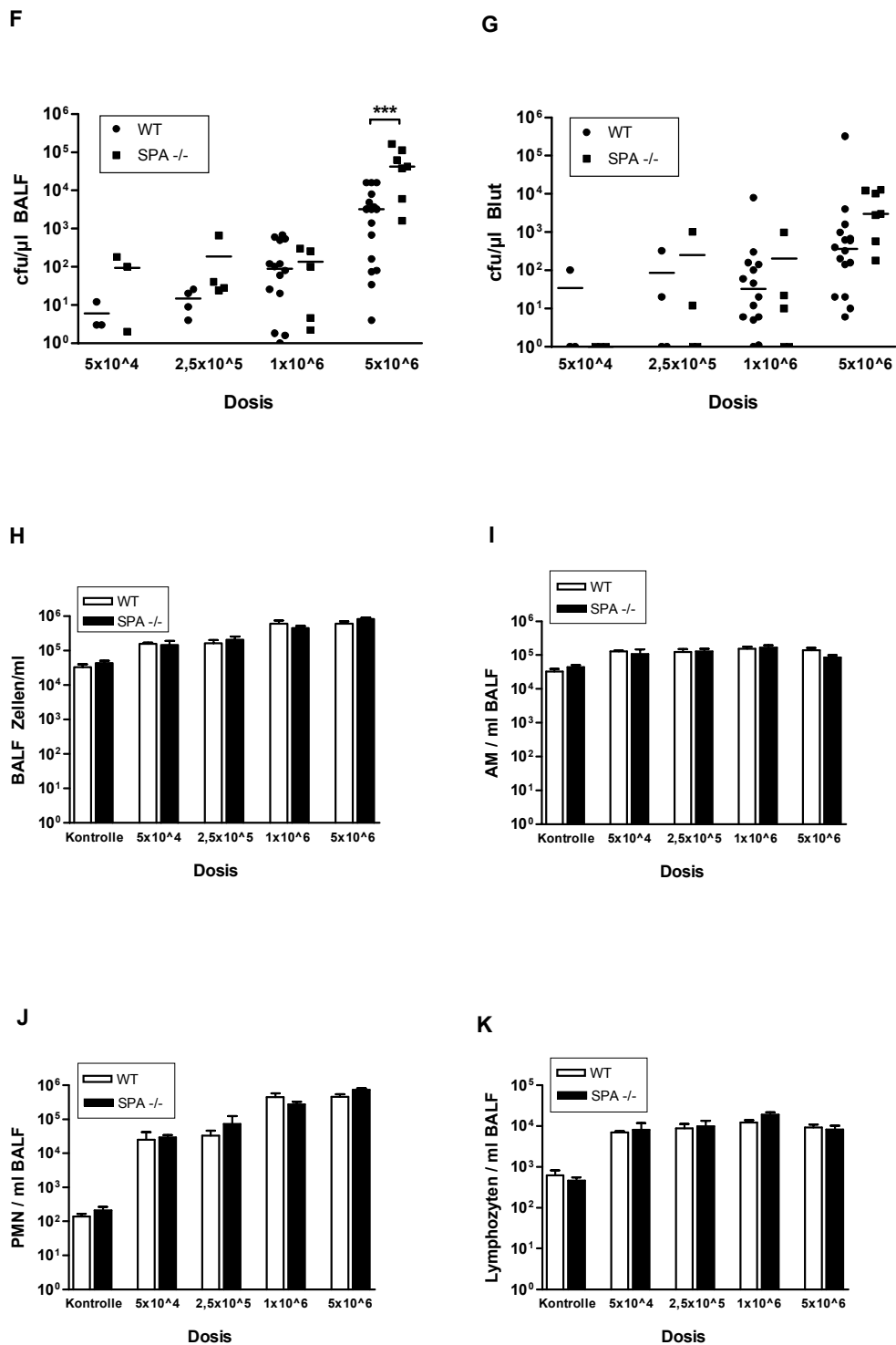


Abbildung 14: **Dosisreihe.** WT und SP-A^{-/-} Mäuse wurden mit verschiedenen hohen Dosen von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) (5×10^4 (n=3), 2.5×10^5 (n=4), 1×10^6 (n=5) und 5×10^6 (n=7-8) cfu) infiziert. Es wurden alle zuvor beschriebenen Experimente 48h nach der Infektion durchgeführt. Bei den verschiedenen Infektionsdosen ließ sich kein Unterschied zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen feststellen. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwerte \pm SEM. *** p < 0.001.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des Surfactantproteins A für die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie anhand eines Infektionsmodells mit gentechnisch veränderten Mäusen analysiert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass SP-A zwar einen Beitrag zur pulmonalen Abwehr von Pneumokokken leistet und die Entzündungserscheinungen in der Lunge reduziert. Allerdings zeigte SP-A keine wesentlichen Auswirkungen auf den pulmonalen Gasaustausch, die alveolokapilläre Schrankenstörung und Kenngrößen der Atmungsmechanik, ebensowenig konnte SP-A das Auftreten einer Bakteriämie, den Grad der systemischen Inflammation und die Ausbildung der Pneumokokkensepsis beeinflussen. Schliesslich hatte das Surfactantprotein A auch keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf und den Ausgang einer schweren Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell.

6.1 Pulmonale Abwehr

Das Surfactantprotein A gehört zu einer Gruppe von Proteinen, den sogenannten Collectinen, die in Anwesenheit von freiem Calcium spezifisch an bestimmte Kohlenhydratstrukturen binden. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass SP-A eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr gegen zahlreiche mikrobielle Erreger und auch Allergene in der Lunge spielt (69). So ist SP-A in der Lage, über die Opsonisierung von Erregern (69), durch die Förderung der Chemotaxis (70), ebenso wie durch die Aktivierung von Immunzellen und die Verstärkung des respiratory burst (25) die Phagozytose und Beseitigung von Pathogenen zu verbessern.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit scheint SP-A an der Elimination von Pneumokokken aus der Lunge beteiligt zu sein. Die Zahl der Pneumokokken in der Lunge war bei SP-A-defizienten Mäusen 48h nach der Infektion mit 5×10^6 cfu *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) signifikant höher im Vergleich zu WT Mäusen. Bei Verwendung niedrigerer Infektionsdosen (5×10^4 , $2,5 \times 10^5$ und 1×10^6) ließ sich dieser Unterschied jedoch nicht mehr nachweisen. SP-A scheint sich demnach nur an der Erregerelimination zu beteiligen, wenn die Infektionsdosis die Abwehrkapazität im Alveolarraum übersteigt. Bei der hohen

Infektionsdosis ließ sich der Unterschied zwar 48h nicht jedoch 24h nach Infektion nachweisen, SP-A scheint demnach erst in der späteren Phase einer Pneumokokkeninfektion in die Immunantwort der Lunge einzugreifen. Dies könnte zum einen dadurch erklärt sein, dass ein Großteil der Abwehrleistung durch Neutrophile vermittelt wird, denn der Einstrom von PMNs in den Alveolarraum lässt sich in dem Modell erst 12-24h nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* nachweisen. Aus in vitro Experimenten ist nämlich bekannt, dass SP-A zu einer gesteigerten Aufnahme und Beseitigung von Pneumokokken des Serotyps 19 und 23 durch neutrophile Granulozyten führt (20), während SP-A kein potentes Pneumokokken-Opsin für die Phagozytoseleistung von Alveolarmakrophagen darstellt (52). Indirekt konnte SP-A jedoch in einer anderen Studie die Phagozytose von *S. pneumoniae* durch Alveolarmakrophagen durchaus verbessern, indem SP-A unabhängig von einer Bindung an *S. pneumoniae* die Expression des Oberflächenrezeptors Scavenger Rezeptor A hochregulierte und so die Phagozytoseleistung der Makrophagen erhöhte (38). Da die Hochregulation des Rezeptors jedoch eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt, ließe sich auch hierdurch der verzögerte Einfluss von Surfactantprotein A auf die pulmonale Abwehr im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie erklären. Da die Anzahl von Phagozyten in der Lunge bei WT Mäusen und SP-A-defizienten Mäusen keinen Unterschied ergab, lässt sich die verbesserte Erregerelimination nicht auf die gesteigerte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten oder von Zellen des Monozyten/Makrophagensystems zurückführen.

In zahlreichen Pneumoniemodellen mit SP-A-defizienten Mäusen verbesserte SP-A ebenfalls die Elimination von Pathogenen und senkte damit die nachweisbare Erregerlast in der Lunge. Nach Infektion mit Gruppe B Streptokokken zeigten SP-A^{-/-} Mäuse zu allen untersuchten Zeitpunkten (6h, 24h und 48h nach Infektion) signifikant höhere Bakterienlasten im Lungenhomogenat. Der Unterschied zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen war nach 6h besonders deutlich, was die Autoren vermuten ließ, dass SP-A^{-/-} Mäuse die inokulierten Bakterien wesentlich langsamer eliminierten als die WT Kontrollen (39). In weiteren Studien von LeVine et al. zeigten SP-A-defiziente Mäuse 6h und 24h nach Infektion mit Gruppe B Streptokokken bzw. *Haemophilus influenzae* ebenfalls signifikant höhere Erregerlasten in der Lunge im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (42; 43). Nach Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* war die Zahl der im Lungenhomogenat nachweisbaren Bakterien 6h und 24h nach Infektion bei SP-A^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei WT Mäusen, während nach 48h kein

Unterschied zwischen den Gruppen mehr feststellbar war (41). In einem Pneumoniemodell mit Respiratory Syncycial Virus wurde der Virustiter im Lungenhomogenat von SP-A-defizienten und WT Mäusen 3, 5 und 7 Tage nach Infektion untersucht. Dabei zeigten SP-A^{-/-} Mäuse zu allen untersuchten Zeitpunkten signifikant höhere Viruslasten, die sich an den Tagen 3 und 5 nach Infektion besonders deutlich von denen der WT Kontrollen unterschieden (40). Immunsupprimierte SP-A-defiziente und WT Mäuse wurden in einem *Pneumocystis murina* Modell intratracheal mit Zysten infiziert, und in verschiedenen Stadien der Infektion wurde die Anzahl von *Pneumocystis*-Zysten in der Lunge bestimmt. Während 1-2 Wochen nach der Infektion keine Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen erkennbar waren, fanden sich 3-4 und 5-6 Wochen nach der Inokulation von *Pneumocystis murina* signifikant mehr Zysten in der Lunge von SP-A-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (47). Nach intratrachealer Gabe von *Escherichia coli* K12 konnte bei SP-A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen eine signifikant höhere Bakterienlast 6h nach Infektion im Lungenhomogenat nachgewiesen werden (71). Während SP-A in zahlreichen Maus-Pneumonie-Modellen zu einer besseren Erregerbeseitigung aus der Lunge beitrug, waren nach Infektion von SP-A^{-/-} und WT Mäusen mit Influenza A Virus keine signifikanten Unterschiede in der Höhe des Virustiters in der Lunge bei beiden Gruppen messbar (44). Auch in einem Infektionsmodell mit *Mycoplasma pulmonis* ließ sich nicht zu allen untersuchten Zeitpunkten und bei allen eingesetzten Infektionsdosen ein signifikanter Unterschied in der Höhe der Erregerzahl in der Lunge von SP-A^{-/-} und WT Mäusen feststellen. So zeigten SP-A-defiziente Mäuse nach 72h nur nach Infektion mit einer mittleren Dosis von *Mycoplasma pulmonis* signifikant höhere Bakterienmengen im Lungenhomogenat, während es bei der niedrigen und der hohen Infektionsdosis keine Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen gab. Nach Verwendung einer hohen Infektionsdosis zeigten SP-A^{-/-} Mäuse nur 24h nach Infektion signifikant höhere Bakterienlasten in der Lunge im Vergleich zu WT Mäusen, nach 48h und 72h waren keine Unterschiede zwischen den Gruppen mehr nachweisbar (26).

Somit scheint SP-A in Abhängigkeit vom beteiligten Erreger zu unterschiedlichen Infektionsphasen in die pulmonale Abwehr einzugreifen und darüber hinaus je nach einwirkendem Pathogen mit unterschiedlichen Immunzellen zu interagieren. Im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie scheint SP-A nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erst

bei sehr hoher Infektionsdosis und zu einem späten Zeitpunkt in den pulmonalen Abwehrprozess involviert zu sein.

6.2 Inflammation und Kenngrößen der Atmungsmechanik

Das Lungencollectin SP-A ist nicht nur an der unmittelbaren Erregerelimination beteiligt, es spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation von Entzündungsprozessen in der Lunge, es ist ein Immunmodulator. SP-A ist an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen beteiligt und beeinflusst somit indirekt auch die Produktion von Zytokinen und Chemokinen im pulmonalen Kompartiment (12).

Die vorliegende Arbeit zeigt erneut, dass es in Anwesenheit von SP-A zu einer geringeren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen kommt. Gleichzeitig scheint aber auch die Synthese antiinflammatorischer Zytokine und die Freisetzung phagozytenaktivierender Chemokine und Wachstumsfaktoren in Anwesenheit von SP-A gedämpft zu sein. Bei SP-A-defizienten Mäusen war in der Frühphase der Erkrankung eine höhere Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 und eine deutlich gesteigerte Synthese des Granulozytenwachstumsfaktors G-CSF zu detektieren. Allerdings war bei SP-A-defizienten Mäusen weder eine vermehrte Rekrutierung von Granulozyten oder eine ausgeprägtere Blutgranulozytose zu verzeichnen, noch war eine Veränderung der histologischen Ausprägung der pulmonalen Inflammation zu bemerken. Die vermehrte Synthese von IL-10 24h nach Infektion könnte bei den SP-A-defizienten Mäusen allerdings zu der 48h nach Infektion nachweisbaren geringeren Erregerelimination beigetragen haben. Ähnliches konnten schon Chabot et al. demonstrieren. Sie wiesen für SP-A einen inhibitorischen Effekt auf die Produktion von IL-10 während einer durch LPS ausgelösten pulmonalen Inflammation in vivo nach. Dies ließ die Autoren vermuten, dass die Inhibition der IL-10 Produktion durch SP-A den proinflammatorischen Stimulus unterstützt und so die Effizienz der pulmonalen Erregerelimination gesteigert wird (8). Auf der anderen Seite war die Erregerelimination trotz höherer Konzentrationen aktivierender proinflammatorischer Zytokine 48h nach Infektion nicht gesteigert. Die Produktion inflammatorischer Mediatoren in der Lunge scheint daher nicht zwangsläufig mit der Abwehrleistung im alveolären Kompartiment assoziiert zu sein.

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit konnte in zahlreichen anderen Studien eine durch SP-A hervorgerufene Abschwächung der Zytokinproduktion nach Infektion mit einer Vielzahl von Erregern gezeigt werden. So waren die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF α , INF γ und IL-6, sowie des Chemokins MIP-2 und des antinflammatorischen IL-10 zwei Stunden nach der Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* im Lungenhomogenat von SP-A^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei WT Kontrollen. In diesem Modell war jedoch bei SP-A-defizienten Mäusen gleichzeitig auch eine vermehrte Granulozytenrekrutierung in die Lunge nachzuweisen (41). In einem Infektionsmodell mit dem Respiratory Syncytial Virus konnten 24h nach intratrachealer Virusapplikation signifikant erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 bei SP-A^{-/-} Mäusen gemessen werden, während die Zytokinkonzentrationen des ebenfalls proinflammatorischen IL-1 und des Chemokins MIP-2 denen von WT Mäusen glichen. Diese Unterschiede zwischen SP-A-defizienten und WT Mäusen ließen sich 72h nach der Infektion mit Respiratory Syncytial Virus nicht mehr nachweisen. In der BALF von SP-A^{-/-} Mäusen ließen sich 24h, 3d, 5d und 7d nach der Infektion signifikant höhere Gesamtzellzahlen und ab Tag 3 auch prozentual mehr PMNs im Vergleich zu WT Mäusen nachweisen (40). In einer weiteren Studie von LeVine et al. wurde 6h nach Infektion mit Gruppe B Streptokokken eine signifikant höhere Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 im Lungenhomogenat von SP-A-defizienten Mäusen gemessen, während mit *Haemophilus influenzae* infizierte SP-A^{-/-} Mäuse zusätzlich auch mehr proinflammatorisches IL-1 β und höhere Werte für das Chemokin MIP-2 aufwiesen als Wildtyp Mäuse. Mit Streptokokken der Gruppe B infizierte SP-A^{-/-} Mäuse zeigten nur 6h nach der Infektion signifikant höhere Gesamtzellzahlen in der BALF und zu keinem Zeitpunkt einen erhöhten prozentualen Anteil an PMNs. Dagegen waren nach Infektion mit *Haemophilus influenzae* nach 6h und nach 24h bei SP-A-defizienten Mäusen höhere Zellzahlen als bei WT Mäusen messbar, und darüber hinaus war der prozentuale Anteil von PMNs an der Gesamtzellzahl in der BALF 24h nach Infektion bei SP-A^{-/-} Mäusen signifikant größer als bei den WT Kontrollen (43). In einem Pneumoniemodell mit Influenza A Virus war die im Lungenhomogenat gemessene Konzentration des Chemokins MIP-2 an Tag 2 und 6 nach Infektion bei SP-A^{-/-} Mäusen signifikant höher als bei WT Mäusen. Für die beiden proinflammatorischen Zytokine IL-6 und INF γ waren dagegen nur an Tag 6 bei SP-A^{-/-} Mäusen signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Kontrollen messbar. In dieser Studie wurden 2d und 6d nach Infektion mit

Influenza A Virus in der BALF die Gesamtzellen und die absoluten PMN Zahlen bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen waren jedoch nur in Bezug auf die absoluten PMN Zahlen an Tag 2 feststellbar (44). In einem *Pneumocystis murina* Modell mit immunsuppremierten SP-A^{-/-} und WT Mäusen wurden in verschiedenen Infektionsphasen, 1-2, 3-4 und 5-6 Wochen nach Infektion, die Konzentrationen von bestimmten Zytokinen ermittelt. Dabei waren nur in der späten Infektionsphase, 5-6 Wochen nach Infektion mit *Pneumocystis murina*, bei SP-A-defizienten Mäusen höhere Werte für das proinflammatorische Zytokin INF γ in der BALF bzw. für das Chemokin MIP-2 im Lungenhomogenat messbar, während für die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 zu keinem Untersuchungszeitpunkt Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen nachweisbar waren. Ebenso gab es in der Gesamtzellzahl in der BALF und den absoluten Zellzahlen von Makrophagen, PMNs und Lymphozyten keine Unterschiede zwischen SP-A-defizienten und WT Mäusen (45). Auch im Zusammenhang mit einem Allergen wie *Aspergillus fumigatus* wurde der Effekt von SP-A auf die Zytokinproduktion untersucht. So waren bei SP-A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen die Konzentrationen von IL-2, IL-5 und IL-13 erhöht bzw. von INF γ erniedrigt, während beide Mausstämme gleich hohe Messwerte für die Zytokine IL-4, IL-10, IL-12 und TNF α in der Lunge aufwiesen (49).

Zusammengefasst scheint SP-A im Rahmen eines pulmonalen Infektionsgeschehens die Produktion sowohl von pro- als auch von antiinflammatorischen Zytokinen, sowie von Chemokinen zu vermindern. Dieser Befund liess sich auch in der vorliegenden Arbeit am Modell der Pneumokokkenpneumonie demonstrieren. Diese Drosselung der pulmonalen Produktion von Entzündungsmediatoren ist jedoch nicht gleichbedeutend mit der simultanen Reduktion sowohl des histologischen als auch des funktionellen Lungenschadens, denn Unterschiede in der Schwere der Gasaustauschstörung oder der Funktionsstörung der alveolokapillären Barriere, sowie der Kenngrößen der Atmungsmechanik ließen sich zwischen SP-A-defizienten und WT Mäusen nicht nachweisen.

Die oben angeführten Studien anderer Autoren haben ausschließlich Zytokinmessungen, teilweise kombiniert mit histologischen Untersuchungen, zur Beurteilung der pulmonalen Inflammation während eines Pneumoniegeschehens herangezogen. Somit waren Aussagen zum Ausmaß der funktionellen Beeinträchtigung der Lunge nicht möglich. In der

vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals Untersuchungen zum Gasaustausch und zur Erfassung von Kenngrößen der Atmungsmechanik durchgeführt, um die klinische Bedeutung der Reduktion pulmonaler Erregerelimination und pulmonaler Zytokinproduktion zu erfassen.

Zur Erfassung der pulmonalen Gasaustauschfunktion wurde der Oxygenierungsindex herangezogen. Zwar ließen sich zwischen SP-A-defizienten und Wildtyp Mäusen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gasaustauschfunktion nachweisen. Interessanterweise hatten SP-A-defiziente Mäuse aber funktionell bereits ein ARDS mit einem mittleren Oxygenierungsindex < 200 mmHg, während WT Mäuse nur ein ALI mit Werten zwischen 200 und 300 mmHg aufwiesen.

Um das Ausmaß der bei einer Pneumokokkenpneumonie entstehenden Schrankenstörung der Lungengefäße und den Einfluss von SP-A auf dieses Geschehen beurteilen zu können, wurde SP-A^{-/-} und WT Mäusen Humanes Serum Albumin (HSA) intravenös appliziert und anschließend der Quotient aus in der BALF und im Plasma nachweisbarem HSA ermittelt. Dabei zeigten sowohl SP-A^{-/-} als auch WT Mäusen eine erhebliche Schrankenstörung im Sinne eines akuten Lungenversagens. Signifikante Unterschiede zwischen SP-A-defizienten und WT Mäusen waren jedoch nicht darstellbar, sodass hier erstmals gezeigt werden konnte, dass SP-A weder einen direkten noch einen indirekten (über Entzündungsmediatoren) Einfluss auf die alveolokapilläre Schrankenfunktion auszuüben scheint.

Die Kenngrößen der Atmungsmechanik während der schweren Pneumokokkenpneumonie bei der Maus wurden anhand der Messung der dynamischen Compliance (C_{dyn}) und der pulmonalen Resistance (R_L) bestimmt. Im Vergleich zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen gab es 48h nach der Infektion keine signifikanten Unterschiede bei C_{dyn} und R_L . Auch hier war demnach kein Effekt von SP-A auf die untersuchten Parameter feststellbar. In der Literatur findet sich nur eine weitere Arbeit, in der im Zusammenhang mit einem Pneumoniegesehen bei der Maus eine Messung der dynamischen Lungencompliance vorgenommen wurde. Dort konnte SP-A zur Verbesserung der Lungencompliance in einem Modell zur ideopathischen Pneumonie nach Knochenmarkstransplantation mit SP-A-defizienten Mäusen beitragen (72). Studien, die die Kenngrößen der Atmungsmechanik von SP-A^{-/-} Mäusen untersucht haben, liegen ansonsten nur für gesunde, nicht infizierte SP-A-defiziente Mäuse vor. Dabei konnten keine Veränderungen für das Lungenvolumen und die –compliance bei SP-A^{-/-} Mäusen im

Vergleich zu WT Mäusen gefunden werden (34). Surfactant von SP-A-defizienten Mäusen weist kein tubuläres Myelin auf, ist leichter durch Plasmaproteine zu inhibieren und zeigt weniger dicht gepackte Lipidaggregate. Trotz dieser Unterschiede in der Surfactantstruktur und einigen biophysikalischen Eigenschaften führt ein Fehlen von SP-A zu keinen Mängeln in der Surfactantfunktion *in vivo* (27; 28). So stellte das von SP-A-defizienten Mäusen gewonnene Surfactant die Lungenfunktion von frühgeborenen Kaninchen ebenso effektiv wieder her wie Surfactant von WT Mäusen (28). Das Fehlen von SP-A beeinflusste darüberhinaus den durch N-Nitroso-N-Methylurethan-induzierten Lungenschaden nicht, es konnte kein Unterschied in der Proteinpermeabilität der Lunge, als Maß für die Schwere des entstandenen Lungenschadens, zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen gefunden werden (28).

In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die Abwesenheit von SP-A auch im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie keinen nachweisbaren Einfluss auf die Kenngrößen der Atmungsmechanik, den Gasaustausch und die pulmonale Schrankenstörung hat.

6.3 Bakterielle Translokation von der Lunge in die systemische Zirkulation und Ausbildung einer Pneumokokkensepsis

Eine Bakteriämie ist definiert als das Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut. Unter dem Begriff Sepsis versteht man eine generalisierte hyperinflammatorische Reaktion des Organismus hervorgerufen durch eine Infektion (1). Der von der Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* 1991 erstellte Kriterienkatalog für die Diagnose der Sepsis wurde von der Arbeitsgruppe Sepsis der *European Society of Intensive Care Medicine* 1995 modifiziert. Demnach liegt eine schwere Sepsis vor, wenn der Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation gesichert ist und eine systemische inflammatorische Wirtsreaktion anhand zweier der folgenden Kriterien nachgewiesen wurde: Hypo- oder Hyperthermie, Tachykardie, Tachypnoe und Leukozytose oder Leukopenie. Darüber hinaus muss für eine schwere Sepsis eine infektionsbezogene Organdysfunktion vorliegen, wie akute Enzephalopathie, Thrombozythopenie, arterielle Hypoxämie, arterielle Hypotension, renale Dysfunktion oder metabolische Azidose (14). Im hier verwendeten Mausmodell wurde das Vorliegen einer Bakteriämie anhand der

Bakterienlast im Blut und das Vorliegen einer Sepsis anhand der Parameter arterieller Mitteldruck, Laktatkonzentration im Blut, Ausmaß der Hypothermie und der systemischen Zytokinproduktion beurteilt.

In der vorliegenden Arbeit konnte zwischen SP-A-defizienten und Wildtyp Mäusen weder 24h noch 48h nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* ein Unterschied in der Höhe der Bakterienlast im Blut und somit in der Ausprägung einer Bakteriämie gefunden werden.

Die Arbeitsgruppe von LeVine et al. hat als Maß für die systemische Ausbreitung von Infektionserregern die in der Milz nachgewiesene Bakterienlast herangezogen (39; 41; 42). Während die im Milzhomogenat ermittelten Bakterienlasten 6h nach einer Infektion mit Gruppe B Streptokokken bei SP-A^{-/-} und WT Mäusen gleich waren, konnte SP-A nach Infektion von SP-A^{-/-} und WT Mäusen mit Gruppe B Streptokokken die systemische Ausbreitung der Erreger 24h und 48h nach der Infektion signifikant verringern (39; 42). Dagegen war dieser Effekt nach einer Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* nicht zu beobachten, in dieser Untersuchung berichteten LeVine et al. von ähnlich hohen Bakterienlasten in der Milz bei SP-A^{-/-} und WT Mäusen 6h, 24h und 48h nach Infektion (41).

Bei den Parametern arterieller Mitteldruck, Laktatkonzentration, Hypothermie und systemische Zytokinproduktion, die in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung des Vorliegens einer Pneumokokkensepsis herangezogen wurden, zeigten sich nur in der frühen Phase einer Infektion mit *S. pneumoniae* Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen. Die im Plasma von SP-A^{-/-} Mäusen gemessene Laktatkonzentration war 24h nach der Infektion signifikant höher als bei WT Mäusen. Zu diesem Zeitpunkt war bei den SP-A-defizienten Mäusen zudem eine signifikant stärker ausgeprägte Hypothermie zu beobachten als bei den WT Kontrollen. Allerdings war der Gewichtsverlust bei SP-A^{-/-} Mäusen 24h nach Infektion nicht so stark ausgeprägt wie bei WT Tieren. Die Konzentrationen für den Granulozytenwachstumsfaktor G-CSF und das Chemotaxin MIP-1 α waren im Plasma von SP-A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu denen von Wildtyp Mäusen 24h nach der Infektion mit Pneumokokken signifikant höher. Für die übrigen gemessenen Zytokine ließen sich dagegen 24h nach der Infektion keine Unterschiede zwischen SP-A^{-/-} und WT Mäusen feststellen. Sowohl SP-A^{-/-} als auch WT Mäuse entwickelten 48h nach Infektion mit *S. pneumoniae* eine schwere Sepsis, erkennbar an den stark erhöhten Blutlaktatwerten, der ausgeprägten Hypothermie, der gesteigerten

Zytokinproduktion, dem niedrigen arteriellen Mitteldruck und dem deutlichen Gewichtsverlust. In dieser späteren Phase der Infektion waren allerdings zwischen SP-A-defizienten und Wildtyp Mäusen keine signifikanten Unterschiede messbar. Ein Einfluss von SP-A auf das Sepsisgeschehen im vorliegenden Pneumoniemodell konnte demnach nicht angenommen werden.

6.4 Klinischer Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie

SP-A scheint die Elimination von Pneumokokken zu begünstigen und die Produktion von Entzündungsmediatoren zu reduzieren. Gleichzeitig scheint SP-A keinen Einfluss auf die pulmonale Gewebeerstörung oder den Gasaustausch, die Schrankenstörung oder die Kenngrößen der Atmungsmechanik, bzw. die Ausbildung einer Pneumokokkenbakteriämie und Pneumokokkensepsis zu haben. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ermittelt, welchen Einfluss SP-A auf den klinischen Ausgang der schweren Pneumokokkenpneumonie hat. Die Mortalitätsanalysen nach Infektion mit einer LD50 zeigten einen geringfügig günstigeren Krankheitsverlauf bei Wildtyp Mäusen, die Sterblichkeit erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu SP-A^{-/-} und SP-A^{+/-} Mäusen.

SP-A hat damit keinen Einfluss auf das Gesamtkrankheitsgeschehen bei der schweren Pneumokokkenpneumonie. Somit wäre das Surfactantprotein A kein zentraler Faktor im Rahmen der pulmonalen Immunabwehr gegen Pneumokokken. Andererseits ist es durchaus möglich, dass SP-A-defiziente Mäuse ihren Immundefekt infolge des SP-A Mangels kompensieren können, z.B. durch die Hochregulation anderer Abwehrfaktoren. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher analysiert und wird das Ziel weiterer Untersuchungen sein.

Der Einfluss von SP-A auf den klinischen Verlauf und den Ausgang einer schweren Pneumonie bzw. pulmonalen Inflammation wurde bislang wenig untersucht. In einem Pneumoniemodell mit Influenza A Virus konnte gezeigt werden, dass die mittlere letale Dosis bei SP-A^{-/-} Mäusen signifikant niedriger lag als bei Wildtyp Mäusen (44). In einer anderen Studie zur Untersuchung der ideopathischen Pneumonie nach Knochenmarkstransplantation verbesserte SP-A die Überlebensrate von Mäusen (72). Für andere Infektionsmodelle ist die klinische Bedeutung des SP-A Mangels nicht bekannt.

6.5 Heterozygot SP-A-defiziente (SP-A^{+/-}) Mäuse

Aus Untersuchungen von Korfhagen et al. ist bekannt, dass SP-A^{+/-} Mäuse in Bezug auf Wachstum und Reproduktion keine Unterschiede zu WT Mäusen aufweisen und auch, dass Lungenvolumen und Lungencompliance von gesunden SP-A^{+/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen unverändert sind. Durch Anwendung der Northern Blot Technik konnte bei heterozygot SP-A-defizienten Mäusen eine um etwa die Hälfte reduzierte Menge an SP-A mRNA im Lungenhomogenat im Vergleich zu WT Mäusen festgestellt werden. Auch in immunhistochemischen Analysen mit polyklonalen SP-A Antikörpern war bei SP-A^{+/-} Mäusen weniger SP-A in den Alveolen nachweisbar als bei entsprechenden Wildtyp Kontrollen (34). Nach intratrachealer Gabe von Streptokokken der Gruppe B gab es zwischen heterozygot SP-A-defizienten Mäusen und WT Mäusen keine Unterschiede in der Effizienz der Erregerbeseitigung aus der Lunge (42). Um einen Einfluss der vorhandenen Menge an SP-A auf die klinische Ausprägung und den Ausgang auch bei einer Pneumokokkenpneumonie der Maus ausschließen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit heterozygot SP-A-defiziente Mäuse als zweite Kontrolle neben den Wildtyp Mäusen mitgeführt. In den durchgeführten Experimenten zeigten SP-A^{+/-} Mäuse, ebenso wie in der Studie von LeVine et al. nach Infektion mit Streptokokken der Gruppe B (42), keine Unterschiede zu WT Mäusen. Die Menge an vorhandenem SP-A scheint demnach bei heterozygot SP-A-defizienten Mäusen ausreichend zu sein, um die pulmonale Erregerelimination zu gewährleisten.

6.6 Fazit und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Surfactantprotein A die lokale pulmonale Abwehrleistung unterstützen und die Entzündungsreaktion der Lunge zu modulieren vermochte. Allerdings ließ sich kein Einfluss von SP-A auf das klinische Erscheinungsbild und den Ausgang der schweren Pneumokokkenpneumonie bei der Maus nach intranasaler Infektion mit *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) nachweisen.

Inflammatorische Lungenerkrankungen wie Pneumonien (3; 18) und ARDS (15; 16; 18; 37) sind mit erniedrigten SP-A Spiegeln in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit assoziiert. Anders als beim Atemnotsyndrom der Frühgeborenen (IRDS), das auf einen absoluten Surfactantmangel zurückzuführen ist, handelt es sich beim ARDS in erster Linie um eine

Dysfunktion des pulmonalen Surfactantsystems. Infolge der entzündlichen Veränderungen in den Alveolen kommt es zu einer Schädigung der Typ II Pneumozyten. Dies führt zu Störungen der Surfactantsynthese und Surfactantsekretion, sowie zu einem veränderten Surfactantmetabolismus. Die quantitativen Veränderungen der Surfactantzusammensetzung äußern sich neben einem verminderten Gehalt an SP-A und Phospholipiden auch durch eine herabgesetzte Biofunktion des Surfactantfilms. Inhibitorische Plasmaproteine, wie etwa Albumin oder Fibrinogen, können durch die entzündungsbedingte Schrankenstörung der Lungengefäße in den Alveolarraum gelangen und dort zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der Surfactantaktivität beitragen (15; 16; 18; 37). Der Mangel an SP-A führt zur weiteren Aggravation der Surfactantinhibition (6; 10; 50; 57).

Da in vielen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass SP-A die Elimination verschiedener Erreger in der Lunge verbessern kann, liegt die Überlegung einer therapeutischen Substitution von SP-A bei der Pneumonie nahe. In verschiedenen Pneumoniemodellen wurden SP-A-defiziente bzw. WT Mäuse nach Infektion mit Pathogenen erfolgreich mit exogenem SP-A behandelt. Die Verabreichung von SP-A verbesserte die Erregerbeseitigung bei SP-A^{-/-} Mäusen, die zuvor mit Streptokokken der Gruppe B infiziert wurden, signifikant (42). Auch in einem Pneumoniemodell mit dem Respiratory Syncycial Virus führte die SP-A Gabe bei SP-A^{-/-} Mäusen zu einer beschleunigten Erregerbeseitigung und ebenso zu einer Abnahme der Zellzahl in der BALF im Vergleich zu unbehandelten SP-A^{-/-} Mäusen. Behandelte WT Mäuse wiesen jedoch nie einen Unterschied zur unbehandelten WT Kontrollgruppe auf (40). Da im für die vorliegende Arbeit verwendeten Mausmodell kein Einfluss von SP-A auf den Krankheitsverlauf und den Ausgang der Pneumokokkenpneumonie nachgewiesen werden konnte, wäre ein Einsatz von SP-A als therapeutische Option bei der Pneumokokkenpneumonie eher als fraglich zu betrachten. Allerdings bleibt zu beachten, dass es sich im vorliegenden Fall um ein Tiermodell handelt, in dem ein humanpathogener Erreger bei der Maus eingesetzt wurde, und somit die Ergebnisse sicherlich nicht vollständig auf den Menschen übertragbar sind. Darüber hinaus kann bei dem hier verwendeten *knockout*-Mausmodell nicht ausgeschlossen werden, dass es über nicht bekannte Mechanismen zur Kompensation des SP-A Mangels kommt. Deshalb wäre die Untersuchung der Auswirkungen einer Substitution von SP-A bei der Pneumokokkenpneumonie in Wildtyp Mäusen sinnvoll,

um einen therapeutischen Effekt von Surfactantprotein A bei der Pneumokokkenpneumonie aufdecken zu können.

7 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Surfactantprotein A für die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*Community-acquired Pneumonia*, CAP) stellt eine der häufigsten lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten in Deutschland dar. Der häufigste Erreger einer CAP ist *Streptococcus (S.) pneumoniae*. Bei einem erheblichen Teil der Patienten mit einer Pneumokokkenpneumonie sind schwere Verläufe mit Bakteriämie, septischem Schock und akutem Lungenversagen zu beobachten und diese Patienten versterben häufig trotz adäquater Antibiotikatherapie. Aus Studien ist bekannt, dass Pneumonien mit einem erniedrigten Spiegel des Surfactantproteins A (SP-A) in der bronchoalveolären Lavage assoziiert sind. Darüberhinaus gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass SP-A eine zentrale Komponente im Abwehrsystem der Lunge darstellt. Welche Bedeutung SP-A in vivo im Zusammenhang mit einer Pneumokokkenpneumonie hat, ist bislang jedoch weitgehend unbekannt.

Ziel dieser Dissertation war es deshalb, die Rolle von Surfactantprotein A bei der pulmonalen Abwehr von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) zu analysieren, und die Rolle von SP-A im Zusammenhang mit der Ausbildung von Bakteriämie und Sepsis im Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie näher zu charakterisieren. Dazu wurden in einem Maus-Pneumoniemodell Untersuchungen am Gantztier unter Verwendung von homozygot und heterozygot SP-A-defizienten (SP-A^{-/-} bzw. SP-A^{+/-}) sowie Wildtyp (WT) Mäusen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach der intranasalen Infektion mit *S. pneumoniae* bei SP-A^{-/-} Mäusen höhere Bakterienlasten in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen als bei SP-A^{+/-} und WT Mäusen. Darüberhinaus konnte bei SP-A^{-/-} Mäusen im Vergleich zu SP-A^{+/-} bzw. WT Mäusen eine erhöhte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , des Entzündungsmarkers IL-6 und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, sowie eine gesteigerte Synthese der Chemokine KC, MCP-1 und MIP-1 α und des Wachstumsfaktors G-CSF in der Lunge festgestellt werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte also

gezeigt werden, dass Surfactantprotein A die pulmonale Erregerelimination in der Lunge verbessert und die Synthese von Zytokinen und Chemokinen in der Lunge reduziert. Dagegen waren keine Unterschiede zwischen SP-A^{-/-}, SP-A^{+/-} und WT Mäusen bei der Zahl der in die Lunge rekrutierten neutrophilen Granulozyten oder der Ausdehnung von neutrophilen Infiltraten im histologischen Bild zu ermitteln. Ebenso wenig hatte SP-A einen Einfluss auf die Veränderungen des pulmonalen Gasaustausches oder die Schwere der Schrankenstörungen in der Lunge. SP-A beeinflusste in der vorliegenden Arbeit weder die bakterielle Translokation aus der Lunge in die systemische Zirkulation noch die Ausbildung einer Pneumokokkensepsis, beurteilt anhand der Bakterienlast im Blut bzw. der Parameter arterieller Mitteldruck, Laktatwert im Blut, Ausmaß der Hypothermie und des Verlustes an Körpermasse. Ein Einfluss von Surfactantprotein A auf den klinischen Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Surfactantprotein A im Mausmodell einen Beitrag zur pulmonalen Abwehr von *S. pneumoniae* leisten und die Entzündungsreaktion in der Lunge modulieren kann.

8 Summary

Role of surfactant protein A for the pathogenesis and the clinical outcome of pneumococcal pneumonia

Community-acquired pneumonia (CAP) is one of the most common life-threatening infectious diseases in Germany and *Streptococcus (S.) pneumoniae* is the leading causative pathogen. Significant numbers of patients with pneumococcal pneumonia develop bacteraemia, septic shock, and acute lung injury. These patients often die in spite of adequate antibiotic therapy. It is known that levels of SP-A were decreased in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pneumonia. Several studies indicate a crucial role of SP-A in pulmonary host defense. The role of SP-A in pulmonary host defense against *S. pneumoniae* is largely unknown.

This project intends a detailed analysis of the function of surfactant protein A in the course of the pulmonary immune response against *S. pneumoniae* (Serotyp 3, NCTC 7978), and, furthermore, aims to clarify its role for the transition from compartmentalized pneumonia to bacteraemia and pneumococcal sepsis. Wild type (WT) as well as homozygous (SP-A^{-/-}) and heterozygous (SP-A^{+/-}) gene targeted mice were applied in a mouse model of severe pneumococcal pneumonia.

In this study, SP-A^{-/-} mice challenged with *S. pneumoniae* showed increased bacterial load in bronchoalveolar lavage fluid compared to SP-A^{+/-} and WT mice. Concomitantly, these mice produced lower amounts of inflammatory cytokines in the lung. Thus, SP-A augmented pulmonary host defense but reduced the inflammatory response in the alveolar compartment. However, no differences in total numbers of polymorphonuclear neutrophils in the lung, and no differences in histological signs of pneumonia were found in SP-A^{-/-}, SP-A^{+/-}, and WT mice. SP-A had no impact on pulmonary gas exchange and the emergence of pulmonary edema, and it did not influence the development of bacteraemia and pneumococcal sepsis, judged by means of bacterial load in the systemic circulation and mean arterial blood pressure, lactate levels, hypothermia, and loss of body weight, respectively. Finally we demonstrated that SP-A had no impact on the clinical course of severe pneumococcal pneumonia in mice.

Summary

In essence, these data indicate that surfactant protein A contributes to pulmonary host defense against *S. pneumoniae* and modulates pulmonary inflammation.

9 Literaturverzeichnis

1. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20: 864-874, 1992.
2. **Atochina EN, Beck JM, Preston AM, Haczku A, Tomer Y, Scanlon ST, Fusaro T, Casey J, Hawgood S, Gow AJ and Beers MF.** Enhanced lung injury and delayed clearance of *Pneumocystis carinii* in surfactant protein A-deficient mice: attenuation of cytokine responses and reactive oxygen-nitrogen species. *Infect Immun* 72: 6002-6011, 2004.
3. **Baughman RP, Sternberg RI, Hull W, Buchsbaum JA and Whitsett J.** Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 147: 653-657, 1993.
4. **Bellingan GJ.** The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 57: 540-546, 2002.
5. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A and Spragg R.** The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994.
6. **Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M, Kuroki Y, Howles G, Hui DY and McCormack FX.** Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury. *J Biol Chem* 275: 38848-38855, 2000.
7. **Brinker KG, Garner H and Wright JR.** Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L232-L241, 2003.
8. **Chabot S, Salez L, McCormack FX, Touqui L and Chignard M.** Surfactant protein A inhibits lipopolysaccharide-induced in vivo production of interleukin-10 by

- mononuclear phagocytes during lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 347-353, 2003.
9. **File TM.** Community-acquired pneumonia. *Lancet* 362: 1991-2001, 2003.
 10. **Frerking I, Gunther A, Seeger W and Pison U.** Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med* 27: 1699-1717, 2001.
 11. **Fujiwara T, Maeta H, Chida S, Morita T, Watabe Y and Abe T.** Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1: 55-59, 1980.
 12. **Gardai SJ, Xiao YQ, Dickinson M, Nick JA, Voelker DR, Greene KE and Henson PM.** By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115: 13-23, 2003.
 13. **Georges H, Leroy O, Vandenbussche C, Guery B, Alfandari S, Tronchon L and Beaucaire G.** Epidemiological features and prognosis of severe community-acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 25: 198-206, 1999.
 14. **Gramm HJ, Hannemann L, Reinhart K and Lode H.** [Sepsis: a conception in change. Possibilities and limitations of diagnosis based on clinical criteria]. *Dtsch Med Wochenschr* 120: 498-502, 1995.
 15. **Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, Hull W, Whitsett JA, Akino T, Kuroki Y, Nagae H, Hudson LD and Martin TR.** Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1843-1850, 1999.
 16. **Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA, Whitsett JA, Reed CR, Fowler AA, III, Hudson LD, Maunder RJ, Crim C and Hyers TM.** Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88: 1976-1981, 1991.
 17. **Guillot L, Balloy V, McCormack FX, Golenbock DT, Chignard M and Si-Tahar M.** Cutting edge: the immunostimulatory activity of the lung surfactant protein-A involves Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168: 5989-5992, 2002.
 18. **Gunther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, Temmesfeld B, Walmrath D, Morr H and Seeger W.** Surfactant alterations in severe

- pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 176-184, 1996.
19. **Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE and Ullmann U.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer Verlag* 4. Auflage: 223-228, 2001.
 20. **Hartshorn KL, Crouch E, White MR, Colamussi ML, Kakkanatt A, Tauber B, Shepherd V and Sastry KN.** Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria. *Am J Physiol* 274: L958-L969, 1998.
 21. **Hermans C and Bernard A.** Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 646-678, 1999.
 22. **Hickling TP, Clark H, Malhotra R and Sim RB.** Collectins and their role in lung immunity. *J Leukoc Biol* 75: 27-33, 2004.
 23. **Hickling TP, Sim RB and Malhotra R.** Induction of TNF-alpha release from human buffy coat cells by *Pseudomonas aeruginosa* is reduced by lung surfactant protein A. *FEBS Lett* 437: 65-69, 1998.
 24. **Hickman-Davis J, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR and Matalon S.** Surfactant protein A mediates mycoplasmacidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4953-4958, 1999.
 25. **Hickman-Davis JM, Fang FC, Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR and Wright JR.** Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L517-L523, 2001.
 26. **Hickman-Davis JM, Gibbs-Erwin J, Lindsey JR and Matalon S.** Role of surfactant protein-A in nitric oxide production and mycoplasma killing in congenic C57BL/6 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 319-325, 2004.
 27. **Ikegami M, Korfhagen TR, Bruno MD, Whitsett JA and Jobe AH.** Surfactant metabolism in surfactant protein A-deficient mice. *Am J Physiol* 272: L479-L485, 1997.
 28. **Ikegami M, Korfhagen TR, Whitsett JA, Bruno MD, Wert SE, Wada K and Jobe AH.** Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol* 275: L247-L254, 1998.

29. **Janeway CA, Travers P, Walport M and Shlomchik M.** Immunologie. *Spektrum Lehrbuch* 5. Auflage: 3-36, 2002.
30. **Janeway CA, Travers P, Walport M and Shlomchik M.** Immunologie. *Spektrum Lehrbuch* 5. Auflage: 74-77, 2002.
31. **Kadioglu A and Andrew PW.** The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol* 25: 143-149, 2004.
32. **Kankavi O.** Immunodetection of surfactant proteins in human organ of Corti, Eustachian tube and kidney. *Acta Biochim Pol* 50: 1057-1064, 2003.
33. **Khubchandani KR and Snyder JM.** Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *FASEB J* 15: 59-69, 2001.
34. **Korfhagen TR, Bruno MD, Ross GF, Huelsman KM, Ikegami M, Jobe AH, Wert SE, Stripp BR, Morris RE, Glasser SW, Bachurski CJ, Iwamoto HS and Whitsett JA.** Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9594-9599, 1996.
35. **Korfhagen TR, LeVine AM and Whitsett JA.** Surfactant protein A (SP-A) gene targeted mice. *Biochim Biophys Acta* 1408: 296-302, 1998.
36. **Koziel H, Phelps DS, Fishman JA, Armstrong MY, Richards FF and Rose RM.** Surfactant protein-A reduces binding and phagocytosis of pneumocystis carinii by human alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 834-843, 1998.
37. **Kuroki Y, Takahashi H, Chiba H and Akino T.** Surfactant proteins A and D: disease markers. *Biochim Biophys Acta* 1408: 334-345, 1998.
38. **Kuronuma K, Sano H, Kato K, Kudo K, Hyakushima N, Yokota S, Takahashi H, Fujii N, Suzuki H, Kodama T, Abe S and Kuroki Y.** Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of Streptococcus pneumoniae by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A. *J Biol Chem* 279: 21421-21430, 2004.
39. **LeVine AM, Bruno MD, Huelsman KM, Ross GF, Whitsett JA and Korfhagen TR.** Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 158: 4336-4340, 1997.

40. **LeVine AM, Gwozdz J, Stark J, Bruno M, Whitsett J and Korfhagen T.** Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest* 103: 1015-1021, 1999.
41. **LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA and Korfhagen TR.** Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19: 700-708, 1998.
42. **LeVine AM, Kurak KE, Wright JR, Watford WT, Bruno MD, Ross GF, Whitsett JA and Korfhagen TR.** Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 279-286, 1999.
43. **LeVine AM, Whitsett JA, Gwozdz JA, Richardson TR, Fisher JH, Burhans MS and Korfhagen TR.** Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol* 165: 3934-3940, 2000.
44. **Li G, Siddiqui J, Hendry M, Akiyama J, Edmondson J, Brown C, Allen L, Levitt S, Poulain F and Hawgood S.** Surfactant protein-A--deficient mice display an exaggerated early inflammatory response to a beta-resistant strain of influenza A virus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 277-282, 2002.
45. **Linke M, Ashbaugh A, Koch J, Tanaka R and Walzer P.** Surfactant protein A limits *Pneumocystis murina* infection in immunosuppressed C3H/HeN mice and modulates host response during infection. *Microbes Infect* 7: 748-759, 2005.
46. **Linke M, Ashbaugh A, Koch J, Tanaka R and Walzer P.** Efficient resolution of *Pneumocystis murina* infection in surfactant protein A-deficient mice following withdrawal of corticosteroid-induced immunosuppression. *J Med Microbiol* 55: 143-147, 2006.
47. **Linke MJ, Harris CE, Korfhagen TR, McCormack FX, Ashbaugh AD, Steele P, Whitsett JA and Walzer PD.** Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis* 183: 943-952, 2001.

48. **Luo JM, Wan YS, Liu ZQ, Wang GR, Floros J and Zhou HH.** Regularity of distribution of immunoreactive pulmonary surfactant protein A in rat tissues. *Int J Mol Med* 14: 343-351, 2004.
49. **Madan T, Reid KB, Singh M, Sarma PU and Kishore U.** Susceptibility of mice genetically deficient in the surfactant protein (SP)-A or SP-D gene to pulmonary hypersensitivity induced by antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol* 174: 6943-6954, 2005.
50. **McCormack FX and Whitsett JA.** The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 109: 707-712, 2002.
51. **McIntosh JC, Mervin-Blake S, Conner E and Wright JR.** Surfactant protein A protects growing cells and reduces TNF-alpha activity from LPS-stimulated macrophages. *Am J Physiol* 271: L310-L319, 1996.
52. **McNeely TB and Coonrod JD.** Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *J Infect Dis* 167: 91-97, 1993.
53. **Pasula R, Wright JR, Kachel DL and Martin WJ.** Surfactant protein A suppresses reactive nitrogen intermediates by alveolar macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 103: 483-490, 1999.
54. **Pletz MWR.** Ambulant erworbene Pneumonie. *Pneumologe* 2: 17-27, 2005.
55. **Post A, Nahmen AV, Schmitt M, Ruths J, Riegler H, Sieber M and Galla HJ.** Pulmonary surfactant protein C containing lipid films at the air-water interface as a model for the surface of lung alveoli. *Mol Membr Biol* 12: 93-99, 1995.
56. **Rosseau S, Hammerl P, Maus U, Gunther A, Seeger W, Grimminger F and Lohmeyer J.** Surfactant protein A down-regulates proinflammatory cytokine production evoked by *Candida albicans* in human alveolar macrophages and monocytes. *J Immunol* 163: 4495-4502, 1999.
57. **Rustow B, Haupt R, Stevens PA and Kunze D.** Type II pneumocytes secrete vitamin E together with surfactant lipids. *Am J Physiol* 265: L133-L139, 1993.

58. **Sano H, Sohma H, Muta T, Nomura S, Voelker DR and Kuroki Y.** Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol* 163: 387-395, 1999.
59. **Sato M, Sano H, Iwaki D, Kudo K, Konishi M, Takahashi H, Takahashi T, Imaizumi H, Asai Y and Kuroki Y.** Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 171: 417-425, 2003.
60. **Shepherd VL.** Distinct roles for lung collectins in pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 257-260, 2002.
61. **Stamme C, Walsh E and Wright JR.** Surfactant protein A differentially regulates IFN-gamma- and LPS-induced nitrite production by rat alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 772-779, 2000.
62. **Trapnell BC and Whitsett JA.** Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64: 775-802, 2002.
63. **van Rozendaal BA, van Golde LM and Haagsman HP.** Localization and functions of SP-A and SP-D at mucosal surfaces. *Pediatr Pathol Mol Med* 20: 319-339, 2001.
64. **Ware LB and Matthay MA.** The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000.
65. **Weikert LF, Lopez JP, Abdolrasulnia R, Chroneos ZC and Shepherd VL.** Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L216-L223, 2000.
66. **Welte T, Marre R and Suttorp N.** [CAPNet--network of competence for community acquired pneumonia: structures and aims]. *Pneumologie* 57: 34-41, 2003.
67. **Weyer C, Sabat R, Wissel H, Kruger DH, Stevens PA and Prosch S.** Surfactant protein A binding to cytomegalovirus proteins enhances virus entry into rat lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23: 71-78, 2000.
68. **Wright JR.** Host defense functions of pulmonary surfactant. *Biol Neonate* 85: 326-332, 2004.

69. **Wright JR.** Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5: 58-68, 2005.
70. **Wright JR and Youmans DC.** Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol* 264: L338-L344, 1993.
71. **Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, Kim KS and McCormack FX.** Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* 111: 1589-1602, 2003.
72. **Yang S, Milla C, Panoskaltsis-Mortari A, Hawgood S, Blazar BR and Haddad IY.** Surfactant protein A decreases lung injury and mortality after murine marrow transplantation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27: 297-305, 2002.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Dies gilt besonders für:

Herrn Prof. Dr. N. Suttorp, Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die Möglichkeit, meine Dissertation im Forschungslabor Charité Campus Mitte anfertigen zu können.

Frau Dr. S. Rosseau, Leiterin des Forschungslabors Charité Campus Mitte, für ihre engagierte Betreuung während der gesamten Arbeit und die stetige Unterstützung bei fachlichen und experimentellen Problemen.

Herrn Prof. Dr. L. Wieler, Leiter des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, für die Übernahme der veterinärmedizinischen Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit der Einreichung der Dissertation über sein Institut.

Herrn Dr. T. Tschernig von der Medizinischen Hochschule Hannover für die Anfertigung und Auswertung der histologischen Schnitte.

Mein besonderer Dank gilt Frau J. Thiele für die tolle Unterstützung bei sämtlichen Laborarbeiten und für die „Schulter zum Ausweinen“, wenn es mal wieder so gar nicht laufen wollte.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Laborkollegen/innen für das stets fröhliche Arbeitsklima, und v.a. Sandra Lüke und Birgitt Gutbier für die Einarbeitung. Herrn Dr. M. Witzenrath danke ich für die Tipps und Tricks bei den Präparationen.

Ein ganz großes Dankeschön auch an meine Mutter für die uneingeschränkte Unterstützung meiner Ausbildung und an meine Freundin Heike, die schon während meines Studiums und

Danksagung

später während der Dissertation tapfer alle Stimmungshöhen und -tiefen mitgemacht hat...ich danke Euch!

Selbstständigkeitserklärung

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 17.09.2007

Maren-Verena Zemlin