

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

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Pulmonale Immunstimulation mit Lipopeptid MALP-2: Einfluss auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie in der Maus

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

vorgelegt von
Katrin Reppe
Tierärztin
aus Räckelwitz

Berlin 2010
Journal-Nr.: 3377

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Norbert Suttorp
Dritter Gutachter: PD Dr. Dr. Petra Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, lungs, respiratory diseases, streptococcus pneumoniae,
immunostimulation, toll-like receptor 2 (MeSH)

Tag der Promotion: 31.05.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86664-823-4

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für meine Eltern und meine Schwester

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Literaturübersicht	9
2.1 Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen	9
2.2 Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken)	11
2.3 Die Lunge	13
2.3.1 Anatomie der Lunge	13
2.3.2 Die Immunabwehr der Lunge	16
2.4 Die Bedeutung des <i>toll-like</i> Rezeptor-2 in der Pneumokokkeninfektion	20
2.5 Die Stimulation der lokalen Immunabwehr bei Pneumonie und Sepsis	21
2.6 Das synthetische MALP-2	23
2.6.1 Struktur	23
2.6.2 Rezeptor und Signaltransduktion	23
2.6.3 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Eigenschaften	25
3. Material und Methoden	29
3.1 Studiendesign	29
3.2 Versuchstiere	31
3.3 Tierhaltung	31
3.4 MALP-2	31
3.5 Applikation des MALP-2	32
3.6 Anzucht von <i>S. pneumoniae</i>	33
3.6.1 Vorbereitung	33
3.6.2 Bakterien	33
3.6.3 Anzucht	33
3.7 Infektion der Tiere	34
3.8 Präparation der Tiere und Probenentnahme	35
3.8.1 Präparation	35
3.8.2 Durchführung der Blutentnahme	37
3.8.3 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL)	37
3.8.4 Entnahme der Lunge	37
3.9 Differenzierung der Leukozyten in der BALF und im Blut	37
3.9.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozyten in der BALF	37
3.9.2 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozyten im Blut	39
3.10 Quantifizierung der Zytokine in der BALF	39
3.11 Untersuchung der Genexpression des TLR-2	40
3.11.1 Zellen	41
3.11.2 Kultivierung und Stimulierung der A549-Zellen	41
3.11.3 Isolierung der RNA von stimulierten A549-Zellen	41
3.11.4 Isolierung der RNA aus Mauslungen	42

Inhaltsverzeichnis

3.11.5	Reverse Transkription	42
3.11.6	Quantitative PCR.....	43
3.11.7	Western Blot-Analyse von Mauslungen und A549-Zellen	44
3.12	Untersuchung des klinischen Verlaufes der Pneumokokkenpneumonie	45
3.13	Bestimmung der Bakterienlast in Lunge und Blut	46
3.13.1	Bakterienlast der Lunge	46
3.13.2	Bakterienlast im Blut.....	47
3.14	Immunhistochemischer Nachweis von <i>S. pneumoniae</i> in der Mauslunge.....	47
3.15	Statistik	48
4.	Ergebnisse	50
4.1	MALP-2 bewirkt die Rekrutierung von Leukozyten in die Mauslunge	50
4.2	MALP-2 stimuliert sowohl die Leukozytenrekrutierung als auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in den bronchoalveolären Raum in Abhängigkeit von TLR-2.51	
4.3	Die lokale MALP-2-Applikation stimuliert die Genexpression von TLR-2 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	54
4.4	Die lokale MALP-2-Applikation verbessert die Überlebenschance bei muriner <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie dosisabhängig.....	58
4.5	MALP-2 erhöht den Einstrom von Entzündungszellen in die infizierte Lunge.....	63
4.6	MALP-2 modifiziert die Produktion von Entzündungsmediatoren in der Lunge im Verlauf der <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie	65
4.7	MALP-2 modifiziert die Verteilung von <i>S. pneumoniae</i> in der Mauslunge.....	68
4.8	MALP-2 reduziert die bakterielle Translokation ins Blut ohne Veränderung der systemischen zellulären Immunantwort.....	70
5.	Diskussion	72
5.1	MALP-2 stimuliert eine lokale Entzündungsreaktion in der Lunge in Abhängigkeit von TLR-2.....	73
5.2	MALP-2 stimuliert die Genexpression des TLR-2.....	75
5.3	MALP-2 verbessert den klinischen Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie	77
5.4	MALP-2 modifiziert die pulmonale Entzündungsreaktion in der Pneumonie.....	79
5.5	MALP-2 verbessert die pulmonale Abwehr von <i>S. pneumoniae</i>	81
5.6	MALP-2 reduziert die Bakteriämie im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie.....	82
5.7	Ausblick	83
6.	Zusammenfassung	85
7.	Summary	87
8.	Literaturverzeichnis	89
9.	Anhang	101
9.1	Material	101
9.2	Abkürzungsverzeichnis.....	107

Inhaltsverzeichnis

9.3 Tabellenverzeichnis	111
9.4 Abbildungsverzeichnis.....	112
Danksagung	113
Selbstständigkeitserklärung.....	115

1. Einleitung

Die ambulant erworbene Pneumonie (AEP; *community acquired pneumonia* = CAP) ist eine der häufigsten lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten in den Industrieländern. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 800.000 Menschen an einer AEP, wobei etwa jeder Dritte stationär behandelt werden muss. Die AEP ist vorrangig bakteriell bedingt mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) als häufigstem Erreger (40; 96). Eine inadäquate Immunantwort, hervorgerufen durch akute oder chronische Primärerkrankungen (21; 30; 87), eine lebensrettende Langzeitbeatmung (59) oder Sepsis-assoziierte Immunparalyse (88) erhöht das Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken. Die Mortalität kann in Abhängigkeit von der Komorbidität bis auf 20 % ansteigen (40). Spezifische Strategien zur Stärkung der pulmonalen Immunabwehr sind allerdings kaum vorhanden. *In vivo* Studien zeigten, dass eine vorausgehende Stimulation des pulmonalen angeborenen Immunsystems die Abwehr verschiedener experimenteller Infektionen der Lunge verbessern konnte. So aktivierte ein Lysat von *Haemophilus influenzae* die unspezifische Immunantwort in der Lunge und verhinderte somit den letalen Verlauf der nachfolgenden murinen Pneumokokkenpneumonie (7). Darüber hinaus aktivierten der Toll-like Rezeptor (TLR-) 4 Agonist LPS (17; 43) sowie der TLR-9 Agonist CpG-ODN (14), eine protektive Immunantwort gegenüber nachfolgenden Lungeninfektionen. Die Stimulation einer pulmonalen unspezifischen Immunantwort vor einer Infektion könnte daher eine vielversprechende Strategie zur Reduktion der Mortalität der Pneumonie darstellen.

Die *pattern recognition receptors* (PRRs), insbesondere die *toll-like* Rezeptoren (TLRs) spielen in den unteren Atemwegen bei der Induktion einer unspezifischen Immunantwort eine zentrale Rolle. TLRs erkennen nach Eindringen von Bakterien in die unteren Atemwege sogenannte *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs) der Erreger und initiieren die Freisetzung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren mit nachfolgender Aktivierung einer lokalen und systemischen Immunantwort. Bisher sind 11 Vertreter der TLR-Familie bekannt. TLR-2 erkennt davon bislang das breiteste Spektrum mikrobieller Komponenten. Dazu zählen u.a. Peptidoglykane und Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien, wie auch Lipoproteine und Lipopeptide zahlreicher Erreger (67). Ferner ist TLR-2 bei der Pneumokokkenpneumonie an der Induktion einer frühen Immunantwort beteiligt (15;

50; 52; 55), und *S. pneumoniae* steigerte die Genexpression des TLR-2 sowohl *in vitro* (98) als auch *in vivo* (52).

Das synthetische Lipopeptid MALP-2 (*macrophage-activating lipopeptide of 2kDa*) ist ein Agonist des Rezeptorheterodimeres bestehend aus TLR-2 (104) und TLR-6 (105). Es wurde ursprünglich aus *Mycoplasma fermentans* isoliert (74). MALP-2 induziert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α , MIP-1 α und MCP-1 in Monozyten (48). *In vivo* Studien zeigten, dass MALP-2 eine Rekrutierung von Leukozyten lokal im murinen peritonealen Raum (12) sowie in der Rattenlunge (60) stimulierte. Die lokale Vorbehandlung mit MALP-2 bei der polymikrobiellen Peritonitis der Maus erhöhte ferner den Leukozyteneinstrom in die Bauchhöhle und verbesserte die Erregerelimination und den klinischen Verlauf der akuten polymikrobiellen Sepsis (19).

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es daher, den Einfluss einer TLR-2-spezifischen pulmonalen Immunstimulation mit MALP-2 auf den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen. Dabei wurde zunächst die Auswirkung von MALP-2 auf das angeborene Immunsystem der Lunge anhand von *in vivo* und *in vitro* Methoden analysiert. In weiteren experimentellen Untersuchungen erfolgte die intratracheale Applikation von MALP-2 und 24 h später die Induktion der Pneumokokkenpneumonie. Nachfolgend wurde die lokale Entzündungsreaktion hinsichtlich der Zytokinfreisetzung und der Leukozytenrekrutierung beurteilt, sowie die Erregerelimination und der klinische Verlauf der Pneumokokkenpneumonie im *in vivo* Mausmodell untersucht.

2. Literaturübersicht

2.1 Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen

Die Pneumonie ist die häufigste Todesursache in den Industrieländern (96). Dem Begriff der ambulant erworbenen Pneumonie (AEP; *engl.*: community-acquired pneumonia – CAP) wird jede Lungenentzündung eines immunkompetenten humanen Patienten zugeordnet, deren Erreger im privaten oder beruflichen Umfeld erworben oder die innerhalb der ersten 48 h eines Krankenhausaufenthaltes erstmals diagnostiziert wurde. Die AEP ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Infektionskrankheit. In Deutschland erkranken jährlich etwa 800 000 Menschen an einer ambulant erworbenen Pneumonie, wobei etwa jeder Dritte stationär behandelt werden muss. Die Mortalität kann je nach Lebensalter und Komorbidität bis auf 20 % ansteigen (40). Über 90 % der ambulant erworbenen Pneumonien des Menschen entstehen durch einen Abstieg von Mikroorganismen aus dem Oropharynx in den unteren Respirationstrakt. Aber auch eine Aspiration kleiner Sekretmengen aus dem Oropharynx, die Inhalation der Erreger, vor allem von Viren, die Verbreitung von Mikroorganismen entlang muköser Membranen oder über das Blut sowie der Übertritt von Erregern aus benachbarten Geweben auf die Lunge sind mögliche Infektionswege. Aufgrund der physiologischen Abwehrmechanismen der Lunge (Abschnitt 2.3.2) bedingen die in den unteren Respirationstrakt gelangten Mikroorganismen meist keine klinischen Folgen. Veränderungen der anatomischen Barrieren, ein geschwächtes Immunsystem, hoch virulente Erreger oder große Mengen an Inokulum führen jedoch zur Infektion der Lunge und damit zur Entstehung der ambulant erworbenen Pneumonie (21). Risikofaktoren wie chronisch-obstruktive Atemwegserkrankungen, ein geringes (< 6 Lebensjahre) (21) oder höheres Lebensalter (> 65 Lebensjahre), Rauchen, Herzinsuffizienz, chronische Leber- und Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus oder eine vorausgegangene Influenzainfektion prädisponieren für die Entstehung der ambulant erworbenen Pneumonie. Auch Bewusstseinsstörungen oder Beeinträchtigungen des Schluckaktes begünstigen die Aspiration kleiner Sekretmengen (40). Die ambulant erworbene Pneumonie des Menschen wird zu über 90 % durch Bakterien, hauptsächlich *Streptococcus pneumoniae* (25-45 %), *Haemophilus influenzae* (10-20 %) und *Mycoplasma pneumoniae* (10-12 %) verursacht. Auch *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* und GRAM-negative Erreger wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* können u.a. eine AEP verursachen.

Viren (Influenzaviren, RSV, Adeno- oder Coronaviren) werden bei der ambulant erworbenen Pneumonie des Menschen ebenfalls isoliert, jedoch in 10-25 % der Fälle in Verbindung mit einem Bakteriennachweis. Bei 40-60 % der AEP ist ein spezifischer Erregernachweis nicht möglich (40).

Streptococcus pneumoniae ist die häufigste Ursache der ambulant erworbenen Pneumonie des Menschen (27; 86). Jährlich sterben in Deutschland 4000-8000 Menschen an invasiven Pneumokokkeninfektionen, wobei der Hauptteil mit mehreren Tausend Sterbefällen auf eine durch *S. pneumoniae* bedingte Pneumonie (Pneumokokkenpneumonie) zurückzuführen ist (94). Die Pneumokokkenpneumonie ist eine meist lobär begrenzte Pneumonie. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf kann beim Menschen jedoch eine Begleitpleuritis mit nachfolgendem Pleuraerguss oder ein Pleuraempyem infolge eines Übertrittes der Infektion auf parapneumonische Bereiche entstehen. Die Ausbreitung der Pneumonie auf die gesamte Lunge kann zur Ausbildung eines akuten Lungenversagens (*acute lung injury*, ALI) bis hin zu einem Akuten Respiratorischen Distress Syndrom (ARDS) führen. Die hämatogene Aussaat der Erreger (Bakteriämie) kann eine pneumogene Sepsis mit Ausbildung eines ARDS oder Multiorganversagen sowie die Entstehung septischer Streuherde nach sich ziehen. Als weitere extrapulmonale Komplikationen sind ZNS-Beteiligung, Endokarditis, Perikarditis oder hämolytische Anämie zu nennen. Folglich erhöht sich die Letalitätsrate einer Pneumokokkenpneumonie mit zunehmender Progredienz des Krankheitsverlaufes (40).

Die Induktion der spezifischen Immunität gegen Infektionen mit *S. pneumoniae* des Menschen ist eine wichtige präventive Maßnahme, um die Inzidenz und Morbidität invasiver Pneumokokkenerkrankungen und die damit verbundenen Folgen zu reduzieren. Zurzeit stehen in Deutschland zwei verschiedene Impfstoffe, welche Kapselantigene der häufigsten pathogenen Serotypen von *S. pneumoniae* enthalten, zur Verfügung. Der 23-valente Polysaccharidimpfstoff (nicht-konjugiert) wird zur generellen Immunisierung von Personen >60 Jahre sowie zur Impfung von Kindern >2 Jahren, Jugendlichen und Erwachsenen, die eine Prädisposition für invasive Pneumokokkenerkrankungen aufweisen, empfohlen. Weiterhin ist eine heptavalente konjugierte Polysaccharidvakzine zur generellen Immunisierung von Kindern im Alter von 2 bis 24 Monaten in Deutschland zugelassen, welche Kapselantigene der häufigsten speziell bei dieser Altersgruppe isolierten pathogenen Serotypen (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) von *S. pneumoniae* enthält. Allgemein bleibt jedoch

zu bedenken, dass gerade immunsupprimierte Menschen, die von einer Impfung profitieren würden, meist eine ungenügende spezifische Immunantwort entwickeln (75; 94; 95).

Zur kausalen Therapie bakteriell bedingter Pneumonien des Menschen werden antimikrobiell wirksame Substanzen, vor allem β -Laktame, Makrolide, Tetrazykline und Fluorochinolone verwendet. Die Antibiotikabehandlung erfolgt hauptsächlich empirisch, da der spezifische Nachweis des kausalen Erregers bei nur 30-60 % der AEP-Patienten möglich ist (86). Der Erregernachweis und dessen Resistenztestung sollte jedoch in jedem Fall versucht werden, da die Resistenz von *S. pneumoniae* und anderer bakterieller Erreger gegenüber diverser Antibiotika in den letzten Jahren weltweit rapide zunahm. So sind zwar in Deutschland bisher nur 5,8 % (2000) der Isolate von *S. pneumoniae* unempfindlich (intermediär + resistent) gegenüber Penicillin (90), in anderen Ländern wie Frankreich oder Spanien beträgt die Penicillinresistenz jedoch bereits 47,6 % bzw. 61,9 % (91). Eine ernstzunehmende Entwicklung ist auch bei der Empfindlichkeit von *S. pneumoniae* gegenüber Makroliden zu beobachten. Insbesondere die Erythromycin-Resistenz in Deutschland stieg von 1992 bis zum Jahr 2000 von 3,0 % auf 15,3 % (90; 91). In Italien und Frankreich zeigen sogar mehr als 40 % der Isolate von *S. pneumoniae* eine Makrolidresistenz (91). Auch Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen, Fluorochinolonen und Cephalosporinen werden beschrieben (85; 86). Aufgrund der gestiegenen internationalen Mobilität des Menschen und der zunehmenden Verbreitung multiresistenter Klone, wie zum Beispiel Spain^{23F}-1, ist auch zukünftig mit einer weltweiten Zunahme resistenter Isolate von *S. pneumoniae* zu rechnen (91). Daher ist die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten unerlässlich.

2.2 Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken)

Streptococcus pneumoniae wurde erstmals im Jahre 1881 von Louis Pasteur (Frankreich) und unabhängig etwa zeitgleich von Georg Sternberg (USA) als ein wichtiger Pneumonieerreger des Menschen isoliert. Taxonomisch wird die Spezies *Streptococcus pneumoniae* der Gattung *Streptococcus* innerhalb der Familie der *Streptococcaceae* zugeordnet.

Pneumokokken sind grampositive, ovale bis lanzettförmige Bakterien in meist paariger Anordnung (Diplokokken). Eine Vielzahl der Pneumokokkenstämme bildet eine durch

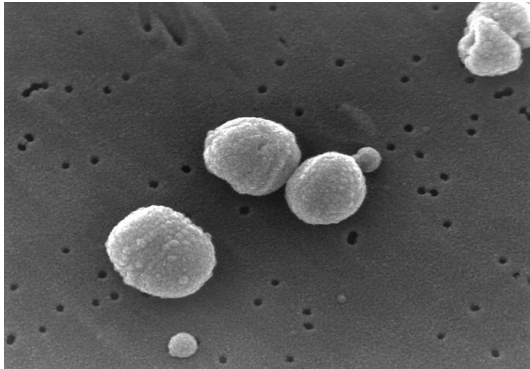


Abbildung 1: *Streptococcus pneumoniae*, einzeln und in paariger Anordnung.

(http://www.hku.hk/respari/images/Streptococcus_pneumoniae.jpg vom 18.11.2008)

Methylenblaufärbung darstellbare Kapsel aus. *S. pneumoniae* unterscheidet sich von anderen Katalase-negativen Streptokokken durch seine Fähigkeit zur α -Hämolyse, Optochinempfindlichkeit und Gallelöslichkeit. Dieser fakultativ anaerob lebende Erreger bevorzugt für sein Wachstum eine 5 %ige CO_2 -Druck. Bekapselte Stämme von *S. pneumoniae* erscheinen auf bluthaltigen Nährböden schleimig-trüb, im Gegensatz zu den transparenten Kolonien unbekapselter Vertreter dieser Spezies. Die Kapsel ist aus Polysacchariden aufgebaut (29; 34; 108). Da *S. pneumoniae* keine zellwandständigen Lancefieldgruppenantigene besitzt, erfolgt die serologische Unterteilung anhand der Antigenstruktur der Kapselpolysaccharide (Dänische Nomenklatur). Demnach sind bisher mehr als 90 verschiedene Serovare von *S. pneumoniae* bekannt, wovon allein 23 für mehr als 90 % der Pneumokokkenerkrankungen des Menschen verantwortlich sind (86). Die Polysaccharidkapsel ist einer der Hauptvirulenzfaktoren von *S. pneumoniae*. Sie verhindert die Opsonierung des Erregers durch Komplement und wirkt somit anti-phagozytär (46). Bei enger Interaktion mit Epithel- oder Endothelzellen der Lunge erfolgt eine Reduktion der Kapselstärke zur Verbesserung der Adhäsion und Invasion von besagten Zellen. Dieser reversible Prozess wird als genetisch determinierte Phasenvariation bezeichnet (31). Neben Polysaccharidkapsel und Zellwand sind weiterhin verschiedene Oberflächenproteine als wichtige Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* zu nennen. Hierzu zählen u.a. PspA (*pneumococcal surface protein A*), CbpA (*choline-binding protein A*), PsaA (*pneumococcal surface adhesin A*) und Enzyme, wie die Neuraminidasen, Hyaluronsäure und Autolysine. Pneumolysin, ein intrazellulär gelagertes Exotoxin, wird von allen klinisch relevanten Isolaten

von *S. pneumoniae* produziert und nach Autolyse der Bakterienwand freigesetzt. Es wirkt zytotoxisch und vermindert den Zilienschlag von Bronchialepithelzellen (44). Pneumolysin schädigt die endo-epitheliale Barriere der Lunge, indem es die interzellulären Kontaktflächen (*tight junctions*) zerstört und somit Flüssigkeit aus dem Blut in das Lungeninterstitium übertreten kann (118). In subzytolytischen Konzentrationen aktiviert es das Komplementsystem und TLR-4 (64), und induziert zahlreiche Entzündungsmediatoren. Pneumolysin wirkt demnach auch proinflammatorisch (9; 69).

S. pneumoniae gehört zur physiologischen Flora des menschlichen Nasen-Rachen-Raumes und kolonisiert den Nasopharynx bei etwa 50 % aller Kinder und 8 % der Erwachsenen (86). Dort kann das Bakterium / der Erreger bis zu sechs Monate persistieren (75). Bei engem Kontakt kommt es, meist durch Tröpfcheninfektion, zur Übertragung des Erregers von Mensch zu Mensch. Durch Mikroaspiration oder direkte Invasion gelangt der Erreger in den unteren Respirationstrakt und eine Infektion kann entstehen (86), begünstigt durch Störungen der lokalen oder systemischen Abwehrmechanismen (94). Die Inzidenz der Pneumokokkeninfektionen steigt bei Kindern <5 Jahren und älteren Erwachsenen >70 Jahren deutlich (95). Neben Pneumonien verursacht *S. pneumoniae* beim Menschen weiterhin Sinusitis, Otitis media und Meningitis (86).

2.3 Die Lunge

2.3.1 Anatomie der Lunge

Die Lunge ist ein Bestandteil des Atmungsapparates. Die Atemluft gelangt durch die Atembewegungen von Thoraxwand und Zwerchfell über Nasenhöhle, Rachen, Kehlkopf und Luftröhre in das Bronchialsystem der Lunge und wieder nach außen. In der Lunge wird durch Diffusion Sauerstoff aus der Atemluft aufgenommen und Kohlendioxid an die Atemluft abgegeben. Somit dient die Lunge dem Gasaustausch. Im Folgenden wird der makroskopische und mikroskopische Aufbau der Lunge allgemein kurz dargestellt. Auf speziesspezifische Unterschiede zwischen Mensch und Maus wird in besonderen Fällen hingewiesen.

Makroskopischer Aufbau der Lunge

Die rechte und linke Lunge (*Pulmo dexter und sinister*) besteht jeweils aus den Aufzweigungen des Bronchialbaumes, dem eigentlichen Lungenparenchym und Interstitialgewebe. Das Lungenparenchym umfasst dabei alle Alveolen-tragenden Bronchiolen und deren Aufzweigungen bis hin zu den Lungenbläschen (Alveolen).

Die Lunge ist aus Lappen (*Lobi*) aufgebaut. Beim Menschen besteht die rechte Lunge aus drei Lappen und die linke Lunge aus nur zwei Lappen. Die rechte Lunge kann weiterhin in zehn, die linke Lunge in neun Lungensegmente (*Segmenta bronchopulmonalia*) unterteilt werden. Bei der Maus ist die rechte Lunge im Unterschied zum Menschen in vier Lappen (einen oberen, mittleren, unteren und infrakardialen Lappen) gegliedert, wohingegen die linke Lunge nur einen Lappen aufweist. Jedes Lungensegment besteht aus mehreren Subsegmenten, welche aus vielen Lungenläppchen (*Lobuli pulmonales*) aufgebaut sind. Diese Lungenläppchen umfassen mehrere Verzweigungsgebiete von terminalen Bronchiolen und sind gegeneinander durch bindegewebige Septen abgetrennt. Die Lunge wird oberflächlich von Pleura überzogen, unterlagert von einer subpleuralen Bindegewebskapsel, welche die interlobären und interlobulären bindegewebigen Septen entlässt. Die Pleura der Maus ist dünner im Vergleich zu der des Menschen. Als Grundlage zur Gliederung des Lungengewebes dienen die Aufzweigungen des Bronchialbaumes (Tabelle 1). Die Verzweigung des humanen Bronchialsystems erfolgt hierbei dichotom im Gegensatz zum monopodialen Aufzweigungsmusters bei der Maus. Die Lunge wird von zwei Gefäßsystemen versorgt. Das funktionelle Gefäßsystem führt der Lunge über den *Truncus pulmonalis* sauerstoffarmes Blut zu und transportiert über die *Venae pulmonales* sauerstoffreiches Blut über das Herz in den Körperkreislauf. Arterielle und venöse *Rami bronchiales* bilden das nutritive Gefäßsystem zur Eigenversorgung der Lunge (41; 72).

Tabelle 1: **Gliederung des Bronchialbaumes.** modifiziert nach (71)

Luftleitendes System:	Aufgabelung der Trachea (Bifurcatio tracheae) Hauptbronchien (Bronchus principalis dexter et sinister) Lappenbronchien (Bronchi lobares) Segmentbronchien (Bronchi segmentales) Lungenläppchen (Bronchi lobulares, Bronchioli) Terminale Bronchiolen (Bronchioli terminales)
Respiratorisches System:	Respiratorische Bronchiolen (Bronchioli respiratorii) Alveolargänge (Ductus alveolares) Lungenbläschen (Alveoli pulmonis)

Mikroskopischer Aufbau der Lunge

Die Wand der luftleitenden Wege gliedert sich in die *Tunica mucosa* (Schleimhaut), *Tunica fibromusculocartilaginea* und *Tunica adventitia*. Die Schleimhaut besteht aus einem respiratorischen Epithel mit Flimmerepithelzellen, Basalzellen und Intermediärzellen, durchsetzt mit Becherzellen, Bürstensaumzellen, endokrinen Zellen und Clara-Zellen. Die *Tunica fibromusculocartilaginea* enthält nach dorsal offene hyaline Knorpelspangen sowie seromuköse Drüsen und glatte Muskelzellen. Die Knorpelspangen sind im Verlauf der Bronchialaufzweigung zunächst zu Knorpelscherben reduziert, die den glatten Muskelzellen außen anliegen (*Tunica muscularis*). In den terminalen Bronchiolen und im nachfolgenden respiratorischen System fehlen die hyalinen Knorpelstrukturen. Bei der Maus finden sich Knorpelspangen nur im oberen Bereich der Trachea, ihre Ausprägung nimmt im weiteren bronchialen Verlauf jedoch schnell zu Knorpelplatten ab. Bereits in weiten Teilen der murinen *Bronchi lobares* fehlen die hyalinen Strukturen gänzlich. Seromuköse Drüsen sind bei der Maus nur im Bereich der Bifurkation der Luftröhre und der Stammbronchien zu finden, im humanen Bronchialbaum jedoch noch bis in die Segmentbronchien verbreitet. Die *Tunica adventitia* umgibt Bronchien und Bronchiolen als peribronchiales Bindegewebe und beinhaltet Nerven und Gefäße. Mit zunehmendem Aufzweigungsgrad nimmt die Wandstärke des Bronchialsystems kontinuierlich ab. Die Alveolargänge (*Ductus alveolares*) weisen nur noch eine dünne Wand bestehend aus einem einreihigen Plattenepithel und ringförmig angelagerten glatten Muskelzellen auf. Mehrere Lungenbläschen gehen von einem Alveolargang ab. Die Wand der Alveolen (*Septum interalveolare*) besteht aus miteinander

vernetzten elastischen und kollagenen Fasern und enthält, neben Fibrozyten, Alveolarmakrophagen, Leukozyten und Mastzellen, ein dichtes Netz von Blutkapillaren. Die Alveolen sind mit einem flachen einreihigen Alveolarepithel ausgekleidet. Dieses besteht aus zwei Zelltypen. Die kleinen Alveolarepithelzellen Typ I (Deckzellen) bedecken den größten Teil der Alveolarwand und sind am Gasaustausch beteiligt. Darüber hinaus ragen große Alveolarepithelzellen Typ II (Nischenzellen) zwischen den Alveolarepithelzellen Typ I heraus. Sie produzieren das Surfactant, einen feinen Phospholipidfilm, der die Alveolarwand überzieht und durch Reduktion der Oberflächenspannung ein Kollabieren der Lungenbläschen verhindert. Im Alveolarlumen befinden sich ferner aus dem Blut ausgewanderte Monozyten, die sich zu Alveolarmakrophagen differenzieren und Antigene, anorganische Stoffe (Staub, Ruß) und Surfactant phagozytieren. Die Alveolen der Mauslunge (80 μm MLI = *mean linear intercept*) sind kleiner als humane Alveolen (210 μm MLI). Die Blut-Luft-Schranke als Ort des Gasaustausches wird gebildet vom Surfactantfilm, den Alveolarepithelzellen, den miteinander verschmolzenen Basalmembranen von Alveolarepithel und Kapillarendothel und den Endothelzellen der Kapillaren. Sie weist in der humanen Lunge eine Dicke von 0,62 μm auf, in der murinen Lunge lediglich 0,32 μm (41; 54; 71; 83).

2.3.2 Die Immunabwehr der Lunge

Die Lunge repräsentiert die größte epitheliale Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Umwelt. Das pulmonale Epithel ist somit permanent Schadstoffen, Allergenen und Infektionserregern der Außenluft ausgesetzt. Verschiedene Abwehrmechanismen dienen der Aufrechterhaltung der Sterilität in den unteren Atemwegen und der Lunge. Dazu gehören die Filtereinrichtungen des Nasopharynx und der oberen Atemwege, Husten- und Niesreflex sowie der Abtransport des Bronchialsekretes durch den Mukoziliarapparat. Partikel und Mikroorganismen mit einer Größe von weniger als 5 μm können jedoch trotzdem bis in den Alveolarraum gelangen. Zur Elimination dieser Pathogene besitzt die Lunge unspezifische angeborene Abwehrmechanismen in Form von residenten Alveolarmakrophagen, Surfactantproteinen (SP-A, SP-D) und Komplement. Die Effektivität dieser primären unspezifischen Immunantwort ist jedoch hauptsächlich von einer erfolgreichen Phagozytoseaktivität der Alveolarmakrophagen abhängig. Andernfalls werden weitere hochkomplexe und gezielt regulierte Reaktionen des Immunsystems aktiv (13).

Das Immunsystem wird unterteilt in unspezifische (angeborene) und spezifische (erworbene) Abwehrmechanismen. Das angeborene Immunsystem umfasst phagozytierende Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), Zellen, die Entzündungsmediatoren freisetzen (Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen) und Natürliche Killerzellen. Darüber hinaus werden molekulare Komponenten in Form von Akute-Phase-Proteinen, Zytokinen, Komplement und antimikrobiellen Produkten (Collectine, Defensine, Lysozyme, Lactoferrin, Cathelicidine) freigesetzt. Das erworbene Immunsystem beinhaltet die Proliferation von B- und T-Lymphozyten infolge Bindung von spezifischen Antigenen an die entsprechenden lymphozytären Oberflächenrezeptoren. Antigenpräsentierende Zellen, wie Makrophagen und Dendritische Zellen, begünstigen die Aktivierung der Lymphozytensubpopulationen durch Antigenpräsentation und Sekretion von Zytokinen. B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen, welche Antigen-spezifische Antikörper produzieren und sezernieren. T-Lymphozyten werden in T-Helferzellen, zytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen unterschieden. T-Helferzellen unterstützen die Produktion von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen. Zytotoxische T-Zellen sind dagegen in der Lage, virusinfizierte Zellen und Tumorzellen direkt abzutöten. Darüber hinaus entwickeln sowohl B- als auch T-Lymphozyten nach Antigenkontakt sogenannte Gedächtniszellen, die nach erneutem Kontakt mit einem spezifischen Antigen eine schnellere Immunantwort ermöglichen. Unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen sind hochgradig miteinander vernetzt und unterliegen einer gezielten Regulation (13; 36; 37).

Unspezifisches Immunsystem

Das unspezifische Immunsystem ist nicht darauf ausgerichtet, jedes einzelne spezifische Antigen zu erkennen. Vielmehr beschränkt es sich auf die Erkennung hochkonservierter genetisch festgelegter Antigenstrukturen, welche einer Gruppe von Mikroorganismen gemein sind. Diese sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Lipoteichonsäure oder Lipoproteine, werden von Rezeptoren des unspezifischen Immunsystems, den *pattern recognition receptors* (PRRs) erkannt. Die PRRs werden von einer Vielzahl von Zellen, einschließlich Makrophagen, Dendritische Zellen, Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert und in drei Klassen eingeteilt. Sezernierte PRRs, wie die Surfactantproteine A und D, LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*) oder MBL (*mannose-binding lectin*), opsonieren Pathogene und begünstigen somit

deren Erkennung. Endozytotische PRRs erscheinen auf der Zelloberfläche von Phagozyten und sind an der Phagozytose beteiligt. Transmembranöse und zytosolische Rezeptoren werden durch die Bindung von PAMPs aktiviert und induzieren über verschiedene Signaltransduktionskaskaden eine Reihe von Genen des Immunsystems, einschließlich der Zytokine-dekodierenden. Die Gruppe der *toll-like* Rezeptoren (TLR) zählt dabei zu den wichtigsten Transmembranrezeptoren in der Pathogenerkennung (13; 67; 70).

Mikroorganismen und andere Pathogene werden von PRRs residenter Alveolarmakrophagen erkannt, phagozytiert und intrazellulär durch reaktive Sauerstoffverbindungen, antimikrobielle Proteine und Lysozyme abgebaut. Kleine Mengen von Immunglobulin G, Collectinen (SP-A, SP-D) und Komplementproteinen sind auch unter physiologischen Bedingungen in der Lunge vorhanden und begünstigen die Phagozytose durch Opsonierung der Mikroorganismen. Erst bei inadäquater Phagozytoseaktivität der Makrophagen wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Epithelzellen werden direkt durch Pathogene oder indirekt durch Zytokine, freigesetzt von aktivierten Makrophagen, zur erhöhten Produktion von antimikrobiellen Stoffen und Entzündungsmediatoren angeregt. Neutrophile Granulozyten wandern aus dem marginalen Pool im kapillären Gefäßbett in das Lungengewebe und die Luftwege ein, phagozytieren Mikroorganismen und töten diese mittels intrazellulären reaktiven Sauerstoffverbindungen, antimikrobiellen Proteinen und degradierenden Enzymen ab. Darüber hinaus werden weitere Monozyten aus dem Blut rekrutiert, welche sich nachfolgend zu Makrophagen differenzieren. Ferner erfolgt die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen, alternativen und Lectin-vermittelten Weg. Die Funktionen des Komplementsystems umfassen neben der Lyse von Bakterien und Zellen die Opsonierung von Fremdpartikeln und die Regulation von Entzündungsvorgängen. Die Rekrutierung von Monozyten, neutrophilen Granulozyten und weiteren Immunzellen in die Lunge erfolgt u.a. durch die Synthese und Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen aus aktivierten Makrophagen und Epithelzellen (13; 37).

Zytokine

In der vorliegenden Studie wurden die Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12p40, IFN γ , GM-CSF, G-CSF, RANTES (CCL5), KC, MCP-1 und MIP-1 α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit gemessen. Aus diesem Grund sollen sie an dieser Stelle kurz erläutert werden:

Zytokine bilden eine Gruppe von sezernierten, jedoch gelegentlich auch membranständigen Proteinen (20-30 kDa). Sie werden von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems, aber auch von einer Vielzahl anderer Zellen des Organismus als Antwort auf mikrobielle Pathogene und andere Antigene produziert und üben ihre biologischen Funktionen nach Bindung an ihren spezifischen Rezeptor aus. Einzelne Zytokine teilen typische Eigenschaften. Diese sogenannte Redundanz des Wirkungsspektrums bewirkt, dass der Ausfall eines Zytokins nicht zwingend mit einem Funktionsverlust einhergehen muss. Die Gesamtheit der Zytokine bildet ein Netzwerk von Signalen, das den Ablauf der Immunabwehr koordiniert. IL-1 β (*interleukin-1 beta*) wird hauptsächlich von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen und Endothelzellen produziert. Es dient der Ausbildung und Steigerung von entzündlichen Reaktionen, indem es in Makrophagen und anderen Zellen die Synthese von weiteren Zytokinen wie IL-6, TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*) und IFN- γ (*interferon gamma*) induziert. Nachfolgend kommt es zur Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, die einerseits gewebeschädigend wirken, andererseits jedoch die Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen auslösen. TNF- α stammt hauptsächlich aus mononukleären Phagozyten und stimuliert, wie auch IL-1 β , in unterschiedlichen Zellen die Synthese weiterer Zytokine. Beide Proteine fördern die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen und somit die Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut. IL-6 wird von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen gebildet und induziert die Differenzierung von Makrophagen. Es stimuliert ferner die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber und das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen. Im Gegensatz dazu besitzt IL-10 immunsuppressive und immunmodulatorische Eigenschaften. IL-10 wird vorrangig von Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten produziert und hemmt neben der Zytokinproduktion auch die zytotoxische und Antigen-präsentierende Aktivität von Makrophagen. IL-12 und IFN- γ werden u.a. von Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet und fördern das Wachstum und die Differenzierung lymphoider Zellen. Die Bildung der Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF erfolgt in Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen. GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) induziert die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Granulozyten und Makrophagen. G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) hingegen stimuliert ausschließlich die Entwicklung und Funktion neutrophiler Granulozyten. Chemokine sind kleine Proteine (8-10 kDa) und bilden eine Untergruppe der Zytokine. Sie vermitteln eine gerichtete Chemotaxis, indem sie die Zellen mit den passenden

Rezeptoren veranlassen, sich entlang eines chemischen Gradienten in Richtung der ursprünglichen Zytokinproduktion zu bewegen. Darüber hinaus stimulieren sie die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und fördern somit den Übertritt von Leukozyten aus dem Blut in das umliegende Gewebe. Die Chemokine MCP-1 (=CCL2), MIP-1 α (=CCL4) und KC (*keratinocyte-derived cytokine*; das murine Homolog zum humanen IL-8) werden von verschiedenen Zellen, wie zum Beispiel Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten sezerniert. MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) und MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*) wirken chemotaktisch auf Monozyten, Lymphozyten, basophile und eosinophile Granulozyten. KC veranlasst hingegen ausschließlich die Auswanderung neutrophiler Granulozyten aus dem Blutkreislauf in das umliegende Gewebe (35). Die Bildung von RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted*; =CCL5) erfolgt durch Epithelzellen (65) und Lymphozyten (35). Als Chemotaxin wirkt es auf Monozyten, Granulozyten und T-Zellen. Darüber hinaus stimuliert es eine Typ1-polarisierte T-Zell-Antwort und fördert die Degranulation von eosinophilen und basophilen Granulozyten (35).

2.4 Die Bedeutung des *toll-like* Rezeptor-2 in der Pneumokokkeninfektion

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind evolutionär konservierte Proteine. Nach Erkennung von PAMPs aktivieren sie lokale und systemische Entzündungsreaktionen, indem sie die Induktion proinflammatorischer Gene vermitteln. Die Familie der TLRs umfasst bei Mensch und Säugetier bisher insgesamt 11 Mitglieder. Jeder TLR bindet eine Reihe strukturell verschiedener Liganden, die oftmals von unterschiedlichen Pathogengruppen stammen. Die nachfolgende Signaltransduktion erfolgt durch Rekrutierung und Aktivierung intrazellulärer Adaptermoleküle und Kinasen und führt zur Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren sowie zur Induktion der Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine (42; 102).

Toll-like Rezeptor-2 (TLR-2) erkennt und bindet eine Reihe von mikrobiellen Komponenten, einschließlich Peptidoglykane und Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid*, LTA) von grampositiven Bakterien sowie Lipoproteine und Lipopeptide unterschiedlicher Erreger. Aber auch Lipoarabinomannan von Mycobakterien, Zymosan von Pilzen oder Lipopolysaccharide (LPS) von Bakterien, die nicht der Gruppe der Enterobakterien angehören, sind im Ligandenspektrum des TLR-2 enthalten (102; 120). TLR-2 wird hauptsächlich von Zellen des

Mononukleär-phagozytierenden Systems (MPS) (22), wie polymorphkernigen Granulozyten (55) und Monozyten/Makrophagen (107), aber auch von weiteren Leukozytenpopulationen (22; 121) und Endothelzellen (18) exprimiert. Darüber hinaus konnte TLR-2 in den Atemwegen des Menschen auf der Oberfläche von oralen Epithelzellen (110), Bronchialepithelzellen (32), Alveolarepithelzellen Typ II (2; 16) und residenten Alveolarmakrophagen (16) nachgewiesen werden. TLR-2 tritt demnach schon in der Initialphase einer Atemwegsinfektion in Kontakt zu den Pathogenen. Dabei führte die Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer erhöhten Expression von TLR-2 mRNA *in vitro* (98) und *in vivo* (52). Auch die TLR-2 Aktivierung durch den synthetisch hergestellten TLR-2-Agonisten MALP-2 stimulierte die Genexpression des TLR-2 in humanen Monozyten (45) und Alveolarmakrophagen der Ratte (61; 101). TLR-2 spielte bei der Kolonisation des murinen Nasopharynx mit *S. pneumoniae* eine entscheidende Rolle für die Erregerelimination (113). Des Weiteren zeigten TLR-2-defiziente Mäuse im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie eine eingeschränkte pulmonale Entzündungsreaktion mit verminderter Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und reduzierter Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge (15; 50). Die Abwesenheit des TLR-2 bei einer experimentellen murinen Pneumokokkenmeningitis ging ferner mit einer erhöhten Bakterienlast des Gehirnes und einem progredienten Krankheitsverlauf einher (52). Eine *in vitro* Studie zeigte, dass TLR-2 an der Phagozytose von *S. pneumoniae* durch murine neutrophile Granulozyten sowie an der oxidativen Abtötung dieser Bakterien beteiligt ist (55). Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass TLR-2 direkt in die antimikrobielle Aktivität von Monozyten und Makrophagen involviert ist (107). TLR-2 hat also eine große Bedeutung für die Induktion der frühen Immunantwort bei Pneumokokkeninfektionen. Somit bietet TLR-2 einen potentiellen Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionsstrategien bei der Pneumokokkeninfektion.

2.5 Die Stimulation der lokalen Immunabwehr bei Pneumonie und Sepsis

Eine inadäquate Immunabwehr, hervorgerufen durch u.a. akute und chronische Primärerkrankungen (21; 30), Langzeitbeatmung (59) oder Sepsis-assoziierte Immunparalyse (21; 88), erhöht das Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken und fördert den progredienten Verlauf einer bereits bestehenden Infektion der Lunge mit Übertritt der Erreger in den Blutkreislauf und Ausbildung einer Sepsis. Einige experimentelle Untersuchungen in

verschiedenen Infektionsmodellen belegen, dass eine gezielte Aktivierung der *toll-like* Rezeptoren im Vorfeld einer Sepsis die lokale unspezifische Immunantwort stimulieren und die Widerstandskraft gegenüber Infektionen erhöhen kann. So stimulierten der TLR-4 Agonist LPS (20) und der TLR-9 Agonist CpG-ODN (*CpG-oligodeoxynucleotide*) (115) sowie die TLR-2-Agonisten MALP-2 und Pam3Cys (*N- α -palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-L-cysteine*) (19) *in vivo* eine erhöhte Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im peritonealen Raum und verbesserten die Erregerelimination und den klinischen Verlauf der akuten polymikrobiellen Sepsis. Die Immunstimulation mit LPS wirkte ferner protektiv bei systemischer *Listeria monocytogenes*-Infektion im Mausmodell (8). Auch in der Lunge war das Konzept der Induktion einer unspezifischen Immunantwort *in vivo* bereits erfolgreich. Die lokale Applikation eines *Haemophilus influenzae*-Lysates aktivierte das angeborene Immunsystem der Lunge und verbesserte den klinischen Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie (7). Eine Immunstimulation unter Verwendung von Hitze-inaktivierten *Escherichia coli* (17) oder einer *Klebsiella pneumoniae*-Mutante (3) verminderte die Erregerlast in nachfolgenden Infektionen. Darüber hinaus bewirkte die lokale Applikation von Lipoteichonsäure (LTA), einem TLR-2-Agonisten, oder LPS *intra-vitam* die Rekrutierung von Leukozyten, vor allem neutrophiler Granulozyten, in die humane Lunge (39). Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die pulmonale Vorbehandlung mit zyklischem di-GMP (*dimeric guanosine monophosphate*) sowie den spezifischen TLR-Agonisten LPS oder CpG-ODN (*CpG-oligodeoxynucleotide*) die Überlebensrate bei der pulmonalen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (14; 47) und *Pseudomonas aeruginosa* (43; 47) erhöhte. Dabei wurde neben einer Rekrutierung von Leukozyten, vorrangig neutrophiler Granulozyten, in die Lunge, zum Teil eine vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, eine erhöhte antimikrobielle Aktivität von Makrophagen sowie eine verminderte endoepitheliale Schrankenstörung in der Lunge beobachtet. In diesen Untersuchungen verursachte die Immunstimulation ferner eine Reduktion der pulmonalen Erregerlast. Die Induktion einer unspezifischen Immunantwort der Lunge vor einer Infektion ist demnach möglicherweise eine vielversprechende Strategie, um das Pneumonierisiko zu senken und dem progredienten Verlauf einer Pneumonie entgegenzuwirken.

2.6 Das synthetische MALP-2

2.6.1 Struktur

MALP-2 (*macrophage-activating lipopeptide of 2 kDa*) wurde unter der allgemeinen Bezeichnung „MDHM“ (*mycoplasma-derived high molecular weight material*) erstmals von Mühlradt et al. aus einem hochproduktiven Klon von *Mycoplasma fermentans* isoliert. Seit 1997 kann das membranständige Molekül jedoch auch synthetisch hergestellt werden. MALP-2 ist ein Lipopeptid mit zwei langkettigen Fettsäuren. Es besitzt eine Molekülmasse von 2 kDa. Im Unterschied zu anderen bakteriellen Lipopeptiden fehlt MALP-2 am N-terminalen Kohlenstoffatom eine dritte kovalent gebundene Fettsäure (74). Die Anwesenheit der zwei ester-gebundenen Fettsäuren und der freien NH₂-Gruppe bilden die Grundvoraussetzung für die biologische Aktivität von MALP-2 (73; 74). Der Lipidteil des Moleküls beinhaltet ein Assymetriezentrum, so dass MALP-2 in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt. Eine vergleichende *in vitro* Untersuchung der synthetisch hergestellten Isomere ergab eine 100fach höhere spezifische Aktivität des R-MALP-2 gegenüber der entsprechenden S-Form des Moleküls (104). Der Peptidanteil des Moleküls besteht aus 14 Aminosäuren und determiniert die Wasserlöslichkeit des Lipopeptides (74). Die Struktur des MALP-2 ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt.

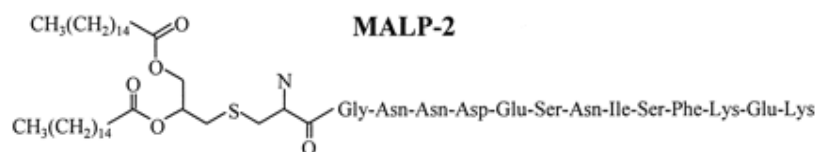


Abbildung 2: **Struktur des MALP-2.** (79)

2.6.2 Rezeptor und Signaltransduktion

MALP-2 ist ein Ligand des Rezeptordimers bestehend aus TLR-2 (104) und TLR-6 (105). Während TLR-2 sowohl di- als auch triacylierte Lipopeptide bindet, ist TLR-6 für die selektive Bindung von diacylierten Lipoproteinen wie MALP-2 durch das TLR-2/6-Heterodimer verantwortlich (80; 105). Zusätzlich wird CD36 (*cluster of differentiation 36*) als Kofaktor für die Erkennung von Diacylglyceriden durch den TLR-2/6-

Komplex diskutiert (33). TLR-2 interagiert nach MALP-2-Stimulation des Rezeptordimers mit TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*) und MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*), wobei TIRAP als Bindeglied zwischen TLR-2 und MyD88 dient. Anschließend erfolgt die Rekrutierung der Kinasen IRAK (*interleukine-1 receptor-associated kinase*) 1 und IRAK4, welche nach ihrer Phosphorylierung von MyD88 abdissoziieren und mit TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) interagieren. TRAF6 rekrutiert im weiteren Verlauf den Proteasekomplex bestehend aus TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*), TAB (*TAK1 binding protein*) 1 und TAB2 und innerviert nachfolgend zwei verschiedene Signalwege. Auf der einen Seite aktiviert TAK1 den IKK-Komplex (*I κ B kinase complex: IKK α ; IKK β ; NEMO, NF- κ B essential modifier*), der die Phosphorylierung (P) der I κ B-Proteine katalysiert und somit die Translokation von NF- κ B (*nuclear factor ' κ -light-chain-enhancer' of activated B-cells*) in den Zellkern ermöglicht. Der TAK1-Komplex aktiviert simultan den MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Signalweg. Dabei führt die Phosphorylierung von mehreren hintereinander geschalteten Kinasen zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) und p38, welche die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AP-1 (*activator protein 1*) katalysieren (25; 49; 89; 97; 119). Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 regulieren nach Translokation in den Zellkern die Genexpression zahlreicher inflammatorischer Zytokine, welche an der primären Immunantwort beteiligt sind (49; 56; 78; 89). Eine schematische Zusammenfassung der Signaltransduktion des Rezeptorheterodimers TLR-2/6 ist nachfolgend in Abbildung 3 wiedergegeben.

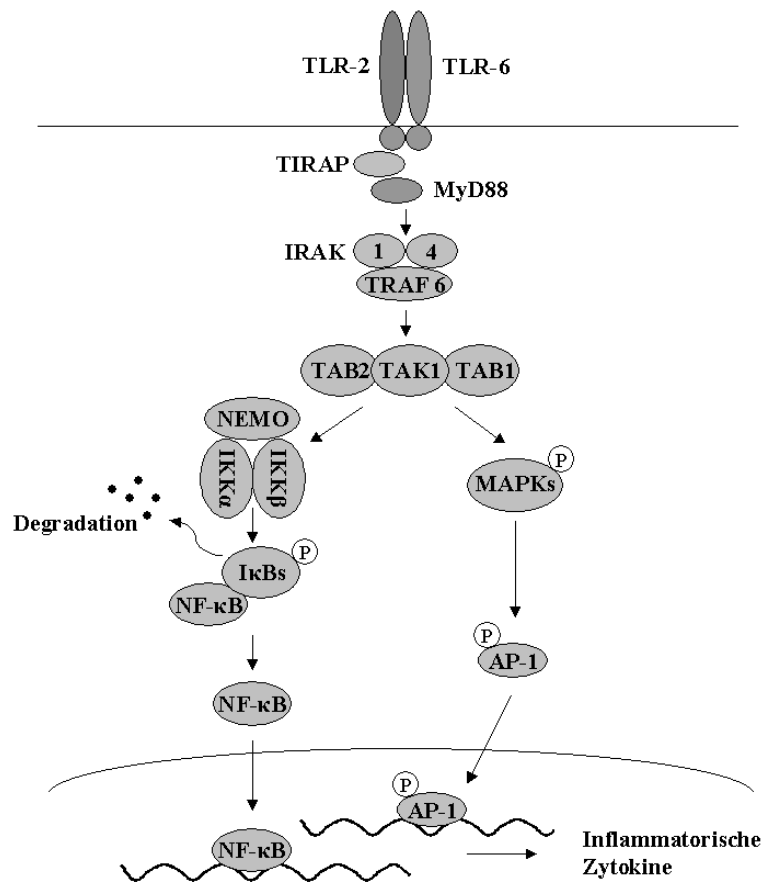


Abbildung 3: **Signaltransduktion von TLR-2/6**. modifiziert nach (49)

2.6.3 *In vitro* und *in vivo* Eigenschaften

MALP-2 stimuliert das angeborene Immunsystem, beeinflusst jedoch auch die erworbene Immunantwort sowohl direkt als auch indirekt. Im nachfolgenden Textabschnitt sollen die wichtigsten Eigenschaften von MALP-2 *in vitro* und *in vivo* kurz dargestellt werden.

MALP-2 stimuliert die Produktion proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und antibakterieller Verbindungen in zahlreichen Zellen. So bewirkte MALP-2 die Freisetzung von IL-6, TNF- α , MIP-1 α , MCP-1 und MIP-2 in murinen Monozyten und Makrophagen (10; 12; 104). Auch humane Monozyten wurden durch MALP-2 zur Produktion und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (IL-6, TNF- α , IL-8, GRO- α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) angeregt (10; 48). Ferner erhöhte MALP-2 die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch Makrophagen und steigerte somit die antibakterielle Aktivität dieser Phagozytose-aktiven

Zellen (73; 74; 104). MALP-2 aktivierte neutrophile Granulozyten und stimulierte so die Freisetzung von IL-8 und MIP-1 β . Dies trägt zur Rekrutierung weiterer Entzündungszellen bei. Darüber hinaus förderte MALP-2 die antibakterielle Wirkung von neutrophilen Granulozyten, indem es die Phagozytoseaktivität dieser Zellen erhöhte und die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (*oxidative burst*) begünstigte. Des Weiteren führte die Aktivierung neutrophiler Granulozyten zu Veränderungen der Zellmorphologie und zu verbesserter Zellbeweglichkeit. Dieser chemokinetische Effekt des MALP-2 fördert die Migration der neutrophilen Granulozyten im Gewebe (117). Fibroblasten, als Vertreter ortsständiger Zellen, wurden von MALP-2 zur Freisetzung von MCP-1, einem Chemokin zur Rekrutierung von Monocyten/Makrophagen, angeregt (11; 12; 73).

MALP-2 führt *in vivo* nach lokaler Applikation ebenfalls zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und stimuliert die Rekrutierung von Leukozyten. So bewirkte MALP-2 intraperitoneal die Ausschüttung von MIP-1 α und den vermehrten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in den peritonealen Raum (12). Nach intratrachealer Instillation des MALP-2 waren erhöhte Mengen an MCP-1 im bronchoalveolären Raum zu beobachten, assoziiert mit einem vermehrten Leukozyteninflux. Die Rekrutierung von Leukozyten in die Rattenlunge wurde zunächst durch den vermehrten Einstrom von neutrophilen Granulozyten geprägt, gefolgt von Makrophagen und Lymphozyten. Die Zellzahl erreichte dabei ihren maximalen Wert 24 h nach intratrachealer Applikation und fiel in den folgenden Tagen wieder auf ihre Ausgangswerte ab (60). Die Ausprägung der pulmonalen Immunstimulation durch MALP-2 nahm dabei mit steigender MALP-2-Dosis zu (60), differierte jedoch in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht (61; 81). MALP-2 ist also ein Immunmodulator und fördert die angeborene zelluläre Immunantwort.

Im murinen Modell für Wundheilungsstörungen verbesserte MALP-2 die Wundheilung der Haut. Die Injektion des MALP-2 direkt in das dermale Wundbett stimulierte dabei residente Fibroblasten und Makrophagen zur Freisetzung von MCP-1 und anderen Chemokinen. Diese chemotaktisch-aktiven Entzündungsmediatoren rekrutierten neutrophile Granulozyten und nachfolgend Makrophagen in den Wundbereich, welche ihrerseits vor Ort aktiviert und zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren angeregt wurden. Die nachfolgenden reparativen Prozesse verliefen in der initialen Phase der Entzündungsreaktion ohne weiteren Stimulus in natürlicher Abfolge, resultierten jedoch in einem früheren Verschluss der Hautwunde (11). MALP-2 zeigte nach Injektion in den dermalen Wundbereich von gesunden Patienten und

Diabetikern lediglich ein lokales transientes Erythem, jedoch keine systemischen Nebenwirkungen (77). Somit hat MALP-2 hohes therapeutisches Potential bei Wundheilungsstörungen, ohne gravierende Nebenwirkungen zu verursachen.

Das angeborene Immunsystem ist auch an der Bekämpfung von tumorös entarteten Zellen beteiligt (100), wobei insbesondere Monozyten (76; 106) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (28) eine zentrale Rolle spielen. *In vivo* Untersuchungen in einem murinen Metastasierungsmodell zeigten, dass MALP-2 lokal zur Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten in der Lunge führte. Nachfolgend freigesetzte proinflammatorische Zytokine aktivierten einwandernde NK-Zellen, welche verstärkt mit Tumorzellen aggregierten und ihrerseits durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wiederum Monozyten rekrutierten und aktivierten. Diese frühzeitige MALP-2-induzierte pulmonale Immunantwort beeinträchtigte nunmehr die Kolonisation der Lunge durch Adenokarzinomzellen und reduzierte die Zahl der Lungenmetastasen (101). Ferner lassen sich mittels intraperitonealer MALP-2-Applikation suppressive Effekte auf das Wachstum von Primärtumoren erzielen. So bewirkte MALP-2 *in vivo* eine ausgeprägte hämorrhagische Nekrose des subkutan wachsenden Methylcholanthren-induzierten murinen Fibrosarkom bis hin zur vollständigen Abheilung (23). MALP-2 rekrutierte neben NK-Zellen auch zytotoxische T-Lymphozyten in und um Tumorgewebe und förderte die zellvermittelte Immunantwort des spezifischen Immunsystems durch Induktion einer Typ1-T-Zellantwort (100). Des Weiteren begünstigte MALP-2 die Aktivierung und Reifung von Dendritischen Zellen (58; 116). Diese phagozytieren apoptotische und nekrotische Tumorzellen und aktivieren spezifische T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation in Verbindung mit der Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren. Die Stimulation sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems durch MALP-2 ging mit einem verlängerten Überlebensintervall bei exokrinem Pankreaskarzinom einher, einer Tumorerkrankung des Menschen mit sehr schlechter Prognose (99; 100).

MALP-2 aktiviert nicht nur das angeborene Immunsystem, sondern vermittelt auch die Induktion des spezifischen Immunsystems durch verbesserte Antigenaufnahme und Antigenerkennung. So erhöhte MALP-2 nach pulmonaler Applikation die Zahl antigen-präsentierender Zellen (APC) durch Rekrutierung von Makrophagen, Dendritischen Zellen und B-Lymphozyten in den bronchoalveolären Raum, in das Lungengewebe und das pulmonale Lymphgewebe. Darüber hinaus steigerte MALP-2 die Expression von MHC I,

MHC II und weiteren kostimulierenden und adhäsiven Molekülen auf der Zelloberfläche der antigenpräsentierenden Zellen und begünstigte somit die interzelluläre Interaktion zwischen den APCs und den Effektorzellen des spezifischen Immunsystems (5; 62; 81; 93; 116). Das Molekül MALP-2 selbst ist jedoch nicht immunogen, es konnten nach transnasaler Applikation keine MALP-2-spezifischen Antikörper *in vivo* nachgewiesen werden (92). Die Ursache dafür ist im MALP-2-Molekül selbst zu finden. Es enthält nur einen sehr kleinen Peptidteil. Der dazu verhältnismäßig große Lipidteil des MALP-2 wirkt in der Regel wenig immunogen. Die ausgeprägte immunstimulatorische Aktivität von MALP-2 und die Abwesenheit MALP-2-spezifischer Antikörper machen einen vielversprechenden Einsatz von MALP-2 als Adjuvans möglich. Untersuchungen *in vivo* belegten, dass die intranasale Applikation von MALP-2 in Verbindung mit dem Modellantigen β -Galaktosidase (92) und anderen Vakzinierungsprotokollen (4; 6; 63) die humorale und zelluläre Immunantwort sowohl systemisch als auch lokal im Bereich der Nasenschleimhaut effektiv verbessert.

Obwohl die Applikation großer Mengen von MALP-2 (im Bereich von 100 μ g/kg) endotoxische Wirkungen verursacht, die in ihrer Ausprägung zumeist mit denen von LPS vergleichbar sind (23), finden sich in der bisherigen Literatur keine Hinweise für Anzeichen von akut- oder chronisch-toxischer Wirkung von MALP-2 in geringeren Dosen. Darüber hinaus zeichnet sich MALP-2 durch seine definierte Struktur, chemischen Eigenschaften und die hohe biologische Aktivität und Stabilität während der Lagerung aus (92). Ferner ist die synthetische Herstellung von LPS-freiem MALP-2 in größeren Mengen möglich. Über die Bedeutung der lokalen Immunstimulation mit MALP-2 für den Verlauf von Infektionserkrankungen war bisher wenig bekannt. Im murinen Modell der polymikrobiellen Peritonitis erhöhte MALP-2 als potentes immunstimulierendes Agens die Erregerelimination durch Rekrutierung von Leukozyten in die Bauchhöhle und verbesserte die Überlebensrate (19). Welche Rolle der immunstimulatorische Effekt von MALP-2 *in vivo* auf die lokale Immunabwehr der Lunge im klinischen Verlauf von bakteriell bedingten Pneumonien, speziell der Pneumokokkenpneumonie, spielt, war noch vollständig ungeklärt.

3. Material und Methoden

Die tierexperimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen des vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigten Versuchsvorhabens G 0003/07 durchgeführt.

3.1 Studiendesign

Tabelle 2: Studiendesign.

		p.a.	Gruppe 1 Leukozytendifferenzierung BALF zeitlicher Verlauf	Gruppe 2 Leukozytendifferenzierung BALF (BALF-Proben stammen aus Tieren der Gruppe 3)	Gruppe 3 Zytokine
WT	naiv	0 h	n = 5	/	/
WT	Kontrolle	6 h	/	/	n = 6
WT	MALP-2	6 h	n = 5	/	n = 6
TLR-2 ^{-/-}	MALP-2	6 h	/	/	n = 6
WT	Kontrolle	24 h	/	n = 6	n = 6
WT	MALP-2	24 h	n = 5	n = 6	n = 6
TLR-2 ^{-/-}	MALP-2	24 h	/	n = 6	n = 6
WT	MALP-2	72 h	n = 5	/	/

		p.a.	Gruppe 4 Quantitative PCR	Gruppe 5 Western Blot (Gewebeproben stammen aus Tieren der Gruppe 3)
WT	naiv	0 h	n = 5	/
WT	Kontrolle	3 h	/	/
WT	MALP-2	3 h	n = 5	/
WT	Kontrolle	6 h	n = 5	n = 6
WT	MALP-2	6 h	n = 5	n = 6
WT	Kontrolle	12 h	/	/
WT	MALP-2	12 h	n = 5	/
WT	Kontrolle	24 h	n = 5	n = 6
WT	MALP-2	24 h	n = 5	n = 6

Material und Methoden

		Gruppe 6 Mortalität	Gruppe 7 Mortalität Dosisreihe
WT	Kontrolle + <i>S.pn.</i>	n = 24	n=10
WT	0,1 µg MALP-2 + <i>S.pn.</i>	/	n=10
WT	0,5 µg MALP-2 + <i>S.pn.</i>	n = 24	n=10
WT	2,0 µg MALP-2 + <i>S.pn.</i>	/	n=10

			Gruppe 8 Leukozyten- differenzierung BALF	Gruppe 9 Zytokine BALF (BALF-Proben stammen aus Tieren der Gruppe 8)	Gruppe 10 Leukozyten- differenzierung Blut (Blutproben stammen aus Tieren der Gruppe 8)
		p.i.			
WT	Kontrolle + PBS	48 h	n = 6	n = 6	/
WT	MALP-2 + PBS	48 h	n = 6	n = 6	/
WT	Kontrolle + <i>S.pn.</i>	48 h	n = 15	n = 6	n = 8
WT	MALP-2 + <i>S.pn.</i>	48 h	n = 15	n = 6	n = 8

			Gruppe 11 KbE / Lunge	Gruppe 12 KbE / Blut (Blutproben stammen aus Tieren der Gruppe 11)	Gruppe 13 Immunhistologie
		p.i.			
WT	Kontrolle + <i>S.pn.</i>	24 h	n = 10	n = 10	/
WT	MALP-2 + <i>S.pn.</i>	24 h	n = 10	n = 10	/
WT	Kontrolle + <i>S.pn.</i>	48 h	n = 10	n = 10	n = 3
WT	MALP-2 + <i>S.pn.</i>	48 h	n = 10	n = 10	n = 3
WT	Kontrolle + <i>S.pn.</i>	72 h	n = 9	n = 9	/
WT	MALP-2 + <i>S.pn.</i>	72 h	n = 9	n = 9	/

Abkürzungen: WT, Wildtypiere; TLR-2^{-/-}, TLR-2 defiziente Tiere; naïv, unbehandelt; Kontrolle, Lösungsmittel-behandelt; MALP-2, MALP-2-behandelt; + *S.pn.*, infiziert mit *S. pneumoniae*; + PBS, infiziert mit PBS (Kontrollinfektion); p.a., *post applicationem*; p.i., *post infectionem*; BALF, bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit; KbE, Kolonie-bildende Einheit

3.2 Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuche wurden weibliche C57Bl/6NCrl Wildtyp-Mäuse (Inzuchtstamm) in einem Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 18-22 g verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Des Weiteren wurden weibliche, homozygote TLR-2-defiziente Mäuse (TLR-2^{-/-}) in einem Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht von 18-22 g verwendet. Die TLR-2^{-/-}-Mäuse (C57Bl/6-Hintergrund) wurden als Zuchtpaar ursprünglich von Shizuo Akira (World Premier International Research Center – Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Osaka, Japan) zur Verfügung gestellt (103). Die weitere Zucht und Haltung der homozygoten Tiere erfolgte im Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR, Berlin Marienfelde).

3.3 Tierhaltung

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden geschlossene Käfige mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) zur Tierhaltung verwendet, wobei den Tieren freier Zugang zu pelletiertem Futter und Wasser möglich war. Die tägliche Dauer der Beleuchtungsphase betrug 12 Stunden.

3.4 MALP-2

MALP-2 (S-[2,3-bisacyloxypropyl]cysteinyl-GMNDESNISFKEK) wurde wie beschrieben (74) synthetisiert und gereinigt. Zur Herstellung der Stammlösung mit einer Konzentration von 1,0 mg/ml wurde das MALP-2 in 30 % 2-Propanol/H₂O gelöst und bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn erfolgte die Verdünnung der Stammlösung unter Verwendung von steriler isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %), so dass jedes Tier 0,5 µg MALP-2 in einem Endvolumen von 30 µl (Gebrauchslösung) erhielt. Den Kontrolltieren wurden entsprechend 0,5 µl 30 % 2-Propanol/H₂O in einem Gesamtvolumen von 30 µl (Kontrolllösung) verabreicht.

Für die Untersuchung zur Dosisabhängigkeit der protektiven MALP-2-Vorbehandlung im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie (Abschnitt 4.4: Abbildung 13, Tabelle 8-9)

erhielten die Tiere intratracheal 0,1 µg, 0,5 µg oder 2,0 µg MALP-2 in einem Gesamtvolumen von 30 µl (Gebrauchslösung). Dafür wurde die MALP-2-Stammlösung mit einer Konzentration von 1,2 mg/ml mit steriler isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Zusätzlich wurde bei der Herstellung der Gebrauchslösung neben steriler isotoner Kochsalzlösung noch 30 % 2-Propanol/H₂O zugesetzt (gilt für die Dosis 0,1 µg und 0,5 µg), so dass jedes Tier die gleiche Menge des MALP-2-Lösungsmittels (1,67 µl 30 % 2-Propanol/H₂O) erhielt und die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen gewährleistet wurde. Die Kontrolltiere erhielten in dieser Versuchsreihe entsprechend 1,67 µl 30 % 2-Propanol/H₂O in einem Gesamtvolumen von 30 µl.

Die MALP-2-Stammlösung wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Mühlradt (BioTech Gründerzentrum Braunschweig) zur Verfügung gestellt.

3.5 Applikation des MALP-2

Für die intratracheale Applikation des MALP-2 oder der Kontrolllösung wurde die Maus nach Markierung, Messung der Körpertemperatur und der Körpermasse (KM) mit einem Gemisch aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin intraperitoneal (i.p.) narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung wurde Bepanthen® Augen- und Nasensalbe verwendet. Nach Kontrolle der korrekten Narkosetiefe erfolgte anschließend die Fixierung des Tieres auf einer speziell angefertigten und um einen Winkel von 90° verstellbaren flachen Unterlage. Dabei wurde die Maus in Rückenlage auf der zunächst waagerechten Unterlage an den oberen Schneidezähnen fixiert, so dass der Kopf gestreckt wurde. Nach Fixierung der Vorderbeine mittels Leukoplaststreifen, wurde die Unterlage in eine senkrechte Position gebracht. Waagrecht zum Tier wurde eine Kaltlichtquelle in Höhe des Kehlkopfes zur indirekten Ausleuchtung der Luftröhre in Stellung gebracht. Nach vorsichtiger Fixierung der Zunge mittels einer kleinen gebogenen Pinzette wurde das Mauslaryngoskop in die Maulhöhle eingeführt, um freien Zugang zum Kehlkopf, direkte Ausleuchtung des Rachenraumes und Sicht auf die indirekt ausgeleuchtete Trachea zu erhalten. Anschließend erfolgte die intratracheale Intubation mittels einer auf eine 1ml-Spritze aufgesetzten 24G-Venenverweilkanüle (Flügel wurden vorher entfernt). Nach Applikation von 30 µl MALP-2- oder Kontrolllösung erfolgte die Extubation und Entfernung des Laryngoskopes aus dem Maulbereich. Das Tier wurde vorsichtig von der Unterlage befreit. Während der

Aufwachphase wurde das Tier unter Rotlicht in einer ruhigen Umgebung regelmäßig überwacht.

3.6 Anzucht von *S. pneumoniae*

3.6.1 Vorbereitung

Zur Herstellung der Nährlösung wurden 30 g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY) unter Zusatz von 5 g Bacto™ Technischem Hefeextrakt in einem Liter destilliertem Wasser auf dem Magnetrührer gelöst, bis eine klare goldbraune Flüssigkeit entstand. Nach Abfüllen der Nährlösung in sterile Glasflaschen wurde die Flüssigkeit bei 115 °C für 10 min autoklaviert.

Des Weiteren wurde steriles fetales Kälberserum (FCS) benötigt. Dazu wurde FCS bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert, in 50ml-Falcons steril aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch erfolgte nochmals eine Sterilfiltration des aufgetauten Serums unter Verwendung eines sterilen Rotilabo® Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,45 µm.

3.6.2 Bakterien

Zur Infektion der Mäuse wurden Bakterien der Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) verwendet. Nach zweimaliger Bebrütung auf Columbia Blutagar mit 5 % Schafblut wurden sie als Arbeitstock in 1,5 ml Einfriermedium bestehend aus 80 % Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillon (und einem Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt) und 20 % Glycerol bei -80 °C gelagert.

3.6.3 Anzucht

Der Arbeitsstock von *S. pneumoniae* wurde aus der -80 °C-Lagerung entnommen und durchgehend in einem gekühlten Transportgefäß belassen. Aus der weiterhin gefrorenen Bakteriensuspension wurden die Bakterien mit Hilfe einer Einweg-Plastiköse (1 µl) auf Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut ausgestrichen und 9-10 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Kurz vor Ende der Bebrütungszeit erfolgte die Herstellung des Anzuchtmediums aus 18 ml THY-Nährlösung und 2 ml sterilfiltriertem FCS. Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien unter Verwendung eines sterilen Wattestäbchens von den Agarplatten

abgenommen und in 20 ml des angewärmten Anzuchtmediums bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,03-0,04 (bei einer Wellenlänge von 600 nm) suspendiert. Die Kokkensuspension wurde anschließend nochmals für etwa 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet, bis eine OD von etwa 0,3 (Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *S. pneumoniae*) erreicht war. Nach Messung des Gesamtvolumens erfolgte die Zentrifugation der Suspension bei 3100 rpm für 10 min. Der überwiegende Teil des Überstandes wurde verworfen, das Zentrifugat resuspendiert und dessen Volumen bestimmt. Unter Berücksichtigung der nach 2 h Bebrütung gemessenen OD und dem Volumen des resuspendierten Zentrifugates wurde die Bakterienkonzentration der Suspension errechnet (eine OD von 0,1 entspricht hierbei einer Bakterienkonzentration von 1×10^8 KbE/ml). Anschließend wurde die Suspension zunächst bis zu einer Bakterienkonzentration von 1×10^9 KbE/ml (Stammlösung) und nachfolgend in mehreren Schritten bis zur gewünschten Infektionsdosis (Infektionslösung) mit PBS (*phosphat buffered saline*) verdünnt. Jede Maus erhielt 10 µl der entsprechenden Infektionslösung pro Nasenloch appliziert. Den Kontroll-infizierten Tieren wurden 10 µl PBS pro Nasenloch verabreicht. Die Infektionslösung wurde zur Kontrolle der korrekten Verdünnung nochmals verdünnt und auf Columbia Schafblutgar ausplattiert. Nach 24 h Bebrütung erfolgte die Auszählung der Kolonien.

3.7 Infektion der Tiere

Die Infektion der Tiere erfolgte 24 h nach intratrachealer Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung. Dafür wurden die Tiere nach Bestimmung der Körpertemperatur und der Körpermasse mit einem Gemisch aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin i.p. narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung erhielten die Tiere Bepanthen® Augen- und Nasensalbe in den Konjunktivalsack. Nach Kontrolle der korrekten Narkosetiefe wurden die Versuchstiere unter der Sterilbank in einer speziell angefertigten kastenartigen Haltevorrichtung an den oberen Schneidezähnen fixiert. Nun wurden jeder Maus 10 µl der Infektionslösung oder PBS pro Nasenloch intranasal mit einer 10µl-Pipette verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere zurück in den Käfig verbracht und während der Aufwachphase unter Rotlicht in einer ruhigen Umgebung regelmäßig überwacht.

3.8 Präparation der Tiere und Probenentnahme

3.8.1 Präparation

Zum Zeitpunkt der Präparation wurde die Maus hinsichtlich ihres Allgemeinbefindens beurteilt und sowohl Körpertemperatur als auch Körpermasse bestimmt. Anschließend wurde sie mit einem Gemisch aus 100 mg/kg KM Ketamin und 20 mg/kg KM Xylazin tief narkotisiert. Nach Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte die Reinigung des Operationsfeldes mit Braunol[®]. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf einer Silikonunterlage in einer speziellen doppelwandigen, flachen Plexiglaswanne mit ebenfalls doppelwandigem Plexiglasdeckel fixiert. Über einen Temperierkreislauf (destilliertes Wasser) wurde die Plexiglaswanne auf 37,0 °C gewärmt. In der Wandung dieser Apparatur befanden sich alle Hilfseinrichtungen und Anschlüsse zur Ventilation und Perfusion (Abbildung 4).

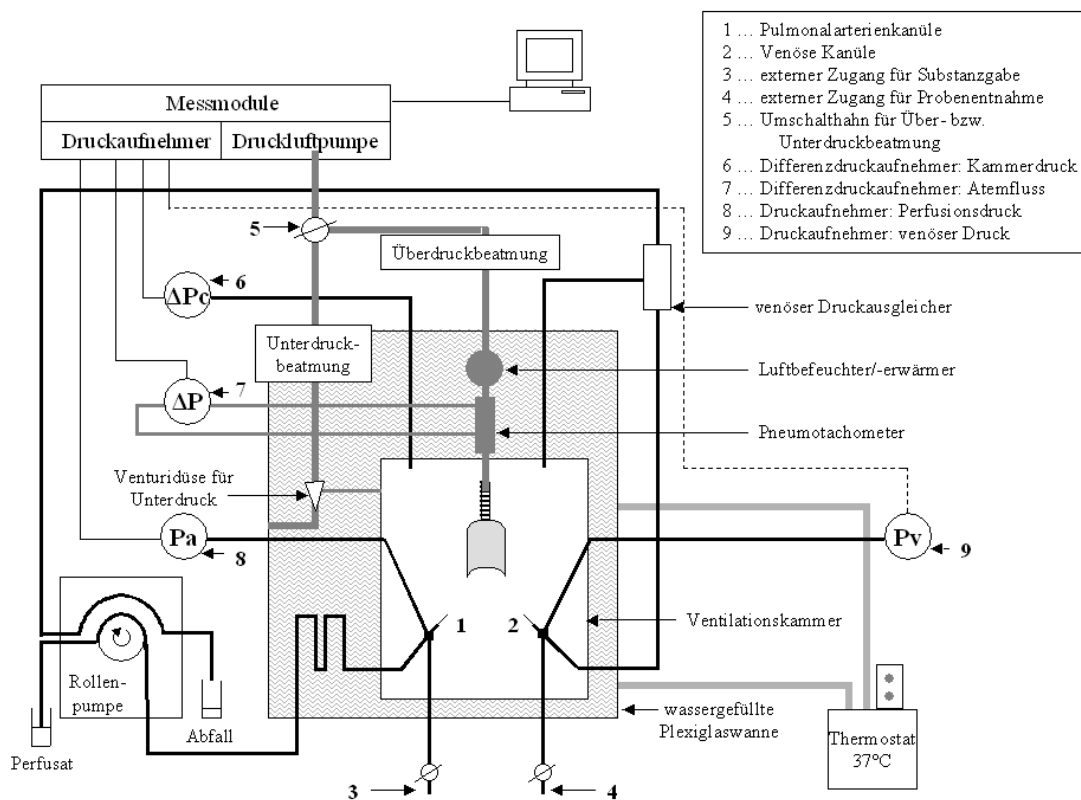


Abbildung 4: Skizze der IPML. (114)

Es erfolgte zervikal ein medianer Hautschnitt zur Darstellung der Trachea, welche kaudal des Larynx eröffnet wurde. Nachfolgend wurde die Trachealkanüle eingeführt und mittels einer Ligatur fixiert. Die Beatmung erfolgte mit Raumluft zunächst bei Überdruck (Tabelle 3). Nach medianer Laparotomie bis zum Xyphoid und Anlegen von seitlichen Entlastungsschnitten wurde das Zwerchfell eröffnet und 50 µl Heparin (1:2 verdünnt mit NaCl 0,9 %) direkt in die rechte Herzkammer appliziert. Anschließend erfolgte, mit oder ohne vorheriger Blutentnahme durch Punktion der *Vena renalis sinister*, ein rasches Entbluten mit sofortigem Herz- / Kreislaufstillstand durch Eröffnen der *Vena cava caudalis*. Das Zwerchfell wurde vollständig von der Brustwand gelöst, der Brustkorb entlang des Brustbeines eröffnet und beide Thoraxhälften nach vorsichtiger Entfernung von Verklebungen und Verwachsungen der Pleura auf der Silikonunterlage seitlich fixiert. Nach Entfernung des Thymus wurde eine lockere Ligatur um die *Arteria pulmonalis* gelegt. Anschließend erfolgte die Eröffnung der linken Herzkammer durch Entfernen der Herzspitze und der rechten Herzkammer durch Inzision der Kammerwand. Die Pulmonalarterienkanüle wurde über die rechte Herzkammer in den *Truncus pulmonalis* vorgeschoben und mittels vorgelegter Ligatur fixiert. Blutreste im pulmonalen Gefäßsystem wurden anschließend über die Pulmonalarterien mit sterilem auf 37 °C vorgewärmten NaCl 0,9 % aus der Lunge herausgespült. Nach Schließen des Kammerdeckels wurde auf Unterdruckbeatmung umgestellt (Tabelle 3). Um bereits entstandene Lungenatelektasen wieder zu eröffnen, erfolgte ein einmaliger tiefer Atemzug (-24 cm H₂O). Die Perfusion der Lunge bei Unterdruckbeatmung und einer Perfusionsrate von 1 ml/min wurde drei Minuten unter ständiger Überwachung der dynamischen Lungencompliance und der pulmonalen Resistance fortgeführt.

Tabelle 3. **Beatmungsparameter** bei Über- und Unterdruckbeatmung.

	Überdruckbeatmung	Unterdruckbeatmung
Inspirationsdruck	9 cmH ₂ O	-9 cmH ₂ O
Endexpirationsdruck	4,5 cmH ₂ O	-4,5 cmH ₂ O
Atemfrequenz	90 /min	90 /min
Inspiration : Expiration	1 : 1	1 : 1

3.8.2 Durchführung der Blutentnahme

Die aseptische Blutentnahme erfolgte im Verlauf der beschriebenen Maus-Präparation durch Punktion der *Vena renalis sinister*.

3.8.3 Durchführung der bronchoalveolären Lavage (BAL)

Zur Gewinnung der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) wurde die Lunge nach Ende der Perfusion und Ventilation zweimal (BAL 1, BAL 2) mit 800 µl eiskaltem PBS, das Protease-Inhibitoren enthielt (1 Tablette Complete™ Mini gelöst in 10 ml PBS), vorsichtig und gleichmäßig gespült. Die gewonnene BAL-Flüssigkeit (BALF 1 und BALF 2) wurde nach Bestimmung des Gesamtvolumens in 5ml-Polypropylen Round-Bottom Tubes gegeben und unmittelbar weiterverarbeitet.

3.8.4 Entnahme der Lunge

Die Entnahme nicht-lavagierter Lungen aus dem Thorax erfolgte grundsätzlich im Anschluss an die beschriebene Tierpräparation. Die Lunge wurde vorsichtig unter Schonung des Lungenparenchyms herauspräpariert, wobei der Lungenhilus mit den enthaltenen Lungenlymphknoten im Tier verblieb.

3.9 Differenzierung der Leukozyten in der BALF und im Blut

Die Differenzierung der Leukozyten in der BALF und im Blut erfolgte mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FACS Calibur der Firma Beckton Dickinson und BD CellQuest™ Pro (Version 4.0.2).

3.9.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozyten in der BALF

Die BALF wurde direkt nach der Entnahme zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand der BALF 1 abpipettiert und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung (Zytokin Assay) gelagert. Der Überstand der BALF 2 wurde verworfen. Die verbliebenen Zellpellets wurden anschließend gepoolt und in insgesamt 1 ml PBS resuspendiert. Zur Bestimmung der

Gesamtleukozytenzahl wurde die Neubauerzählkammer verwendet, welche mit 5 μ l eines Gemisches aus 5 μ l Zellsuspension und 5 μ l Methylenblau befüllt wurde. Nach Auszählung von 4 Großquadraten zu je 16 Kleinquadraten erfolgte die Bestimmung der mittleren Leukozytenzahl pro Großquadrat nach der Formel: [Leukozytenzahl in 4 Großquadraten / 4]. Anschließend wurde die Gesamtleukozytenzahl der entnommenen BALF (Gesamtvolumen BALF1 + BALF 2) unter Verwendung der Berechnungsformel [(mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat) x 2 x 10 000] ermittelt. Die Zellsuspension wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von ca. 4 ml aufgefüllt und bei 4 °C und einer Drehzahl von 1500 rpm über 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, die Probe aufgerüttelt und mit 2 μ l Fc-Block (0,5 mg/ml, ausreichend für 1 x 10⁶ Zellen) für 10 min bei 4 °C inkubiert, um die unspezifischen Immunglobulinrezeptoren zu blockieren. In ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) wurden zunächst 3 μ l (pro 300 000 Zellen) folgender fluoreszenzmarkierter Antikörper vorgelegt: CD 45 PerCP-konjugiert, GR-1 PE-konjugiert und F4-80 APC-konjugiert. Anschließend wurde die gesamte Probe auf die vorgelegten Antikörper pipettiert, gründlich aufgerüttelt und im Dunkeln bei 4 °C für 30 min inkubiert. Danach wurden 500 μ l FACS™ Lysing Solution (1X) zur Probe hinzugefügt und für 10 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert, um durch das enthaltene Formaldehyd die Bindung der Antikörper an die Zellen zu fixieren. Das Tube wurde im Anschluss mit „Cellwash“ auf ein Volumen von ca. 4 ml aufgefüllt und die Zellsuspension erneut bei 4 °C und einer Drehzahl von 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde der Überstand verworfen, die Probe mit 1 ml „Cellwash“ aufgefüllt und gründlich geschüttelt. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur der Firma Becton Dickinson anhand der Daten zur Lichtstreuung/Lichtbrechung und des durch die verwendeten Antikörper entstandenen Färbemusters. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl in der BALF und die Fraktion der Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN, *polymorphonuclear neutrophils*) und Lymphozyten bestimmt. Anhand der Gesamtleukozytenzahl, des Gesamtvolumens der entnommenen BALF und der prozentualen Anteile der drei Leukozytenpopulationen erfolgte die Bestimmung der absoluten Zahl der Leukozyten, sowie der Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bezogen auf 1 ml BALF.

3.9.2 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Differenzierung der Leukozyten im Blut

Von der gewonnenen Vollblutprobe (bereits mit Heparin versetzt) wurden direkt nach Entnahme 60 µl in ein EDTA-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur belassen. Auf die Ecken des im BD TruCount™ Tubes enthaltenen Siebes wurden 5 µl folgender Antikörper vorgelegt: CD45 PerCP und GR-1 PE. Anschließend wurden 50 µl des antikoagulierten Vollblutes hinzugefügt und die Probe gründlich gerüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden 450 µl FACS™ Lysing Solution (1X) hinzugefügt und nochmals 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Lyse-Puffer bewirkte hierbei die Lyse der Erythrozyten und diente zur Fixierung der Antikörperbindung an die Zellen. Anschließend wurde die Probe gründlich gerüttelt und in ein Polystyren Round-Bottom Tube (5 ml) überführt. Die Analyse der Zellsuspension erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur der Firma Becton Dickinson anhand der Daten zur Lichtstreuung/Lichtbrechung und des durch die verwendeten Antikörper entstandenen Färbemusters. Es wurden die Gesamtleukozytenzahl sowie die Fraktionen von Makrophagen, polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Lymphozyten bezogen auf 1 µl Vollblut ermittelt.

3.10 Quantifizierung der Zytokine in der BALF

Die Quantifizierung der Zytokine in der BALF wurde unter Anwendung der Multiplex Suspension Array Technologie der Firma Biorad durchgeführt. Dafür wurde ein *Bio-Plex™ Mouse 8-Plex Cytokine Assay* (IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNF-α, IL-10, RANTES (CCL5), KC, MCP-1) und ein *Bio-Plex™ Mouse 12-Plex Cytokine Assay* (IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNF-α, IL-10, RANTES (CCL5), KC, MCP-1, MIP-1α, GM-CSF, IFN-γ und G-CSF) der Firma BD verwendet.

Direkt nach ihrer Gewinnung wurden die BALF 1 und BALF 2 zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 4 °C), der Überstand der BALF 1 entnommen und in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß bei -80 °C bis zur Verwendung im Zytokin Assay gelagert.

Zur Durchführung des *Bio-Plex™ Mouse Multi-Plex Cytokine Assay* wurden die BALF-Proben (BALF 1 Überstand) auf Eis aufgetaut. Der Zytokinstandard wurde ebenfalls auf Eis mit 500 µl Probenmedium gelöst (500 ng/ml), gründlich gerüttelt und 30 min inkubiert.

Anschließend erfolgte aus dieser Stammlösung und Probenmedium die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe in 7 Verdünnungsstufen (jeweils 1:4). Darüber hinaus erfolgte die Lösung der Beads mit Analysepuffer gemäß den Herstellerangaben. Die Vertiefungen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden mit 100 µl Analysepuffer befeuchtet und nach Absaugen der verbliebenen Flüssigkeit mittels Vakuumfiltration erneut mit 50 µl der Beadlösung befüllt. Die verbliebene Flüssigkeit wurde mittels Vakuumfiltration wiederum entfernt. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe aller Vertiefungen mit je 100 µl Waschpuffer. Jeweils 50 µl der BALF-Probe oder der jeweiligen Standardverdünnung wurden in die Vertiefungen pipettiert (Doppelbestimmung). Die Platte wurde nachfolgend auf dem Schüttler für 60 sec bei 1000 rpm kurz aufgerüttelt und danach im Dunkeln für 60 min bei 300 rpm inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit je 100 µl Waschpuffer pro Vertiefung erfolgte die Zugabe von jeweils 25 µl der hergestellten Detektionsantikörperlösung. Die Platte wurde erneut 60 sec bei 1000 rpm aufgerüttelt und anschließend im Dunkeln 60 min bei 300 rpm inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit jeweils 100 µl pro Vertiefung wurden in alle Vertiefungen je 50 µl einer gemäß den Herstellerangaben verdünnten Streptavidin-PE-Lösung pipettiert, die Platte zunächst 30 sec bei 1000 rpm aufgerüttelt und anschließend für 10 min bei 300 rpm im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten erneut drei Waschschriffe mit jeweils 100 µl Waschpuffer. Die in den Vertiefungen verbliebenen mit Phycoerythrin (PE)-markierten Beads wurden in 125 µl Analysepuffer resuspendiert, bei 1000 rpm im Dunkeln 1 min inkubiert und vor der Messung nochmals gründlich aufgerüttelt (60 sec, 1000 rpm). Die Messung der Proben erfolgte im *Bio-Plex Array Reader*.

3.11 Untersuchung der Genexpression des TLR-2

Die Kultivierung und Stimulation der humanen Alveolarepithelzelllinie A549 sowie die Isolierung der RNA und die Durchführung der quantitativen PCR erfolgte in Zusammenarbeit mit Vincent van Laak, Medizinische Klinik m.S. Infektiologie und Pneumologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Western Bot Analysen *in vivo* und *in vitro* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Karsten Grote, Medizinische Hochschule Hannover, Transplantationsforschungszentrum, Klinik für Kardiologie und Angiologie, Hannover, durchgeführt.

3.11.1 Zellen

Zur *in vitro* Untersuchung der Genexpression des TLR-2 wurden humane Alveolarepithelzellen (A549) der Firma American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) stimuliert und geerntet.

3.11.2 Kultivierung und Stimulierung der A549-Zellen

Die Zellen wurden in DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) unter Zusatz von 10 % FCS und 5 mM L-Glutamin kultiviert und zwischen der 15. und 25. Passage bei 80-90 % Konfluenz mit 5 ng/ml MALP-2 für 1 h oder 3 h stimuliert. Zur Kontrolle erfolgte die Stimulation von A549 mit der entsprechenden in Medium verdünnten Menge 2-Propanol 30 % (Lösungsmittel).

3.11.3 Isolierung der RNA von stimulierten A549-Zellen

Für die Isolierung der RNA wurde das Rneasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Vor Beginn der Durchführung wurden dem im Kit enthaltenen RLT-Puffer 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) pro 1 ml Puffer hinzugefügt. Des Weiteren wurde das RPE-Puffer-Konzentrat mit vier Volumenteilen Ethanol (96-100 %) verdünnt.

Das Medium wurde komplett von den stimulierten A549-Zellen entfernt und 350 µl RLT-Puffer (+β-ME) in jede Vertiefung der Kultivierungsplatte gegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach Lösen der Zellen vom Plattenboden wurde das Zelllysate durch mehrmaliges Pipettieren vermischt, direkt in eine QIAshredder Spin Column auf einem 2ml-Collection Tube gegeben und zentrifugiert (2 min, 13000 rpm, 20 °C). Anschließend wurde die Shredder Spin Column verworfen, zu dem nun homogenisierten Zelllysate 350 µl Ethanol 70 % zugegeben und die Probe gut vermischt. Maximal 700 µl des Probenlysates wurden in die RNeasy Mini Spin Column aufgesteckt auf ein 2ml-Collection Tube pipettiert und zentrifugiert (15 sec, 10000 rpm, 20 °C). Das Eluat wurde verworfen, 700 µl RW1-Puffer je Probe zugefügt und nochmals 15 sec bei 10000 rpm zentrifugiert, um die Membran der Rneasy Spin Column zu waschen. Auf die Filtermembran wurden nach Verwerfen des Eluates 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Nach der Zentrifugation (15 sec, 10000 rpm, 20 °C) erfolgte nochmals eine Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt

(2 min bei 10000 rpm). Nun wurde die Rneasy Spin Column auf ein neues 1,5ml-Collection Tube transferiert und die Filtermembran der Rneasy Spin Column zweimal mit 18 μ l RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (1 min, 10000 rpm, 20 °C) gespült. Die Rneasy Spin Column wurde verworfen und das Eluat (ca. 30 μ l) in der RT-PCR verwendet.

3.11.4 Isolierung der RNA aus Mauslungen

Nach Präparation des Tieres entsprechend Abschnitt 3.8.1 wurde die nicht-lavagierte Lunge vorsichtig herauspräpariert, in 1 ml Trizol unter Verwendung des Ultra-Turrax T 8 homogenisiert und bei -80 °C bis zur Isolierung der RNA gelagert. Nach Auftauen der Lungenhomogenate wurden die Proben für 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert, und der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 μ l Chloroform. Die Proben wurden 15 sec gerüttelt und 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 12000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reagenzgefäß überführt, 500 μ l 2-Propanol hinzugefügt, die Probe gründlich gerüttelt und zentrifugiert (20 min, 12000 rpm, 4 °C). Nachfolgend wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und zentrifugiert (15 min, 12000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das RNA-Pellet in jeweils 100 μ l TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) resuspendiert und in der RT-PCR eingesetzt.

3.11.5 Reverse Transkription

Da die spezifische DNA-Polymerase des PCR Master Mix nur DNA amplifizieren kann, wurde in einem ersten Schritt die isolierte RNA unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription). Im zweiten Schritt erfolgte die quantitative *real-time* PCR mit Hilfe der spezifischen DNA-abhängigen DNA-Polymerase. Für die Reverse Transkription wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* der Firma Applied Biosystems verwendet.

Die Bestimmung der Menge an isolierter RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte im Photometer. Hierfür wurden 5 μ l Probe (isolierte RNA) mit 195 μ l Aqua tridestillata (A. tridest.) verdünnt und bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit der Formel:

$$\text{Konzentration RNA in } \mu\text{g}/\mu\text{l} = (40 \mu\text{g}/1000 \mu\text{l}) * A_{260} * 40 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Eine bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessene Absorbtionseinheit ($A_{260} = 1$) entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/1000 \mu\text{l}$. Das Verhältnis A_{260}/A_{280} diene zur Überprüfung der Reinheit der RNA-Proben und sollte Werte zwischen 1,5 und 2,1 annehmen. Zur Durchführung der Reversen Transkription (RT) wurde die Probe entsprechend der ermittelten RNA-Konzentrationen auf 2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$ verdünnt. Anschließend erfolgte die Vorbereitung des RT Master Mix (2X) wie folgt:

10X RT-Puffer	2,0 μl
25X dNTP Mix (100 mM)	0,8 μl
10X RT Random Primers	2,0 μl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 μl
Rnase Inhibitor	1,0 μl
Nuclease-freies H ₂ O	3,2 μl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	10,0 μl

Rnase/Dnase-freie Reagenzgefäße wurden jeweils mit 10 μl des 2X RT Master Mixes und 10 μl der RNA-Probe (2 μg) befüllt und der Inhalt durch Auf- und Abpipettieren (2x) vermischt. Das Gemisch aus Probe und RT Master Mix wurde kurz herunter zentrifugiert, um Luftblasen zu beseitigen. Anschließend wurde der Thermocycler mit den Reaktionsansätzen beladen und der Vorgang der Reversen Transkription gestartet.

3.11.6 Quantitative PCR

Für die quantitative Bestimmung der Genexpression des TLR-2 (humane und murine) mit Hilfe der *real-time* PCR wurde der TaqMan® Gene Expression Master Mix sowie der TaqMan® Gene Expression Assay (human TLR-2, mouse TLR-2, human GAPDH, mouse GAPDH) im AB 7300-Real Time PCR System verwendet. Als endogene Kontrolle diente die Genexpression der GAPDH.

Jede Probe wurde im Triplet gemessen, wobei pro Reaktionsansatz 100 ng cDNA in einem Volumen von 22,5 µl (Rnase-freiem A.dest) eingesetzt wurden. Der Reaktionsansatz wurde wie folgt vorbereitet:

TaqMan Gene Expression Assay (20X)	2,5 µl
cDNA Matrize + H ₂ O (100 ng cDNA)	22,5 µl
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	25,0 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	50,0 µl

Für jedes Triplet erfolgte der Ansatz der vierfachen Menge. Die Reaktionsansätze wurden gründlich vermischt und zentrifugiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung einer ABI Prism[®] 96-Well-Optical-Reaction-Plate 50 µl des entsprechenden Reaktionsansatzes pipettiert und die Platte im AB 7300-Real Time PCR System gemessen. Die Auswertung und Bestimmung der relativen Quantifizierung (RQ) erfolgte unter Verwendung der Delta-Delta-CT-Methode (38). Die Berechnung wurde mit folgender Formel wie folgt durchgeführt:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen (TLR-2)} - CT \text{ Referenzgen (GAPDH)}$$

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

$$\text{Relative Quantifizierung} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Es wurde eine Kontrolle ohne cDNA zur Prüfung der Reinheit der Reagenzien mitgeführt.

3.11.7 Western Blot-Analyse von Mauslungen und A549-Zellen

Die Isolierung und Auftrennung der Proteine von Mauslungen und humanen A549-Zellen erfolgte unter Verwendung der denaturierenden SDS(10 %)-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*). Die Proteine wurden auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen transferiert, welche anschließend mit monoklonalen murinen anti-TLR-2-Antikörpern (*monoclonal mouse anti-TLR-2 antibody sc-21759*) inkubiert wurden. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mittels Peroxidase-konjugierten Sekundäntikörpern (*polyclonal sheep anti-mouse antibody*), ECL (*enhanced*

chemiluminescent)-Lösung und ECL-Film (Hyperfilm ECL). Die einheitliche Proteinbeladung der Membranen wurde mit monoklonalen murinen anti-GAPDH-Antikörpern überprüft. Zur Digitalisierung der ECL-Filme fand das GeneGenius Imaging System Verwendung. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe der Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories, USA). Zur Normalisierung der Proteinmengen diente die GAPDH als Kontrolle.

3.12 Untersuchung des klinischen Verlaufes der Pneumokokkenpneumonie

Die vorbehandelten Tiere wurden im Anschluss an die Infektion für eine Dauer von 10 Tagen überwacht. Während des Versuchszeitraumes wurde das Allgemeinbefinden und der klinische Zustand der Tiere beobachtet und dokumentiert. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse. War die Erkrankung bei einem Tier soweit fortgeschritten, dass kurzfristig mit einem letalen Verlauf gerechnet werden musste und sein Leiden ein ethisch vertretbares Maß überschritt, erfolgte die Euthanasie dieses Tieres (zervikale Dislokation nach Ketamin/Xylazin-Narkose). Hierfür wurden folgende Handlungsanweisungen, modifiziert nach den „Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere“ (Stand 21.01.1997), zugrunde gelegt:

Tabelle 4: Handlungsanweisung.

Tier isoliert sich	a
Struppiges Fell	a
Verstärkte Atmung	a
Tier vermeidet Bewegungen	a
Teilnahmslosigkeit	a
Keuchen	b
Krämpfe, Torkeln, Apathie	b
Schmerz (Gesichtsausdruck, gekrümmte Haltung, Laufen auf Zehenspitzen)	b
Blässe (Ohren, Augen)	b
Schmerz beim Anfassen	b
Bauch hart und gespannt	b
Hautfalte bleibt stehen	b
Abnahme von mehr als 20 % der Körpermasse	c

Anweisungen:

- a ... Tier weiter beobachten
- b ... in Kombination mit Keuchen, Schmerzen oder Blässe Tier einschläfern
- c ... Tier einschläfern

Nach 10-tägiger Beobachtungsfrist wurden alle überlebenden Tiere mittels letaler intraperitonealer Ketamin/Xylazin Injektion euthanasiert.

3.13 Bestimmung der Bakterienlast in Lunge und Blut

3.13.1 Bakterienlast der Lunge

Die entnommene Lunge wurde direkt in einem Medikamentenbecher, gefüllt mit 1 ml PBS, unter Verwendung einer geraden Präparierschere zerkleinert und in ein BD Falcon™ Zellsieb

(100 µm), welches auf ein 50ml-Falcon aufgesetzt wurde, gegeben. Der Medikamentenbecher wurde nochmals mit PBS gespült bis keine Gewebereste mehr enthalten waren. Mit Hilfe eines 2ml-Spritzenkonus wurde die Lunge durch das Zellsieb gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde das BD Falcon™ Zellsieb (100 µm) in mehreren Zwischenschritten mit PBS gespült, bis nur noch Bindegewebe zurückblieb. Die Organsuspension wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und gründlich gerüttelt. Je 10 µl der Organsuspension wurden pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf vorgewärmten Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Anschließend erfolgte die Auszählung der KbE und die Berechnung der Bakterienlast der Lunge unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe und der eingesetzten Probenmenge von 10 µl.

3.13.2 Bakterienlast im Blut

Je 5 µl Blut wurden pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1000 auf vorgewärmten Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 h bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Anschließend erfolgten die Auszählung der KbE und die Berechnung der Bakterienlast im Blut unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe und der eingesetzten Probenmenge von 5 µl.

3.14 Immunhistochemischer Nachweis von *S. pneumoniae* in der Mauslunge

Der immunhistochemische Nachweis von *S. pneumoniae* in vorbehandelten und anschließend infizierten Mauslungen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Anke Lührmann und Prof. Dr. Thomas Tschernig, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Zum indirekten immunhistochemischen Nachweis von *S. pneumoniae* wurden die entsprechend Abschnitt 3.8.1 präparierten, nicht-lavagierten Lungen vorsichtig mit jeweils 800 µl Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound über die Atemwege gefüllt. Die Trachea wurde anschließend mit einer Ligatur verschlossen und die Lungen über Flüssigstickstoff gefroren. Von den gefrorenen Lungen wurden Gewebeblöcke hergestellt, aus denen 7 µm dicke Gewebsschnitte auf dem Kryostat Leica CM 3050S angefertigt wurden. Alle Gewebsschnitte wurden in 4 % Paraformaldehyd bei 4 °C für 10 min fixiert und mit PBS zweimal 5 min

gespült. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper (*rabbit anti-A66 serotype 3 antiserum*), verdünnt (1:1000) in PBS unter Zusatz von 10 % Mausserum und 0,1 % TritonX 100, über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Schnitte wurden wiederum zweimal 5 min mit PBS gespült und nachfolgend mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (*goat-anti rabbit immunoglobulin AP*), verdünnt (1:50) in PBS/5 % Mausserum, für weitere 45 min inkubiert und anschließend zweimal 5 min in TBS/Tween gespült. Die TBS/Tween-Lösung wurde vorher wie folgt hergestellt:

60,57g Tris + 86,1g NaCl in 1l Aqua dest. (Stammlösung)



Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen



1 % einer 5 %igen Tween 20-Verdünnung zur verdünnten Stammlösung hinzufügen

Die Gewebsschnitte wurden 25 min mit Fast Red inkubiert und zweimal 5 min in TBS/Tween gespült. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaunlösung (1:5 in PBS). Die Präparate wurden nach Einbettung in Glycergel Mounting Medium mit dem Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit AxioCam und LSM 5 Pascal) analysiert.

3.15 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung des Programmes GraphPad Prism[®] Version 4.0. Alle Daten zur Leukozytenzahl in BALF und Blut, zur Zytokinproduktion, Genexpression und Proteinsynthese des TLR-2, sowie zu Körpermasse und Körpergewicht sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SD, *standard deviation*) angegeben. Die Messwerte zur Erregerlast in Lunge und Blut werden als Einzelwerte und Median gezeigt. Zur Analyse der Wirksamkeit der MALP-2-Vorbehandlung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bei muriner Pneumokokkenpneumonie wurde die Überlebenszeit in den entsprechenden Versuchsgruppen untersucht und die Ergebnisse als Kaplan-Meier Survival Kurven dargestellt. Für den Vergleich der Überlebenskurven wurde der log-rank-Test verwendet. Die Analyse der Leukozytenzahl in BALF und Blut, der Körpermasse, des Körpergewichtes sowie der Bakterienlast in Lunge und Blut erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test. Zur Auswertung der

qRT-PCR und Western Blot Ergebnisse wurde der t-Test herangezogen.
 $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 MALP-2 bewirkt die Rekrutierung von Leukozyten in die Mauslunge

Zur Charakterisierung der lokalen Wirkung von MALP-2 in der Mauslunge wurde Mäusen 0,5 µg MALP-2 intratracheal instilliert. Nach 0 h, 6 h, 24 h und 72 h wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt und die Lavageflüssigkeit (BALF) hinsichtlich der Leukozytenzahl und -populationen im Durchflusszytometer untersucht. Die Gesamtleukozytenzahl stieg bereits 6 h nach MALP-2-Instillation signifikant an und zeigte 24 h nach Stimulation gegenüber der Lavageflüssigkeit unstimulierter Lungen (0 h nach MALP-2) einen 14-fachen Anstieg. Innerhalb der folgenden zwei Tage fiel die Gesamtleukozytenzahl wieder ab (Tabelle 5).

Tabelle 5: Leukozytenzahl in der BALF

Zeit [h] nach Applikation von 0,5 µg MALP-2	\log_{10} [Gesamtleukozytenzahl] ^a pro ml BALF	n
0	4,395 ± 0,114	5
6	4,768 ± 0,133**	5
24	5,412 ± 0,415**	5
72	4,614 ± 0,551	5

^aDie Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. **p < 0,01 vs. unbehandelte Tiere (0 h).

Die Differenzierung der Leukozytenpopulationen ergab, dass die lokale MALP-2-Applikation eine signifikant erhöhte Akkumulation sowohl der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), als auch der Makrophagen und Lymphozyten im bronchoalveolären Raum bewirkte. Die drei Leukozytenpopulationen erreichten zeitgleich maximale Zellzahlen 24 h nach der Stimulation (Abbildung 5).

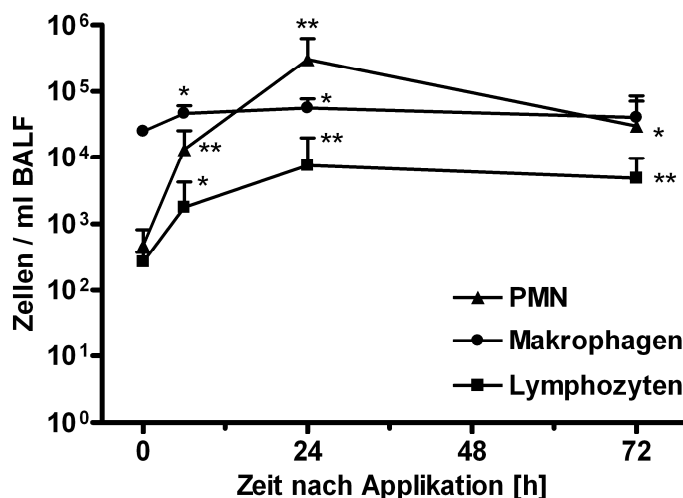


Abbildung 5: **Zeitlicher Verlauf der Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum.** Den Tieren wurden 0,5 µg MALP-2 intratracheal appliziert. Nach 0 h, 6 h, 24 h und 72 h wurde eine BAL durchgeführt und die BAL-Flüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (n = 5). *p < 0,05 und **p < 0,01 vs. unbehandelte Tiere (0h).

Die Leukozytenzahl in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit der Kontrolltiere (\log_{10} [Leukozyten]: $4,496 \pm 0,204$ /ml BALF; \log_{10} [PMN]: $2,461 \pm 0,460$ /ml BALF; \log_{10} [Makrophagen]: $4,485 \pm 0,206$ /ml BALF; \log_{10} [Lymphozyten]: $2,556 \pm 0,130$ /ml BALF) verblieb 24 h nach Applikation auf dem niedrigen Niveau unstimulierter Tiere (\log_{10} [Leukozyten]: $4,395 \pm 0,114$ /ml BALF; \log_{10} [PMN]: $2,490 \pm 0,569$ /ml BALF; \log_{10} [Makrophagen]: $4,383 \pm 0,111$ /ml BALF; \log_{10} [Lymphozyten]: $2,400 \pm 0,155$ /ml BALF).

4.2 MALP-2 stimuliert sowohl die Leukozytenrekrutierung als auch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in den bronchoalveolären Raum in Abhängigkeit von TLR-2.

Wildtyp (WT)- und TLR-2^{-/-}-Tiere wurden intratracheal mit 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung behandelt. Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurde nach 24 h hinsichtlich Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferentialzellbild analysiert. MALP-2 bewirkte eine Rekrutierung von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum von WT-Tieren. Die Zahl der PMN und Makrophagen in der Gruppe der MALP-2-behandelten TLR-2^{-/-}-Tiere

blieb jedoch unverändert, wohingegen die Zahl der Lymphozyten im Vergleich zur Gruppe der kontrollbehandelten Wildtyp-Tiere etwa um das 1,9-fache anstieg (Abbildung 6). Kontrollbehandelte TLR-2^{-/-}-Tiere (\log_{10} [PMN]: $2,446 \pm 0,294$ /ml BALF; \log_{10} [Makrophagen]: $4,356 \pm 0,075$ /ml BALF; \log_{10} [Lymphozyten]: $2,694 \pm 0,140$ /ml BALF) und kontrollbehandelte Wildtyp-Tiere (\log_{10} [PMN]: $2,402 \pm 0,436$ /ml BALF; \log_{10} [Makrophagen]: $4,477 \pm 0,186$ /ml BALF; \log_{10} [Lymphozyten]: $2,565 \pm 0,119$ /ml BALF) wiesen 24 h nach der intratrachealen Behandlung vergleichbare Mengen an Leukozyten in der BALF auf.

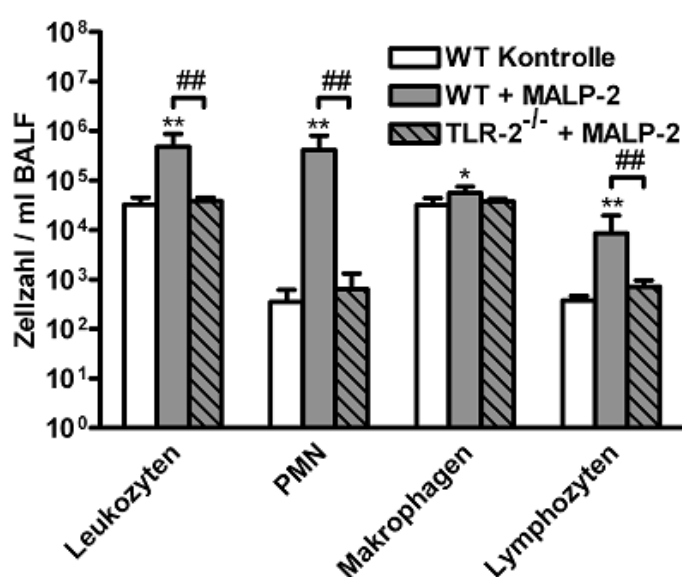
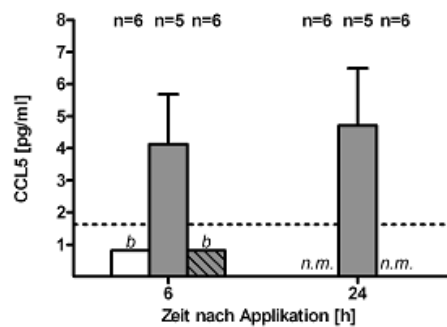
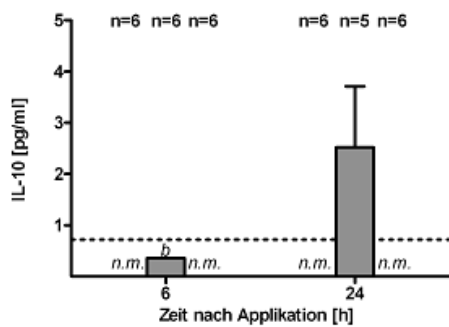
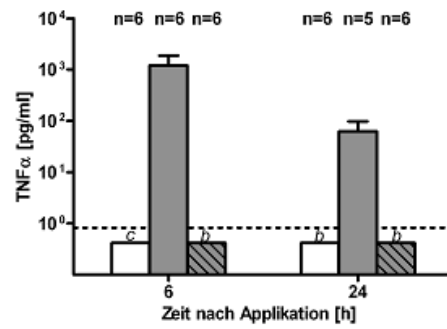
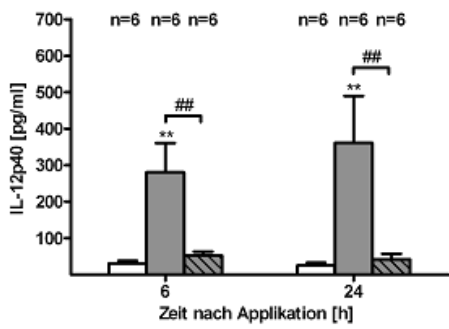
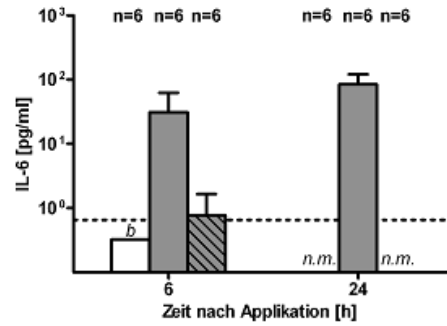
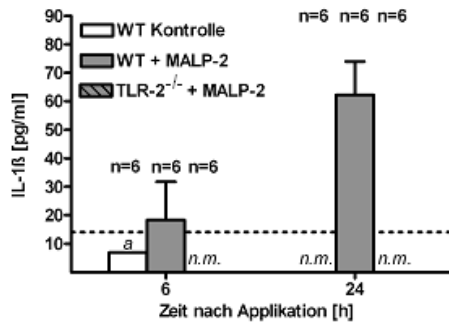


Abbildung 6: **MALP-2-induzierte, TLR-2-abhängige Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum.** WT- und TLR-2^{-/-}-Tiere wurden mit 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal behandelt. Nach 24 h erfolgte die Analyse der BAL-Flüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (n = 6). *p < 0,05 und **p < 0,01 vs. kontrollbehandelte WT-Tiere. ##p < 0,01.

Zur Analyse der MALP-2-stimulierten Zytokinantwort erfolgte die intratracheale Behandlung von WT- und TLR-2^{-/-}-Tieren mit 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung. Die Zytokine in der BALF wurden 6 h und 24 h nach Applikation mittels Bioplex Cytokine Assay bestimmt. MALP-2 bewirkte einen deutlichen Anstieg inflammatorischer Zytokine in der BALF von Wildtyp-Tieren innerhalb der ersten 24 h nach der Behandlung. Die Gruppe der TLR-2^{-/-}-Tiere zeigte jedoch nach MALP-2-Applikation keine erhöhte Synthese von Entzündungsmediatoren im Vergleich zu kontrollbehandelten WT-Tieren (Abbildung 7).

Ergebnisse



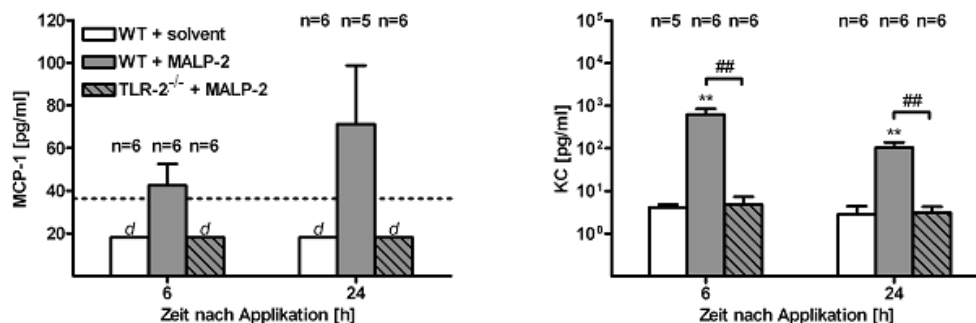


Abbildung 7: MALP-2-induzierte, TLR-2-abhängige Zytokinproduktion im bronchoalveolären Raum. WT- und TLR-2^{-/-}- Tiere wurden mit 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal behandelt. Nach 6 h und 24 h erfolgte die Quantifizierung der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNF-α, IL-10, CCL5 (RANTES), MCP-1, KC in der BALF mittels Bioplex Assay. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (n = 5-6). Untere Detektionsgrenze des *Cytokine Multiplex Assays* (= Strichlinie). **p < 0,01 vs. kontrollbehandelte WT-Tiere. ##p < 0,01.

n.m. (nicht messbar): n = 6: Messwert = 0

- a n = 1: Messwert unterhalb der unteren Detektionsgrenze (< u.D.) des *Cytokine Multiplex Assays* und n = 5: Messwert = 0
- b n = 2: Messwert < u.D. und n = 4: Messwert = 0
- c n = 3: Messwert < u.D. und n = 3: Messwert = 0
- d n = 6: Messwert < u.D.

4.3 Die lokale MALP-2-Applikation stimuliert die Genexpression von TLR-2 *in vivo* und *in vitro*

Um einen möglichen Effekt des TLR-2-Agonisten MALP-2 auf die epitheliale Expression von TLR-2 zu untersuchen, wurde den Tieren 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung intratracheal appliziert und die Genexpression des TLR-2 durch Quantifizierung der mRNA im Lungengewebe unter Verwendung der qRT-PCR analysiert. Die lokale Applikation von MALP-2 in die Lunge bewirkte einen unmittelbaren und signifikanten Anstieg des TLR-2 mRNA-Levels. Dabei betrug die mRNA-Menge bereits 3 h nach Stimulation mit MALP-2 etwa das 5-fache des Ausgangswertes naiver Tiere. Die Genexpression des TLR-2 blieb im Vergleich zur unbehandelten Gruppe auch 24 h nach MALP-2-Stimulation noch erhöht (Abbildung 8).

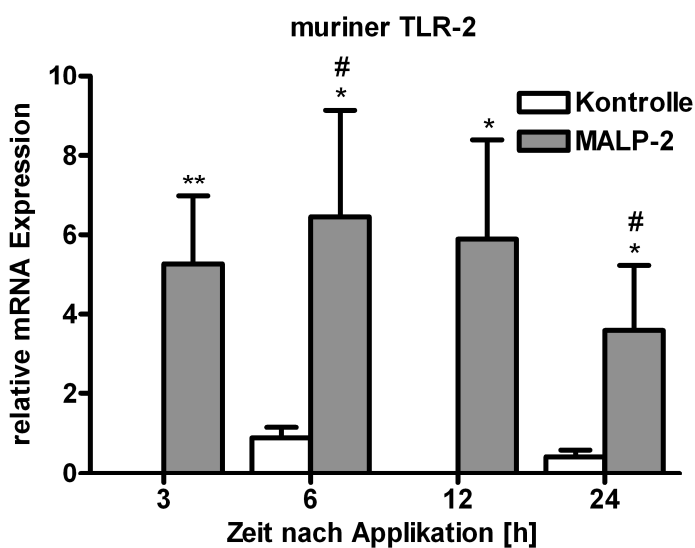


Abbildung 8: **Genexpression des murinen TLR-2 nach MALP-2-Stimulation *in vivo***. Mäusen wurde 0,5 μ g MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal appliziert und die Expression der TLR-2 mRNA in Lungenhomogenaten mittels qRT-PCR unter Verwendung der murinen GAPDH als endogene Kontrolle quantifiziert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SD (n = 4-5). *p < 0,05 und **p < 0,01 vs. unbehandelte Versuchsgruppe. # p < 0,05 vs. entsprechende Kontrollgruppe.

Der Nachweis des TLR-2 in der Mauslunge mittels Western-Blot-Analyse 6 h und 24 h nach intratrachealer Behandlung mit MALP-2 oder Kontrolllösung ergab innerhalb der ersten 24 h signifikant erhöhte Mengen an TLR-2-Protein in der MALP-2-behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 9).

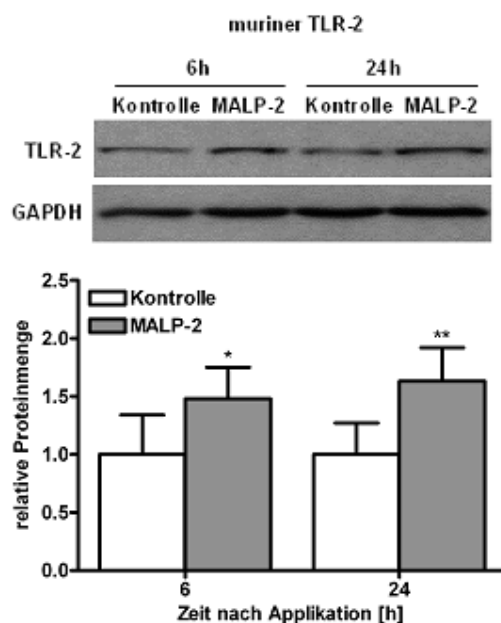


Abbildung 9: **Proteinsynthese des murinen TLR-2 nach MALP-2-Stimulation *in vivo***. Die Tiere wurden mit 0,5 μ g MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal behandelt und die TLR-2-Proteinmenge in Lungenhomogenaten mittels Western Blot analysiert. Ein repräsentativer Blot ist für sechs voneinander unabhängige Experimente abgebildet. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SD (n = 6). * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ vs. entsprechender Kontrollgruppe.

Die Alveolarepithelzellen tragen in der Lunge wesentlich zur Barrierefunktion zwischen dem Organismus und der Umwelt bei und spielen somit auch eine bedeutende Rolle in der primären Immunantwort der Lunge. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von MALP-2 auf die TLR-2-Genexpression humaner Alveolarepithelzellen untersucht. Humane A549-Zellen wurden mit 5 ng/ml MALP-2 oder Kontrolllösung für eine Dauer von 3 h, 6 h, 9 h und 12 h stimuliert und die TLR-2 mRNA unter Verwendung der qRT-PCR quantifiziert. Die *in vitro* Stimulation bewirkte eine Hochregulation der TLR-2 mRNA in drei voneinander unabhängigen Experimenten (Abbildung 10).

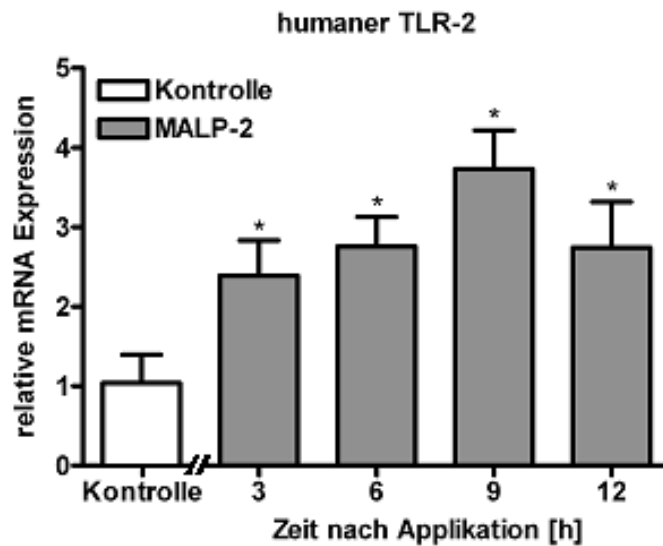


Abbildung 10: **Genexpression des TLR-2 (human) nach MALP-2-Stimulation (*in vitro*)**. A549-Zellen wurden mit 5 ng/ml MALP-2 über 3 h, 6 h, 9 h oder 12 h, oder mit entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Die Quantifizierung der TLR-2 mRNA in den Zellen erfolgte mittels qRT-PCR unter Verwendung der humanen GAPDH als endogene Kontrolle. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SD (n = 3). *p < 0,05 vs. Kontrolle.

Die Untersuchung der TLR-2-Proteinsynthese in humanen A549-Zellen nach einer MALP-2-Stimulationsdauer von 6 h oder 24 h mittels Western-Blot-Analyse ergab signifikant erhöhte Mengen an TLR-2-Protein im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle (Abbildung 11).

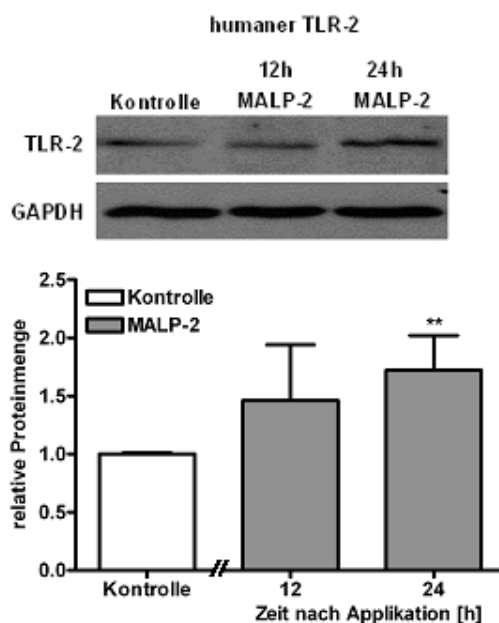


Abbildung 11: **Proteinsynthese des TLR-2 (human) nach MALP-2-Stimulation (*in vitro*).** A549-Zellen wurden mit 5 ng/ml MALP-2 12 h und 24 h oder mit entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) inkubiert. Die TLR-2-Proteinmenge im Zellhomogenat wurde mittels Western Blot analysiert. Ein repräsentativer Blot ist für vier voneinander unabhängige Experimente abgebildet. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SD ($n = 4$). ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle.

4.4 Die lokale MALP-2-Applikation verbessert die Überlebenschance bei muriner *S. pneumoniae*-Pneumonie dosisabhängig.

Die Tiere wurden 24 h nach Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung transnasal mit $7,5 \times 10^4$ Kbe (letale Dosis 50) von *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) infiziert. Für einen Zeitraum von 10 Tagen wurden die Tiere täglich überwacht und das Überleben im Abstand von 12 h dokumentiert. Die Überlebensrate der infizierten MALP-2-behandelten Tiere war mit 79,2 % signifikant höher im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe mit 37,5 % (Abbildung 12).

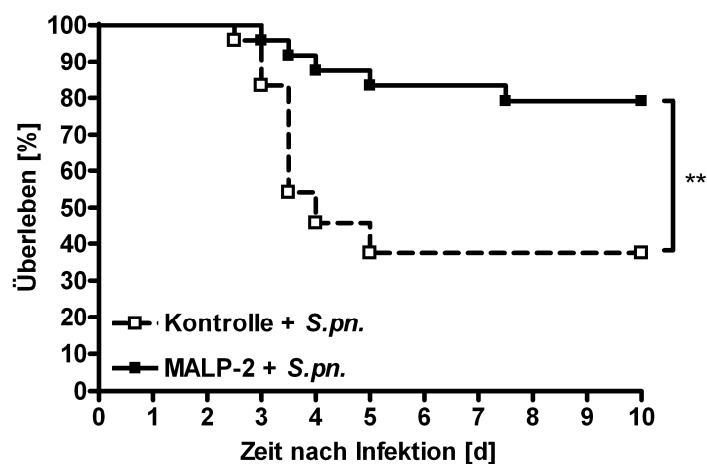


Abbildung 12: **Mortalität.** Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) mit $7,5 \times 10^4$ KbE *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Das Überleben wurde über 10 Tage beobachtet (n = 24). **p < 0,01.

Zur objektiven Bewertung des klinischen Zustandes wurde sowohl die Körpermasse (Tabelle 6), als auch die Körpertemperatur (Tabelle 7) im Abstand von 24 h dokumentiert. MALP-2-behandelte Tiere zeigten 48 h und 72 h nach Infektion signifikant geringere mittlere Körpermasseverluste im Vergleich zur Kontrollgruppe, und 72 h nach Infektion eine signifikant bessere mittlere Körpertemperatur gegenüber den Kontrolltieren.

Ergebnisse

Tabelle 6: Körpermasse [%] im Verlauf der murinen *S. pneumoniae*-Pneumonie.

Zeit [h] nach Infektion	Körpermasse [%] ^a			
	Kontrolle	(n)	MALP-2	(n)
0	100,0 ± 0	(24)	100,0 ± 0	(24)
24	95,3 ± 2,9	(24)	96,1 ± 3,5	(24)
48	95,5 ± 4,1	(24)	99,1 ± 4,8**	(24)
72	92,6 ± 9,6	(23)	100,9 ± 7,8**	(24)
96	98,4 ± 11,5	(13)	104,2 ± 8,8	(22)
120	100,7 ± 11,2	(11)	105,5 ± 8,2	(21)
144	105,1 ± 5,0	(9)	106,8 ± 6,0	(20)
168	104,9 ± 4,7	(9)	105,9 ± 6,7	(20)
192	104,6 ± 4,2	(9)	106,9 ± 4,3	(19)
216	102,4 ± 4,3	(9)	106,1 ± 4,4	(19)
240	103,5 ± 4,2	(9)	106,6 ± 5,3	(19)

^a Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. **p<0,01 vs. Kontrollgruppe. Gruppengröße, (n).

Tabelle 7: Körpertemperatur [°C] im Verlauf der murinen *S. pneumoniae*-Pneumonie.

Zeit [h] nach Infektion	Körpertemperatur [°C] ^a			
	Kontrolle	(n)	MALP-2	(n)
0	37,3 ± 0,5	(24)	37,3 ± 0,5	(24)
24	37,4 ± 0,4	(24)	37,3 ± 0,4	(24)
48	36,8 ± 0,4	(24)	37,0 ± 0,7	(24)
72	35,4 ± 2,7	(22)	37,1 ± 0,7***	(24)
96	37,1 ± 0,7	(11)	37,0 ± 0,7	(21)
120	36,0 ± 3,8	(10)	36,5 ± 2,8	(21)
144	36,7 ± 0,3	(9)	36,4 ± 0,4	(20)
168	36,8 ± 0,6	(9)	36,7 ± 1,0	(20)
192	37,1 ± 0,3	(9)	37,0 ± 0,4	(19)
216	36,8 ± 0,7	(9)	37,0 ± 0,5	(19)
240	37,1 ± 0,5	(9)	37,2 ± 0,5	(19)

^a Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. ***p<0,001 vs. Kontrollgruppe. Gruppengröße, (n).

Anschließend erfolgte die Untersuchung zur Dosisabhängigkeit der protektiven MALP-2-Vorbehandlung im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie (Abbildung 13). Die infizierten Tiere zeigten nach intratrachealer Vorbehandlung mit 0,1 µg, 0,5 µg oder 2,0 µg MALP-2 eine gesteigerte Überlebensrate im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe. Die Vorbehandlung mit 0,5 µg und 2,0 µg MALP-2 erhöhte die Überlebenschance der infizierten Tiere nochmals signifikant um 40 % im Vergleich zur niedrigsten verwendeten MALP-2-Dosis von 0,1 µg.

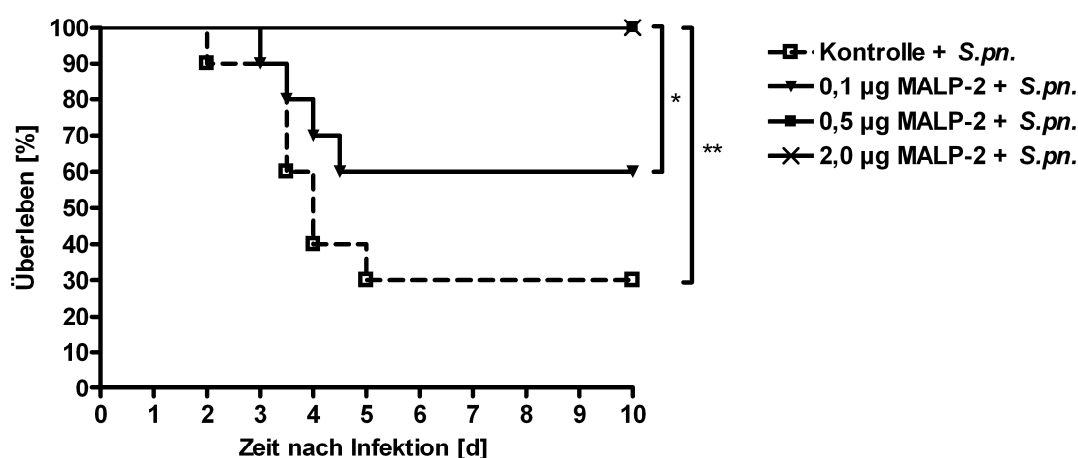


Abbildung 13: **Mortalität nach Dosisreihe.** Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,1 µg, 0,5 µg oder 2,0 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) mit $7,5 \times 10^4$ KBE *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Das Überleben wurde über 10 Tage beobachtet (n = 10). *p < 0,05 und **p < 0,01.

Der klinische Zustand infizierter Tiere nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Mengen MALP-2 wurde anhand der Körpermasseentwicklung (Tabelle 8) und Körpertemperatur (Tabelle 9) beurteilt. Die Vorbehandlung von Tieren mit 0,5 µg MALP-2 ging einher mit einer signifikant höheren Körpermasse 48 h und 72 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu kontrollbehandelten infizierten Tieren. Darüber hinaus ergab die Applikation von 2,0 µg MALP-2 deutlich geringere Körpermasseverluste 120 h nach Infektion. Signifikant bessere Werte hinsichtlich der Körpertemperatur wurden lediglich in der mit 2,0 µg MALP-2 vorbehandelten Gruppe 48 h nach Infektion beobachtet. Zu den verbleibenden Messzeitpunkten konnten keine weiteren Unterschiede bezüglich Körpermasse

Ergebnisse

und Körpertemperatur zwischen MALP-2-vorbehandelten infizierten Tieren und kontrollbehandelten infizierten Tieren festgestellt werden.

Tabelle 8: Körpermasse [%] im Verlauf der murinen *S. pneumoniae*-Pneumonie (Dosisreihe).

Zeit [h] nach Infektion	Körpermasse [%] ^a			
	Kontrolle (n)	MALP-2 (n) 0,1 µg	MALP-2 (n) 0,5 µg	MALP-2 (n) 2,0 µg
0	100,0 ± 0,0 (10)	100,0 ± 0,0 (10)	100,0 ± 0,0 (10)	100,0 ± 0,0 (10)
24	98,6 ± 2,1 (10)	97,6 ± 4,0 (10)	99,2 ± 3,9 (10)	97,0 ± 3,8 (10)
48	96,8 ± 5,2 (10)	99,2 ± 6,9 (10)	100,5 ± 4,6* (10)	95,5 ± 3,8 (10)
72	93,1 ± 10,0 (9)	97,7 ± 10,0 (10)	105,2 ± 5,5**(10)	99,1 ± 4,4 (10)
96	100,8 ± 8,7 (4)	103,9 ± 9,5 (7)	107,4 ± 7,5 (10)	105,5 ± 4,5 (10)
120	99,4 ± 11,6 (4)	107,3 ± 3,2 (6)	108,2 ± 6,9 (10)	108,1 ± 4,0* (10)
144	106,5 ± 5,5 (3)	105,8 ± 1,0 (6)	108,9 ± 6,2 (10)	109,1 ± 3,2 (10)
168	105,0 ± 4,9 (3)	105,3 ± 2,3 (6)	107,3 ± 5,6 (10)	108,0 ± 3,6 (10)
192	106,0 ± 4,2 (3)	106,6 ± 2,0 (6)	108,0 ± 5,1 (10)	108,8 ± 3,1 (10)
216	104,0 ± 2,1 (3)	105,9 ± 2,0 (6)	107,5 ± 5,7 (10)	107,2 ± 2,5 (10)
240	106,0 ± 3,1 (3)	107,3 ± 2,2 (6)	108,3 ± 4,3 (10)	109,0 ± 3,0 (10)

^a Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. *p<0,05 und **p<0,01 vs. Kontrollgruppe. Gruppengröße, (n).

Tabelle 9: **Körpertemperatur [°C] im Verlauf der murinen *S. pneumoniae*-Pneumonie (Dosisreihe).**

Zeit [h] nach Infektion	Körpertemperatur [°C] ^a			
	Kontrolle (n)	MALP-2 (n) 0,1 µg	MALP-2 (n) 0,5 µg	MALP-2 (n) 2,0 µg
0	37,5 ± 0,7 (10)	37,5 ± 0,5 (10)	37,7 ± 0,5 (10)	37,5 ± 0,4 (10)
24	37,4 ± 0,4 (10)	37,5 ± 0,6 (10)	37,4 ± 0,5 (10)	37,7 ± 0,4 (10)
48	36,8 ± 0,9 (9)	36,6 ± 1,0 (10)	37,1 ± 0,5 (10)	37,8 ± 0,6**(10)
72	36,4 ± 1,2 (9)	36,9 ± 0,7 (9)	36,9 ± 0,4 (10)	36,9 ± 0,4 (10)
96	36,7 ± 1,0 (4)	36,6 ± 1,6 (7)	37,1 ± 0,2 (10)	36,8 ± 0,4 (10)
120	37,1 ± 0,4 (3)	37,0 ± 0,5 (6)	37,2 ± 0,5 (10)	36,9 ± 0,6 (10)
144	36,9 ± 0,8 (3)	37,2 ± 0,6 (6)	37,6 ± 0,3 (10)	37,2 ± 0,3 (10)
168	37,0 ± 0,0 (3)	36,5 ± 0,3 (6)	37,0 ± 0,4 (10)	36,7 ± 0,6 (10)
192	36,5 ± 0,6 (3)	36,9 ± 0,7 (6)	37,2 ± 0,5 (10)	36,8 ± 0,6 (10)
216	36,7 ± 0,4 (3)	36,3 ± 0,4 (6)	37,2 ± 0,6 (10)	36,8 ± 0,5 (10)
240	37,2 ± 0,4 (3)	37,0 ± 0,4 (6)	36,9 ± 0,6 (10)	37,0 ± 0,7 (10)

^a Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD. **p<0,01 vs. Kontrollgruppe. Gruppengröße, (n).

4.5 MALP-2 erhöht den Einstrom von Entzündungszellen in die infizierte Lunge

Zur Untersuchung der Rekrutierung von Entzündungszellen in die infizierte Mauslunge wurden die Tiere 24 h nach Applikation von MALP-2 oder Kontrolllösung transnasal mit 1×10^6 KBE von *S. pneumoniae* infiziert. Die nicht-infizierten behandelten Versuchsgruppen erhielten entsprechend PBS zur Kontrolle transnasal appliziert. Die BAL wurde 48 h nach der Infektion durchgeführt und die in der BALF enthaltenen Leukozyten sowohl quantifiziert, als auch differenziert. MALP-2-behandelte, nicht-infizierte Tiere wiesen im Vergleich zu den entsprechend behandelten Kontrolltieren eine erhöhte Zahl an polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), Alveolarmakrophagen und Lymphozyten auf. Bereits eine schwere Infektion mit *S. pneumoniae* resultierte ohne zusätzlichen Stimulus in einer Leukozytenrekrutierung in die Lunge. In der Versuchsgruppe der MALP-2-vorbehandelten und anschließend infizierten Tiere wurde ein weiterer signifikant erhöhter Einstrom der untersuchten Leukozytenpopulationen im Vergleich zu den kontrollbehandelten infizierten Tieren beobachtet (Abbildung 14).

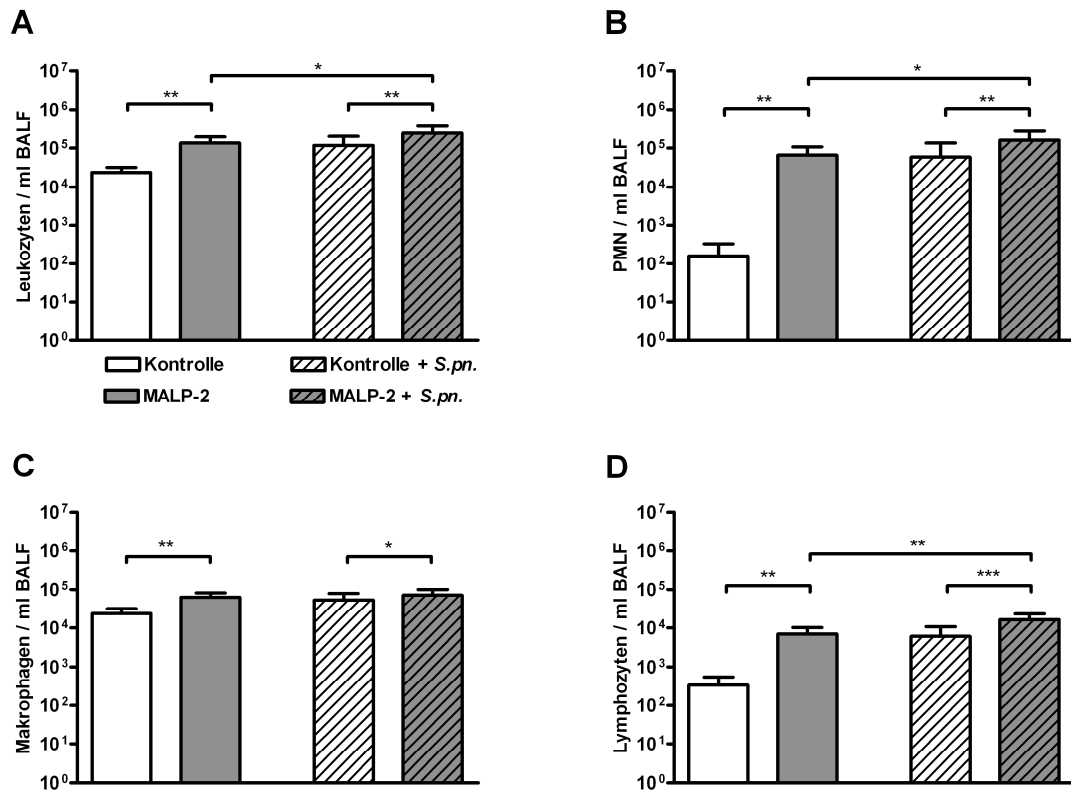
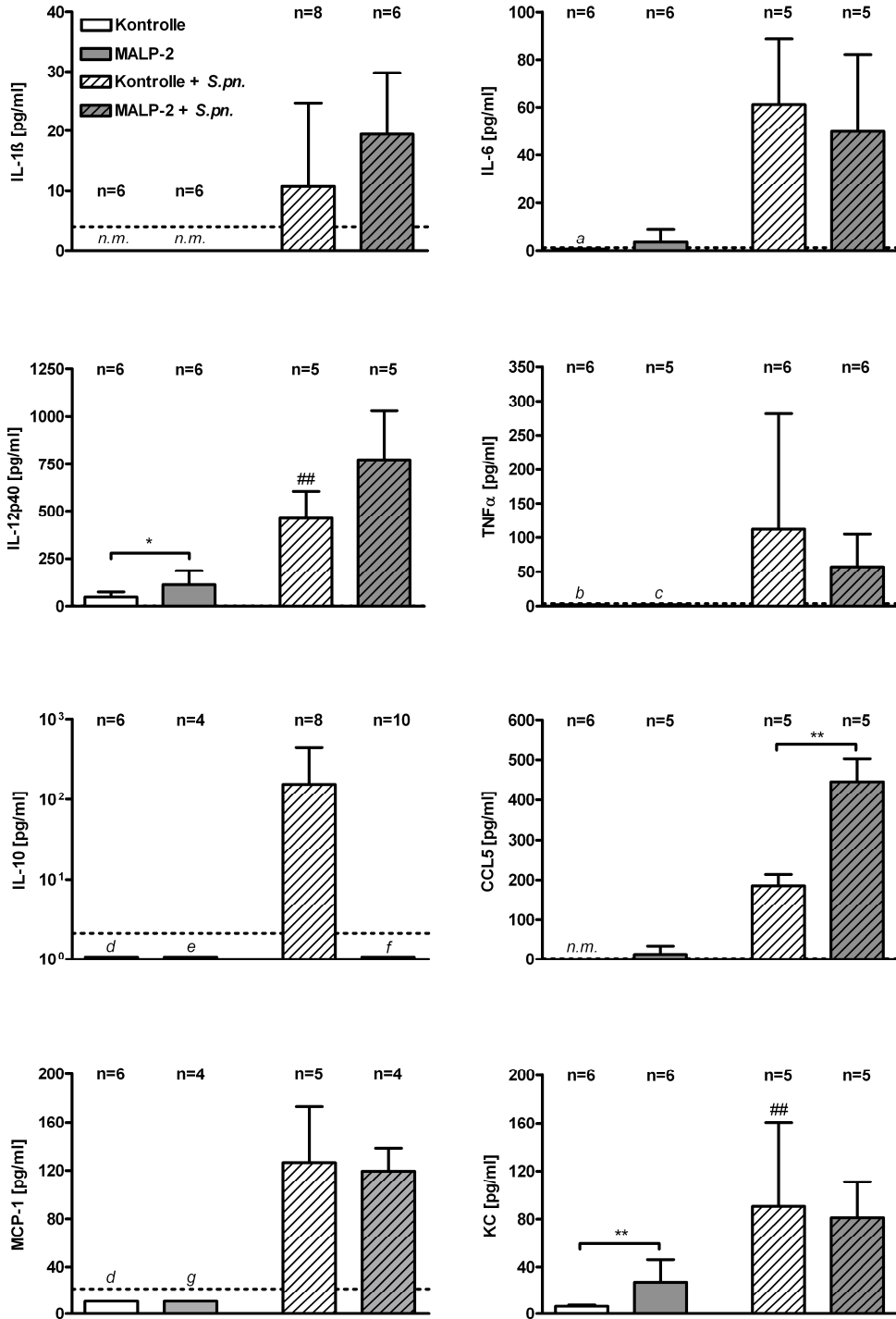


Abbildung 14: **Leukozytenrekritierung in den bronchoalveolären Raum 48 h nach Infektion.** Den Tieren wurde 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal appliziert. Nach 24 h erfolgte die Infektion mit 1×10^6 Kbe *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS. Nach weiteren 48 h wurde eine BAL durchgeführt und die Leukozytenzahl (A) der BALF in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zahl der PMN (B), Alveolarmakrophagen (C) und Lymphozyten (D) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert \pm SD (nicht-infizierte Tiere n = 6; *S. pneumoniae*-infizierte Tiere n = 14-15). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001.

4.6 MALP-2 modifiziert die Produktion von Entzündungsmediatoren in der Lunge im Verlauf der *S. pneumoniae*-Pneumonie

Um den Einfluss von MALP-2 auf die Entzündungsreaktion während der *S. pneumoniae*-Pneumonie genauer zu definieren, erfolgte die Untersuchung der lokalen Entzündungsmediatoren 48 h nach Infektion. Die Tiere wurden 24 h nach Instillation von 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung in die Lunge mit 1×10^6 KBE von *S. pneumoniae* infiziert. Nicht-infizierte Tiere erhielten 20 µl PBS transnasal appliziert. Es wurde 48 h nach Infektion eine BAL durchgeführt und die Lavageflüssigkeit zentrifugiert. Im Überstand der BALF wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10, CCL5 (RANTES), KC, MCP-1, MIP-1 α , GM-CSF, IFN- γ und G-CSF gleichzeitig im *Cytokine Multiplex Assay* quantifiziert (Abbildung 15). Bei den kontrollbehandelten Tieren stieg die Produktion aller gemessenen Zytokine 48 h nach Infektion deutlich an. Nicht-infizierte Tiere zeigten 48 h nach MALP-2-Applikation eine signifikante Erhöhung des Gehaltes von IL-12p40 und KC in der BALF. Die Vorbehandlung der Lunge mit MALP-2 vor der Infektion mit *S. pneumoniae* bewirkte lediglich eine signifikant erhöhte Produktion von CCL5 und eine deutlich verminderte Konzentration von IL-10 im Vergleich zu kontrollbehandelten, infizierten Tieren. Dagegen zeigten sich die Spiegel der übrigen gemessenen Zytokine 48 h nach Infektion weitgehend unverändert gegenüber den kontrollbehandelten infizierten Tieren.

Ergebnisse



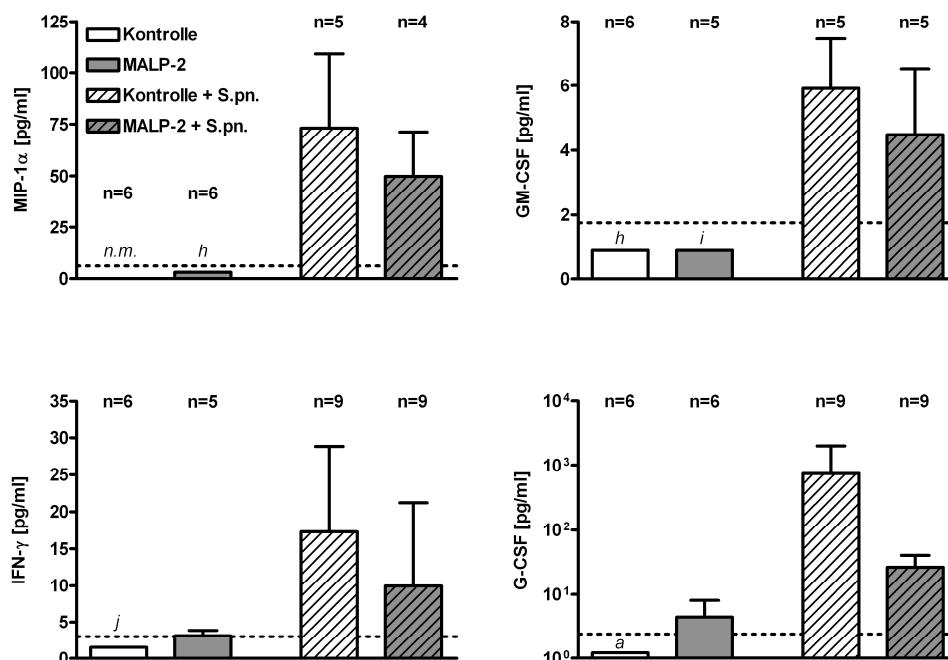


Abbildung 15: **Zytokine im bronchoalveolären Raum 48 h nach Infektion.** Den Tieren wurden 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal appliziert. Nach 24 h erfolgte die Infektion mit 1×10^6 KBE *S. pneumoniae* (*S.pn.*) oder PBS. Nach weiteren 48 h wurde eine BAL durchgeführt und die Zytokine IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNF-α, IL-10, CCL5 (RANTES), KC, MCP-1, MIP-1α, GM-CSF, IFN-γ und G-CSF gleichzeitig mittels Bioplex Assay quantifiziert. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± SD (Kontroll-infizierte Tiere n = 4-6; *S. pneumoniae*-infizierte Tiere n = 4-9). Untere Detektionsgrenze des *Cytokine Multiplex Assays* (= Strichlinie). *p < 0,05; **p < 0,01. ###p < 0,01 vs. nicht-infizierter Kontrollgruppe. Aus technischen Gründen der Zytokinmessung differieren die Gruppengrößen.

n.m. (nicht messbar): n = 6: Messwert = 0

^a n = 6: Messwert unterhalb der unteren Detektionsgrenze (< u.D.) des *Cytokine Multiplex Assays*

^b n = 4: Messwert < u.D. und n = 2: Messwert = 0

^c n = 4: Messwert < u.D. und n = 1: Messwert = 0

^d n = 1: Messwert < u.D. und n = 5: Messwert = 0

^e n = 1: Messwert < u.D. und n = 3: Messwert = 0

^f n = 2: Messwert < u.D. und n = 8: Messwert = 0

^g n = 2: Messwert < u.D. und n = 2: Messwert = 0

^h n = 3: Messwert < u.D. und n = 3: Messwert = 0

ⁱ n = 1: Messwert < u.D. und n = 4: Messwert = 0

^j n = 5: Messwert < u.D. und n = 1: Messwert = 0

4.7 MALP-2 modifiziert die Verteilung von *S. pneumoniae* in der Mauslunge

Für die Analyse der Bakterienlast der Lunge wurden die Tiere 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung transnasal mit 1×10^6 KbE von *S. pneumoniae* infiziert. Nach weiteren 24 h, 48 h und 72 h wurde die Keimzahl (*S. pneumoniae*) im Lungengewebe bestimmt. Die Applikation von MALP-2 im Vorfeld der Infektion bewirkte keine signifikante Reduktion der Bakterienlast der Lunge. Schwache Tendenzen hinsichtlich einer insgesamt geringeren Bakterienlast im Lungengewebe wurden bei den MALP-2-behandelten, infizierten Tieren 24 h ($p = 0,36$) und 72 h ($p = 0,07$) nach Infektion beobachtet (Abbildung 16).

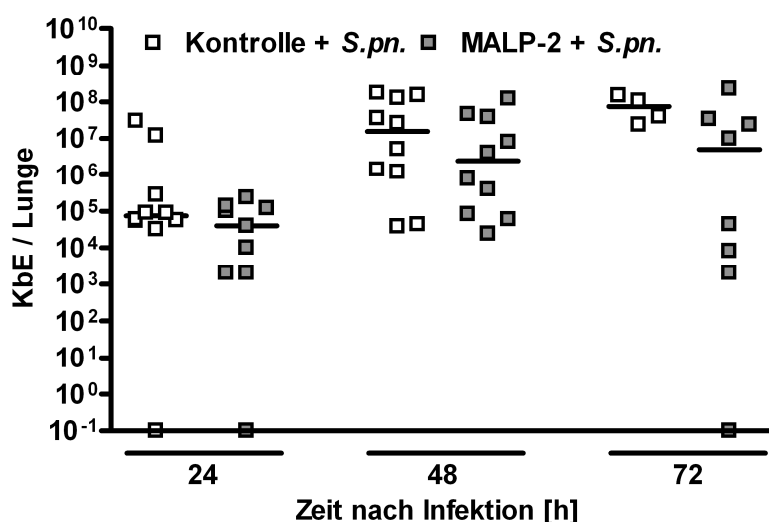


Abbildung 16: **Bakterienlast der Lunge.** Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) mit 1×10^6 KbE *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Nach 24 h, 48 h oder 72 h erfolgte die Bestimmung der Bakterienlast der Lunge. Die Werte sind als Einzelwerte und Median angegeben (n = 8-10; Ausnahme: Kontrollgruppe 72 h p.i. n = 4, da moribunde Tiere (n = 5) noch vor Versuchsende euthanasiert wurden).

Anschließend erfolgte die Analyse der Lokalisation von *S. pneumoniae* im Vergleich zur Verteilung der neutrophilen Granulozyten in der infizierten Mauslunge. Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung transnasal mit 5×10^6 KbE von *S. pneumoniae* infiziert und 48 h später präpariert. Von den Lungen wurden Gefrierschnitte hergestellt, welche anschließend zur Darstellung von neutrophilen Granulozyten (Abbildung 17 A, B) und *S. pneumoniae* (Abbildung 17 C-F) immunhistochemisch gefärbt wurden. In Lungen kontrollbehandelter infizierter Tiere wurde

S. pneumoniae hauptsächlich perivaskulär und peribronchial nachgewiesen, wohingegen MALP-2-behandelte infizierte Lungen fast keine *S. pneumoniae* im Lungengewebe aufwiesen. In beiden untersuchten Versuchsgruppen konnten Bakterien zu beiden Seiten der viszeralen Pleura beobachtet werden. Neutrophile Granulozyten wurden in allen Gruppen hauptsächlich in unmittelbarer Umgebung von *S. pneumoniae* nachgewiesen.

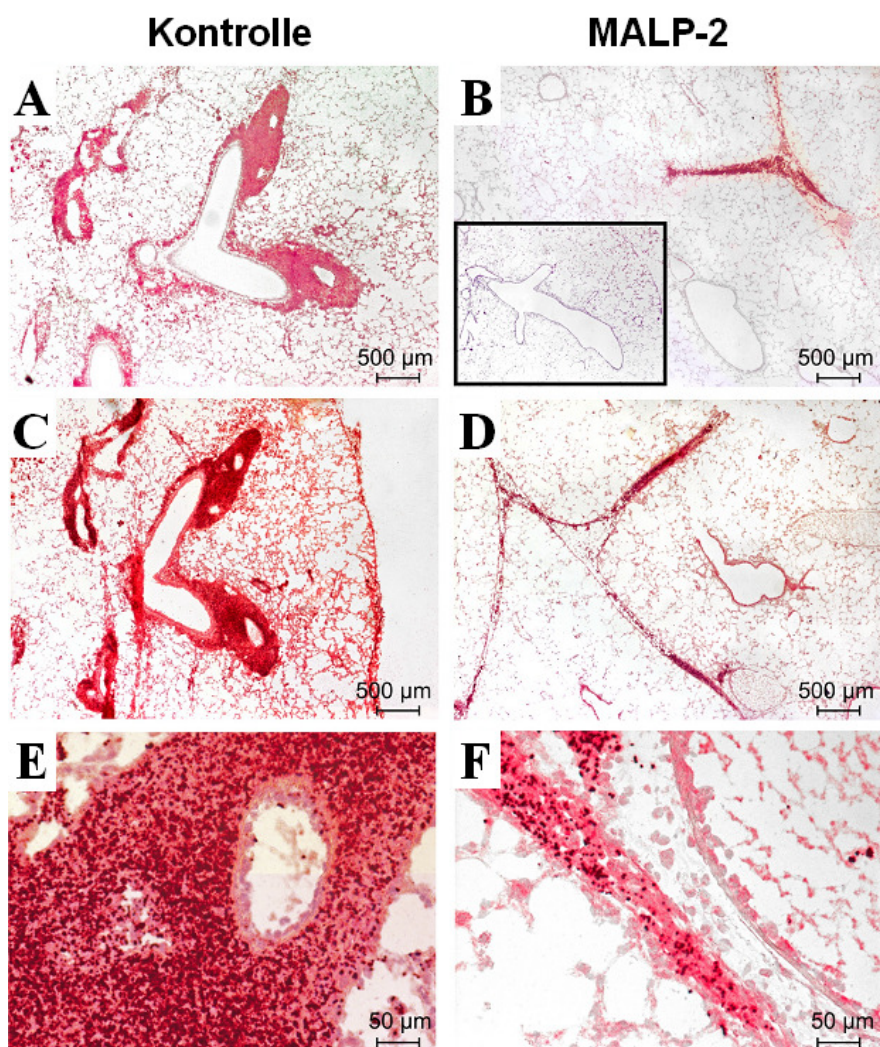


Abbildung 17: **Immunhistochemische Darstellung von neutrophilen Granulozyten und *S. pneumoniae* in der Lunge 48 h nach Infektion.** Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von Lösungsmittel (Kontrolle, linke Spalte) oder 0,5 µg MALP-2 (rechte Spalte) mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* infiziert. Nach 48 h wurden die Lungen entnommen und Gefriergewebsschnitte der Lungen angefertigt. Monoklonale Gr-1-Antikörper markieren neutrophile Granulozyten im Lungengewebe (A,B; rote Färbung = PMN; kleines Fenster in B: Isotypkontrolle). Die Darstellung von *S. pneumoniae* erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen *S. pneumoniae* (C-F; rote Färbung = Bakterien). (Repräsentativ für n = 3).

4.8 MALP-2 reduziert die bakterielle Translokation ins Blut ohne Veränderung der systemischen zellulären Immunantwort

Für die Untersuchung möglicher systemischer Effekte der lokalen MALP-2-Stimulation erfolgte zunächst die Bestimmung der Bakterienlast des Blutes. Hierfür wurden Tiere 24 h nach intratrachealer Instillation von 0,5 µg MALP-2 oder Kontrolllösung mit 1×10^6 KbE von *S. pneumoniae* transnasal infiziert. Zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurden die Tiere präpariert und die Bakterienzahl pro µl Blut bestimmt. Die Applikation von MALP-2 in die Lunge reduzierte die Bakterienlast des Blutes 72 h ($p = 0,0162$) nach Infektion signifikant (Abbildung 18).

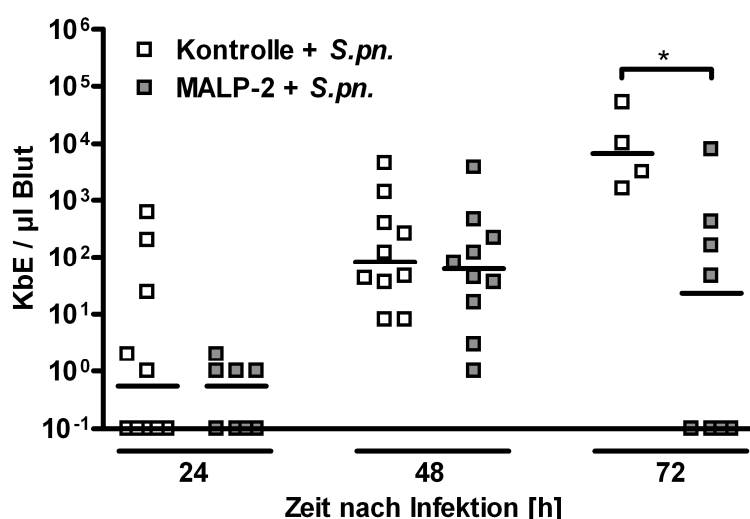


Abbildung 18: **Bakterienlast des Blutes.** Die Tiere wurden 24 h nach intratrachealer Applikation von 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) mit 1×10^6 KbE *S. pneumoniae* (*S.pn.*) infiziert. Nach 24 h, 48 h und 72 h erfolgte die Bestimmung der Bakterienlast des Blutes. Die Werte sind angegeben als Einzelwerte und Median ($n = 8-10$; Ausnahme: Kontrollgruppe 72 h p.i. $n = 4$, da moribunde Tiere ($n = 5$) noch vor Versuchsende euthanasiert wurden). * $p < 0,05$.

Zusätzlich erfolgte die Analyse der zellulären Immunantwort im Blut. Die vorbehandelten Tiere wurden 48 h nach Infektion mit 1×10^6 KbE von *S. pneumoniae* präpariert und Blut entnommen. Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Untersuchung der Leukozytenpopulationen des Blutes erfolgten im Durchflusszytometer. Zwischen den Versuchsgruppen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich Leukozytenzahl und Differentialzellbild des Blutes (Abbildung 19).

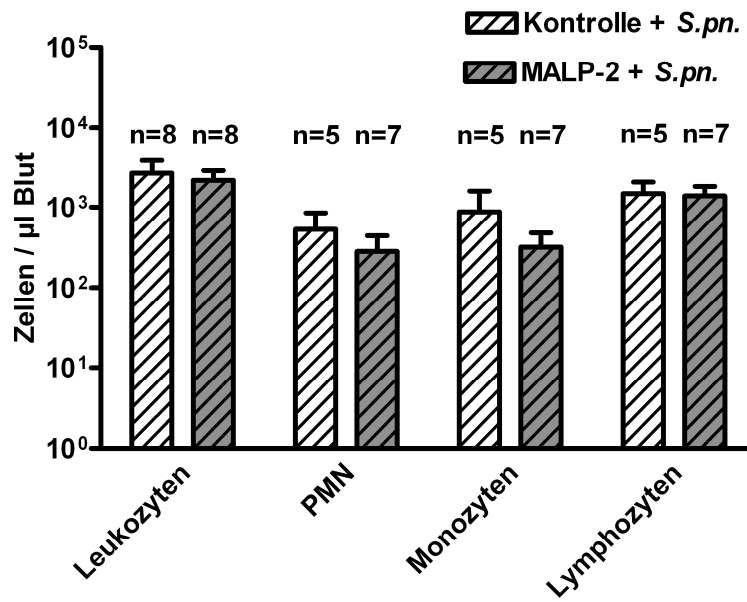


Abbildung 19: **Leukozytenrekrutierung im Blut 48 h nach Infektion.** Den Tieren wurde 0,5 µg MALP-2 oder entsprechend Lösungsmittel (Kontrolle) intratracheal appliziert. Nach 24 h erfolgte die Infektion mit 1×10^6 KfE *S. pneumoniae* (*S.pn.*). Nach weiteren 48 h wurden die Tiere präpariert und Blut entnommen. Gesamtleukozytenzahl und Zahl der PMN, Monozyten und Lymphozyten wurden im Blut mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert \pm SD angegeben (n = 5-8).

5. Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde der Einfluss der pulmonalen Immunstimulation mit dem Lipopeptid MALP-2 auf die Pathogenese und den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie untersucht.

Zunächst erfolgte die initiale Analyse des lokalen immunstimulatorischen Effektes von MALP-2 in der murinen Lunge. Dabei konnte gezeigt werden, dass die einmalige intratracheale Applikation von MALP-2 eine Rekrutierung von Leukozyten, vorrangig neutrophiler Granulozyten und Makrophagen sowie eine vermehrte Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in den bronchoalveolären Raum der Lunge von Wildtyptieren, nicht jedoch von TLR-2-defizienten Tieren bewirkte. Darüber hinaus erhöhte MALP-2 die Genexpression des TLR-2 in humanen Alveolarepithelzellen (A549) *in vitro* und in murinen Lungen *in vivo* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MALP-2 die TLR-2-abhängige angeborene Immunantwort lokal in der Mauslunge reguliert.

Um den Einfluss der MALP-2-vermittelten pulmonalen Immunstimulation auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen, wurden Tiere 24 h nach intratrachealer MALP-2-Applikation mit *S. pneumoniae* infiziert. MALP-2-vorbehandelte Tiere zeigten nachfolgend dosisabhängig höhere Überlebensraten im Vergleich zu infizierten Kontrollen. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Vorbehandlung von infizierten Tieren mit MALP-2 eine gesteigerte zelluläre Entzündungsreaktion im bronchoalveolären Raum bewirkte. Hinsichtlich der inflammatorischen Zytokine konnten eine erhöhte Freisetzung von CCL5 (RANTES) und eine verminderte Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 in der MALP-2-vorbehandelten infizierten Gruppe beobachtet werden. Die quantitative Untersuchung der Erregerelimination in der Lunge ergab keine signifikanten Unterschiede der Erregerlast im Gesamtorgan Lunge. In der immunhistochemischen Analyse der Verteilung von *S. pneumoniae* in der Lunge konnte jedoch nachgewiesen werden, dass im Lungenparenchym der MALP-2-vorbehandelten Tiere im Gegensatz zu den kontrollbehandelten infizierten Tieren nur wenige Pneumokokken lokalisiert waren. MALP-2 verbesserte also offenbar die Erregerelimination im Lungenparenchym. Darüber hinaus verminderte MALP-2 die Bakterienlast im Blut, ohne aber die Gesamtleukozytenzahl des Blutes oder das Differentialblutbild infizierter Tiere zu beeinflussen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten daraufhin, dass die lokale Applikation des TLR-2-Agonisten MALP-2 vor Infektion mit *S. pneumoniae* die angeborene Immunabwehr der Lunge verbessert und die Überlebensrate bei der murinen Pneumokokkenpneumonie erhöht.

5.1 MALP-2 stimuliert eine lokale Entzündungsreaktion in der Lunge in Abhängigkeit von TLR-2

Die Aktivierung des Rezeptorheterodimeres bestehend aus TLR-2 und TLR-6 durch MALP-2 bewirkt die Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene und nachfolgend die Induktion einer örtlich begrenzten Entzündungsreaktion (56; 78; 89). So folgte auf eine intraperitoneale Injektion von MALP-2 eine Einwanderung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in die Bauchhöhle (12). Untersuchungen zur Wundheilung zeigten weiterhin, dass auch die intradermale MALP-2-Applikation eine Infiltration des dermalen Wundgebietes mit polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen verursachte (11). Darüber hinaus konnte nach intratrachealer MALP-2-Behandlung eine erhöhte Leukozytenzahl im bronchoalveolären Raum der Rattenlunge beobachtet werden (60; 109). Untersuchungen zur pulmonalen Applikation von MALP-2 in der Maus fehlen allerdings bislang. Es existiert jedoch eine Studie zum Einfluss von MALP-2 auf das nasale mukosa-assoziierte Lymphgewebe (NALT, *nasal mucosa-associated lymphoid tissue*) der Maus (93). Die intranasale Instillation von 0,5 µg MALP-2 führte in diesem Zusammenhang zu einer Aktivierung von Immuneffektorzellen des NALT und steigerte die Expression von kostimulierenden und adhäsiven Molekülen auf der Zelloberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden im *in vivo* Mausmodell 0,5 µg MALP-2 intratracheal appliziert, um die Aktivierung des NALT zu umgehen. Nachfolgend konnte eine Rekrutierung von Leukozyten, namentlich neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, in den bronchoalveolären Raum beobachtet werden. Die Kinetik der Leukozyteneinwanderung ähnelte dabei derjenigen in MALP-2-behandelten naiven Rattenlungen (60). In beiden Modellen erreichten die Leukozytenzahlen 24 h nach der Applikation ihre maximalen Werte, wobei zu diesem Zeitpunkt die neutrophilen Granulozyten im Differentialzellbild deutlich dominierten. Makrophagen und Lymphozyten erreichten in der Ratte im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen in der Maus das

Maximum erst 72 h nach der intratrachealen Instillation von MALP-2. Die Differenz im zeitlichen Verlauf der Zellrekrutierung basiert dabei vermutlich auf tierartlichen Unterschieden zwischen Maus und Ratte.

Inflammatorische Zytokine und Chemokine spielen eine zentrale Rolle bei der Induktion und dem Verlauf einer Entzündungsreaktion. Sie aktivieren Zellen des Immunsystems sowie des umliegenden Gewebes und vermitteln die Einwanderung weiterer Entzündungszellen aus dem Blut (35). *In vitro* Studien zeigten, dass MALP-2 die Sekretion von TNF- α , IL-6, IL-8, MCP-1 und MIP-1 α/β in humanen Monozyten stimulierte (10; 48). Auch murine Peritonealmakrophagen (12) und Fibroblasten (10) wurden von MALP-2 zur Freisetzung von MCP-1 und MIP-1 α angeregt. Zusätzlich produzierten stimulierte Fibroblasten der Maus auch TNF- α und IL-6 (10). MALP-2 induzierte ferner dosisabhängig die Produktion von IL-8 und MIP-1 β in humanen neutrophilen Granulozyten (117). Schließlich konnten die *in vitro* Beobachtungen auch teilweise *in vivo* nachvollzogen werden. Dabei führte die intraperitoneale Applikation von MALP-2 in der Maus zu erhöhten Mengen von MIP-1 α in der peritonealen Lavageflüssigkeit (12). MALP-2 stimulierte ferner nach intratrachealer Applikation die Freisetzung von MCP-1 in der Rattenlunge (60). In der vorliegenden Arbeit bewirkte die intratracheale Instillation von MALP-2 bei der Maus ebenfalls eine lokale Produktion von MCP-1. Des Weiteren konnte nach pulmonaler MALP-2-Stimulation die Induktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12p40 und TNF- α , sowie der Chemokine CCL5 und KC nachgewiesen werden. Die Freisetzung des antiinflammatorischen IL-10 wurde erst 24 h nach Applikation des MALP-2 in der Mauslunge beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Produktion des IL-10 im Gegensatz zu den übrigen untersuchten proinflammatorischen Zytokinen zeitlich verzögert eintritt. Die hier präsentierten Resultate der erstmaligen Untersuchung der pulmonalen Stimulation mit MALP-2 im Mausmodell stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen bereits publizierter *in vitro* und *in vivo* Studien.

MALP-2 induziert über die Aktivierung des Rezeptorkomplexes TLR-2/6 (73; 104; 105) und nachfolgender MyD88-abhängiger Aktivierung von NF- κ B und AP-1 (25; 49; 89; 97; 119) die Genexpression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (49; 56; 78; 89). Dabei spielt der TLR-2 eine essentielle Rolle, wie bereits publizierte *in vitro* Untersuchungen belegen. So induzierte MALP-2 die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-12, TNF- α und MCP-1 in murinen Peritonealmakrophagen in Abhängigkeit von TLR-2 (104; 105). Des

Weiteren wurde beobachtet, dass murine embryonale WT-Fibroblasten, nicht jedoch TLR-2-defiziente Fibroblasten, nach MALP-2-Stimulation MCP-1 ausschütteten (73). Im Rahmen der hier diskutierten Studie erfolgte simultan zu den Untersuchungen bei Wildtyp-Tieren auch eine intratracheale Applikation von MALP-2 bei TLR-2-defizienten Tieren. In Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen *in vitro*, konnte auch *in vivo* in Abwesenheit des TLR-2 keine Induktion der inflammatorischen Entzündungsmediatoren nach der MALP-2-Behandlung beobachtet werden. Außerdem blieb die Rekrutierung von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum in den MALP-2-behandelten Tieren ohne TLR-2 aus. Somit spielt TLR-2 offensichtlich eine entscheidende Rolle bei der Immunstimulation durch MALP-2.

Zusammenfassend belegen die vorliegenden Ergebnisse, dass MALP-2 in der Mauslunge die Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und nachfolgend die Rekrutierung von Leukozyten in Abhängigkeit des TLR-2 stimuliert.

5.2 MALP-2 stimuliert die Genexpression des TLR-2

Der TLR-2 erkennt ein breites Spektrum an PAMPs von einer Vielzahl verschiedener Pathogene, einschließlich grampositiver und gramnegativer Bakterien, Mykobakterien, Pilze und Parasiten. Er nimmt somit eine wichtige Stellung in der Erregererkennung ein (102). TLR-2 ist bereits in der Phase der nasalen Kolonisation durch *S. pneumoniae* im Mausmodell an der Erregerelimination beteiligt (113). Weiterhin vermittelt TLR-2 teilweise die antimikrobielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und hat wesentlichen Anteil an der Induktion der angeborenen pulmonalen Immunabwehr bei der Pneumokokkenpneumonie (15; 50; 55; 107). Die Interaktion zwischen TLR-2 und *S. pneumoniae* ist jedoch nicht einseitig. So führte die Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer erhöhten Expression des TLR-2 *in vitro* (98) und *in vivo* (52). Eine weitere Studie belegt darüber hinaus die Beteiligung von Pneumolysin, einem relevanten Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, an der Regulation des TLR-2. Dabei wurde nachgewiesen, dass Pneumolysin über TLR-4 MyD88-abhängig NF- κ B aktiviert und die Expression des TLR-2 in der Mauslunge *in vivo* und in humanen Alveolarepithelzellen *in vitro* sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene steigerte (57). Die MyD88-vermittelte Aktivierung von NF- κ B ist ebenfalls an der Signaltransduktion des MALP-2 beteiligt (25; 49; 73; 89; 97; 104; 105; 119). Somit induziert MALP-2 nach Aktivierung von TLR-2 möglicherweise analog zu

S. pneumoniae die Genexpression des TLR-2. Diese Hypothese wird gestützt durch zwei unabhängige *in vivo* Studien. Einerseits wurden Zellen des NALT von Mäusen untersucht, die zuvor intranasal mit MALP-2 behandelt wurden. Es konnte eine Induktion der TLR-2-Genexpression in den murinen NALT-Zellen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (93). Darüber hinaus wurden erhöhte mRNA-Level des TLR-2 in Makrophagen festgestellt, die nach intratrachealer MALP-2-Applikation aus der Rattenlunge isoliert wurden (61). In der vorliegenden Arbeit konnten gleichermaßen erhöhte Mengen an TLR-2 mRNA in der Lunge von MALP-2-behandelten Mäusen beobachtet werden, die 6 h nach der intratrachealen Applikation maximale Genexpression erreichten und zu einer verstärkten Proteinproduktion des TLR-2 führten. Im Vergleich dazu wurde 6 h nach intratrachealer MALP-2-Applikation nur eine moderate Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge beobachtet, welche erst später, 24 h nach intratrachealer Applikation, ihren Höhepunkt erreichte. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die pulmonale Stimulation mit MALP-2 eine lokale Erhöhung der TLR-2-Expression unabhängig von einer erhöhten Zellzahl in der Mauslunge bewirkte.

TLR-2 wird sowohl von Bronchialepithelzellen (32) als auch von Alveolarepithelzellen Typ II (2; 16) exprimiert. Die epitheliale Barriere der Lunge bildet die größte Kontaktfläche zwischen einem Organismus und seiner Umwelt, so dass die Bronchial- und Alveolarepithelzellen durch die Expression des TLR-2 entscheidend zur Erregererkennung und Induktion der pulmonalen Immunabwehr beitragen (13; 67). MALP-2 stimulierte in der aktuellen Studie *in vitro* die Genexpression des TLR-2 in humanen Alveolarepithelzellen. Dabei stieg die Expression des TLR-2 auf mRNA-Ebene bereits nach dreistündiger MALP-2-Inkubation an und erreichte maximale Werte nach 9 h MALP-2-Stimulation. Die erhöhten mRNA-Level resultierten nachfolgend in einer Zunahme der TLR-2-Proteinmenge. Eine Steigerung der Genexpression des TLR-2 konnte weiterhin in humanen Monozyten und epidermalen Keratinozyten 4 h bzw. 8 h nach Stimulation mit MALP-2 *in vitro* nachgewiesen werden. Dermale Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen des Menschen exprimierten erst 24 h nach Stimulation mit MALP-2 vermehrt TLR-2 (10). Darüber hinaus rief MALP-2 auch in Alveolarmakrophagen der Ratte eine erhöhte Genexpression des TLR-2 hervor (101).

Die *in vivo* und *in vitro* Ergebnisse deuten darauf hin, dass MALP-2 die Genexpression des TLR-2 in der epithelialen Barriere der Lunge stimuliert und somit die Pathogenerkennung im Initialstadium einer pulmonalen Infektion verbessert.

5.3 MALP-2 verbessert den klinischen Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie

Eine inadäquate Immunantwort erhöht das Risiko, an einer Pneumokokkenpneumonie zu erkranken und fördert den progredienten Verlauf einer pulmonalen Infektion (21; 30; 59; 88). Mehrere *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass die lokale Stimulation der pulmonalen Immunantwort möglicherweise eine vielversprechende Interventionsstrategie bei Infektionen der Lunge darstellt. So aktivierte die intratracheale Applikation von zyklischem di-GMP, einem Protein der bakteriellen Signaltransduktionskaskade, die unspezifische Immunantwort der Lunge und erhöhte die Überlebensrate bei der murinen *Klebsiella pneumoniae*-Pneumonie (47). Der synthetische TLR-9-Agonist CpG-ODN bewirkte bei der pulmonalen Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* ähnliche protektive Effekte in der Maus (14). Darüber hinaus senkte die intratracheale Instillation des TLR-4-Agonisten LPS nach Rekrutierung von aktiven neutrophilen Granulozyten die Mortalität beim akuten Lungenversagen (ALI) der Ratte, hervorgerufen durch eine pulmonale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (43). Eine weitere Studie zeigte, dass ein aerosolisiertes Lysat von *Haemophilus influenzae* eine pulmonale Immunantwort induzierte und somit den letalen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie bei der Maus verhinderte (7). In der vorliegenden Arbeit wurde im etablierten murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie untersucht, welchen Effekt die spezifische TLR-2-vermittelte pulmonale Immunstimulation auf den Verlauf der Pneumonie ausübt. Dafür erfolgte eine intratracheale Applikation von MALP-2 und nachfolgend zum Zeitpunkt der maximalen MALP-2-stimulierten Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum (24 h p.a.) eine Infektion mit *S. pneumoniae*. MALP-2-behandelte infizierte Tiere zeigten im Vergleich zu den infizierten Kontrollen höhere Überlebensraten bei der Pneumokokkenpneumonie. Des Weiteren verringerte MALP-2 im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe 48 h und 72 h nach Infektion den mittleren Körpermasseverlust (Tabelle 6) und verbesserte 72 h nach Infektion die mittlere Körpertemperatur (Tabelle 7). Erfahrungen mit dem murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie zeigten, dass die Tiere zwischen 24 h und 48 h nach der Infektion klinisch erkranken und die Zeitpunkte 48 h und 72 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* kritisch für den Erkrankungsverlauf sind. In der

Literatur fand sich bislang nur eine weitere Arbeit, in der in Zusammenhang mit der Immunstimulation bei pulmonaler Infektion eine Messung der Körpermasse bei der Maus vorgenommen wurde. Dort konnte gezeigt werden, dass die intranasale Vorbehandlung mit einem LPS-Derivat den Körpermasseverlust im Verlauf einer pulmonalen Influenzavirusinfektion (A/HK/68; H3N2) reduzierte (8).

Die vorliegende Studie am murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie belegt zudem erstmals, dass die Überlebensrate bei schwerem Verlauf dieser bakteriell-bedingten Lungenentzündung mit steigender MALP-2-Dosis weiter zunimmt.

Publizierte *in vivo* Untersuchungen weisen darauf hin, dass höhere Konzentrationen von MALP-2 (100 µg/kg) vermutlich eine ausgeprägtere lokale Entzündungsreaktion induzieren, welche mit negativen Auswirkungen auf den Organismus wie Fieber, Anorexie und reduzierter motorischer Aktivität einhergehen kann (51). Diese Hypothese wird gestützt durch eine *in vivo* Studie an Ratten, die den immunstimulatorischen Effekt von unterschiedlichen MALP-2-Konzentrationen in der Lunge untersuchte. In dieser Arbeit wurde mit zunehmender Konzentration des MALP-2 eine gesteigerte Rekrutierung von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum beobachtet (60). In der Literatur wird ferner in Verbindung mit der subkutanen Applikation einer hohen Dosis von MALP-2 (100 µg/kg) eine zentrale Regulation der Körpertemperatur diskutiert. Dabei wird vermutet, dass MALP-2 durch Induktion von IL-6 und Prostaglandin E₂ (PGE₂) thermoregulatorische Strukturen im Gehirn aktiviert und die Körpertemperatur erhöht (51). In der vorliegenden Arbeit verbesserte die Vorbehandlung der Tiere mit einer höheren Dosis MALP-2 (2,0 µg) jedoch die Überlebensrate der Pneumokokkenpneumonie ohne signifikante Reduktion der Körpermasse oder Anzeichen von Hyperthermie bei den mit 2,0 µg MALP-2 behandelten infizierten Tieren im Vergleich zu den infizierten Kontrollen. Ein negativer Einfluss einer höheren Dosis MALP-2 (2,0 µg) auf den Krankheitsverlauf der Pneumokokkenpneumonie konnte demnach in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die lokale Immunstimulation mit MALP-2 vor der Infektion mit *S. pneumoniae* die Überlebensrate bei der murinen Pneumokokkenpneumonie dosisabhängig erhöht. Darüber hinaus reduziert MALP-2 (0,5 µg) die Änderung von Körpermasse und Körpertemperatur im Verlauf der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae*.

5.4 MALP-2 modifiziert die pulmonale Entzündungsreaktion in der Pneumonie

Studien in verschiedenen murinen Infektionsmodellen belegen, dass die lokale Immunstimulation vor bakteriellen Infektionen zu einer verstärkten örtlich begrenzten Akkumulation von unspezifischen Immunzellen führt und somit den klinischen Verlauf der Infektion verbessert. So erhöhte MALP-2 bei der polymikrobiellen Peritonitis die Rekrutierung von Leukozyten in den peritonealen Raum und verbesserte den klinischen Verlauf der nachfolgenden Sepsis (19). Auch der TLR-9-Agonist CpG-ODN (115) sowie LPS (20), ein Ligand des TLR-4, bewirkten höhere Überlebensraten bei nachfolgender akuter polymikrobieller Sepsis, indem sie die angeborene zelluläre Immunantwort bereits vor dem infektiösen Reiz aktivierten. Die pulmonale Stimulation unter Verwendung von CpG-ODN (14) oder di-GMP (47) führte ferner zu einer erhöhten Rekrutierung vorrangig neutrophiler Granulozyten in die Lunge und reduzierte somit die Sterblichkeit bei der *Klebsiella pneumoniae*-Pneumonie. Darüber hinaus stimulierte LPS nach intratrachealer Applikation die Einwanderung von funktionell aktiven neutrophilen Granulozyten in den bronchoalveolären Raum der Ratte. Die dadurch intensivierete Immunantwort wirkte protektiv gegenüber einer nachfolgenden experimentellen Pneumonie, hervorgerufen durch *Pseudomonas aeruginosa* (43). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten und erweiterten die Aussagen der publizierten Literatur. So konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit MALP-2 im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie die Einwanderung von Leukozyten in die Lunge erhöht und die pulmonale Immunabwehr sowie den klinischen Verlauf der schweren Pneumonie verbesserte.

Bakterielle Bestandteile können bei infektiösen Erkrankungen einschließlich Pneumonien auch eine übermäßige TLR-vermittelte Aktivierung von Immunzellen auslösen. Anschließend entwickelt sich eine überschießende Entzündungsreaktion, die schädigend auf den Organismus wirkt. Experimentelle Studien in verschiedenen Modellen der schweren Sepsis bestätigten dabei die zentrale Rolle der TLR. So wurde gezeigt, dass TLR-Antagonisten, beispielsweise monoklonale TLR-2-Antikörper, die exzessiven Zytokinmengen im Blut und die Sterblichkeitsrate bei schwerer Sepsis reduzierten (24; 68). Daher ist auch in Zusammenhang mit der gezielten TLR-vermittelten Immunstimulation bei pulmonalen Infektionen die Überwachung der Entzündungsreaktionen notwendig. Im murinen Modell der *Klebsiella pneumoniae*-Pneumonie erfolgte die Kontrolle der Entzündungsreaktion anhand der Zytokinfreisetzung in die infizierte Lunge. Es wurde beobachtet, dass die pulmonale Immunstimulation mit CpG-ODN eine erhöhte Freisetzung von IL-12, TNF- α und IFN- γ

bewirkte (14). Auch die Verwendung von di-GMP analog zu CpG-ODN ergab hinsichtlich IL-12 und IFN- γ vergleichbare Resultate (47). In der vorliegenden Arbeit erfolgte 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* eine Messung der lokalen Zytokinfreisetzung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit. Die pulmonale Infektion mit *S. pneumoniae* ging erwartungsgemäß mit einer vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren einher. Interessanterweise wirkte sich die pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 vor Infektion mit *S. pneumoniae* jedoch unterschiedlich auf das Niveau der einzelnen Zytokine in der Pneumonie aus. Während eine vermehrte Freisetzung von CCL5 (=RANTES) beobachtet wurde, konnte eine reduzierte Produktion von IL-10 festgestellt werden. Das Niveau von IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α , KC, MCP-1, MIP-1 α , GM-CSF und IFN- γ blieb indessen in MALP-2-vorbehandelten gegenüber kontrollbehandelten morbidem Lungen weitgehend unverändert. IL-10 und CCL5 spielen eine wichtige Rolle im Ablauf der Immunantwort bei Pneumokokkeninfektionen. So konnte gezeigt werden, dass exogenes IL-10 Makrophagen/Monozyten inaktivierte und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen sowie reaktiver Stickstoffverbindungen im Verlauf einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis bei der Ratte reduzierte (53). IL-10 verringerte in einem murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie die Freisetzung von TNF- α in der Lunge (111). In derselben Studie erhöhte IL-10 die Erregerlast der Lunge sowie die Sterblichkeitsrate bei der murinen Pneumokokkenpneumonie. Die intraperitoneale Applikation von IL-10-Antikörpern reduzierte dagegen die Zahl an Pneumokokken in der Lunge und verbesserte die Überlebensrate der pulmonalen Pneumokokkeninfektion (111). Des Weiteren wurde beobachtet, dass IL-10 die Empfänglichkeit für eine sekundär erworbene Pneumokokkenpneumonie nach einer Influenzainfektion steigerte (112). CCL5 wurde nach experimenteller Besiedelung der murinen Nasenschleimhaut durch *S. pneumoniae* vermehrt exprimiert. Erfolgte die Blockade des CCL5 mit spezifischen Antikörpern, so entwickelte sich aufgrund einer ungenügenden lokalen und systemischen T-Zell-Antwort aus dieser symptomlosen Besiedelung des Nasen-Rachen-Raumes eine Pneumokokkenpneumonie mit letalem Verlauf (84). Diese Ergebnisse anderer Studien unterstützen die Vermutung, dass die in der aktuellen Untersuchung beobachtete verringerte Produktion von IL-10 und ebenso die erhöhte Freisetzung von CCL5 infolge der präventiven MALP-2-Behandlung zu einer verbesserten pulmonalen Immunabwehr bei der Pneumokokkenpneumonie beitragen könnte. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die lokale Immunstimulation mit MALP-2 vor der Infektion mit *S. pneumoniae* die zelluläre Immunantwort in der Lunge

erhöht, was mit einer vermehrten Freisetzung von CCL5 und einer verringerten Produktion von IL-10 einhergeht. Somit verbessert MALP-2 offenbar die lokale Immunabwehr bei der Pneumokokkenpneumonie.

5.5 MALP-2 verbessert die pulmonale Abwehr von *S. pneumoniae*

Die TLR-spezifische Immunstimulation mit LPS (20), CpG-ODN (115) sowie MALP-2 (19) verbesserte die Erregerelimination im Modell der murinen akuten polymikrobiellen Sepsis. Darüber hinaus zeigten Untersuchungen zur Erregerlast der Lunge nach wiederholter Aspiration von *Klebsiella pneumoniae*, dass Bakterien in den unteren Atemwegen initial die lokale Immunabwehr der Lunge stimulierten und somit die Proliferation nachfolgend aspirierter Erreger verminderten (3). Verschiedene weitere Publikationen bekräftigten diese Feststellung. So reduzierte die pulmonale Applikation eines aerosolisierten Lysates von *Haemophilus influenzae* (NTHi) die Bakterienlast der Lunge bei der letalen Pneumokokkenpneumonie der Maus (7). Di-GMP (47) und CpG-ODN (14) stimulierten ferner die angeborene Immunantwort und verbesserten somit die Elimination von *Klebsiella pneumoniae* in Blut und Lunge. Eine pulmonale Instillation des TLR-4-Agonisten LPS vor Induktion eines akuten Lungenversagens durch pulmonale Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa*, ergab in der Ratte vergleichbare Effekte (43).

In der vorliegenden Studie wurde eine immunhistochemische Analyse von Lungengewebsschnitten zur Untersuchung der Erregerverteilung in der murinen Pneumokokkenpneumonie durchgeführt. Auf diese Weise konnte *S. pneumoniae* in kontrollbehandelten pneumonischen Tieren im Lungenparenchym vorrangig peribronchial und perivaskulär in großer Zahl nachgewiesen werden. Der perivaskuläre Raum stellt dabei ein einzigartiges Kompartiment in der Umgebung von pulmonalen Arterien der Lunge dar. Er wird von spezialisierten Kapillaren gebildet, die in Zusammenhang mit unterschiedlichsten Immunreaktionen einen schnellen Übertritt von Leukozyten aus dem Blut in das umliegende Lungengewebe ermöglichen (82). In pneumonischen Lungen von MALP-2-vorbehandelten Tieren konnte *S. pneumoniae* jedoch nur vereinzelt peribronchial und perivaskulär lokalisiert werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Vorbehandlung mit MALP-2 die Erregerelimination vermutlich aufgrund der gesteigerten lokalen Immunantwort verbessert. In den pleuralen Bereichen der MALP-2-vorbehandelten infizierten Lungen wurden dagegen hohe Erregermengen beobachtet, die auf einen lokal begrenzten protektiven Effekt des MALP-2 innerhalb des Lungengewebes hinweisen. Die Bakterienzahl in den pleuralen

Gebieten blieb in MALP-2-vorbehandelten pneumonischen Lungen im Vergleich zu pneumonischen Kontrollungen unverändert hoch und beherrschte deshalb wahrscheinlich die Gesamterregerlast der Lunge. Aus diesem Grund konnte vermutlich keine signifikante Reduktion der quantitativen Erregerlast der gesamten Lunge von MALP-2-stimulierten Tieren nachgewiesen werden.

Die pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 bei der murinen Pneumokokkenpneumonie verbessert offenbar die Erregerelimination im Lungengewebe. Dieser Effekt ist jedoch lokal begrenzt, da bereits pleurale Bereiche keine Veränderungen der Erregerlast nach intratrachealer MALP-2-Applikation mehr aufweisen.

5.6 MALP-2 reduziert die Bakteriämie im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie

In der experimentellen murinen Pneumokokkenpneumonie kam es im Verlauf der Erkrankung zu einem Übertritt der Erreger in das Blut. Diese Bakteriämie führt in der Mehrzahl der letalen Fälle bei Pneumokokkenpneumonie zur Ausbildung einer Sepsis. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Bakterienzahl im Blut von MALP-2-vorbehandelten infizierten Tieren im Vergleich zu infizierten Kontrollen reduziert war. Die Messung der Leukozytenzahl im Blut ergab hingegen keine Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten infizierten Tieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine durch MALP-2 verbesserte angeborene Immunantwort in der Lunge den Übertritt von *S. pneumoniae* aus dem Lungengewebe in den Blutkreislauf behindert und folglich die Prävalenz der Bakteriämie und Sepsis senkt. In der Literatur finden sich ähnliche Beobachtungen. So bewirkte die pulmonale Immunstimulation mit CpG-ODN (14) oder di-GMP (47) vor der Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* eine Verminderung der Bakterienzahl im Blut. Bedauerlicherweise erfolgte in diesem Zusammenhang keine Analyse der Entzündungsreaktion im Blut. Die lokale Applikation des MALP-2 erhöhte im Rahmen der aktuellen Untersuchungen nicht nur die pulmonale Genexpression des TLR-2, sie stimulierte auch die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass MALP-2 auch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Makrophagen steigert (73; 74). NO wirkt nachfolgend bakterizid, indem es in Bakterien mit Eisenionen von Schlüsselenzymen der Atmungskette und der DNA-Synthese interagiert (26). Des Weiteren erhöht MALP-2 die phagozytotische Aktivität und den „oxidative burst“ in neutrophilen

Granulozyten (117). MALP-2 verbessert also bei einer Infektion auch die antimikrobielle Aktivität der Entzündungszellen im Bereich einer lokalen Entzündungsreaktion.

Somit könnte die pulmonale Vorbehandlung mit MALP-2 durch eine Verbesserung der zellulären Immunantwort in der Lunge und eine erhöhte antimikrobielle Aktivität der Entzündungszellen einem Übertritt von *S. pneumoniae* aus dem Lungengewebe in das Gefäßsystem entgegen wirken. Vermutlich wurde das Auftreten von Bakteriämie und Sepsis in der murinen Pneumokokkenpneumonie durch MALP-2 aus diesen Gründen reduziert.

5.7 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass MALP-2 durch Aktivierung des TLR-2 eine unspezifische Immunantwort in der Lunge stimuliert und daher die Immunabwehr der Lunge sowie die Erregerelimination nach der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* verbesserte. Dies führte zu einer erhöhten Überlebensrate der experimentellen Pneumokokkenpneumonie in der Maus.

Das Risiko, an einer Pneumonie, insbesondere einer Pneumokokkenpneumonie, zu erkranken, steigt bei Menschen mit geschwächter Immunabwehr der Lunge. Besonders betroffen sind dabei Patienten mit akuten und chronischen Erkrankungen (21; 30; 88). Die Immunsuppression beispielsweise infolge eines Schlaganfalles begünstigt nachweislich die Entstehung von Sepsis und bakteriell-bedingten Pneumonien (87). Des Weiteren wird auch bei der lebenserhaltenden oder lebensverlängernden maschinellen Beatmung des Menschen ein gehäuftes Auftreten von sekundären Lungeninfektionen beobachtet (59). Da in vielen experimentellen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass die lokale Immunstimulation die Elimination verschiedener Erreger in der Lunge und den Verlauf von Pneumonien unterschiedlicher Genese verbessern konnte (7; 14; 43; 47), wäre eine vergleichbare Anwendung bei prädisponierten Patienten theoretisch denkbar. Die Art und Dauer der immunstimulierenden Therapie beim Menschen muss jedoch vorab noch eruiert werden. Der Einsatz einer zusätzlichen Immunstimulation in Kombination mit einer etablierten Therapie wird auf anderen Gebieten der Medizin bereits an morbidem Patienten geprüft (1; 66). Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit ein human-pathogener Erreger in einem Mausmodell verwendet wurde. Die Ergebnisse dieser Studie sind nicht ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragbar. Eine bereits publizierte Studie an gesunden Menschen belegt

jedoch, dass eine lokale Applikation von LTA sowie von LPS eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge bewirkte. Bei der Verwendung dieser TLR-2- bzw. TLR-4-Agonisten wurden Unterschiede im Aktivierungsgrad der neutrophilen Granulozyten beobachtet (39). Deshalb wäre zunächst eine Untersuchung der Auswirkung einer intrapulmonalen MALP-2-Applikation an gesunden Probanden sinnvoll, um einen möglichen Einsatz von MALP-2 zur Prävention von sekundären Lungeninfektionen bei Risikopatienten vorzubereiten.

Die Verwendung der lokalen Immunstimulation mit MALP-2 als therapeutische Maßnahme bei der Pneumokokkenpneumonie ist möglicherweise von geringerem Nutzen, da durch eine zusätzliche TLR-2-Stimulation eine übermäßige Zytokinfreisetzung und nachfolgend eine überschießende Entzündungsreaktion mit negativen Effekten auf den Pneumonieverlauf ausgelöst werden könnte. Entsprechende Daten liegen jedoch noch nicht vor.

6. Zusammenfassung

Pulmonale Immunstimulation mit Lipopeptid MALP-2: Einfluss auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie in der Maus

Die ambulant erworbene Pneumonie ist eine der häufigsten lebensbedrohlichen Infektionserkrankungen der heutigen Industrieländer und geht mit hoher Morbidität und Mortalität einher. *S. pneumoniae* ist der häufigste Erreger der AEP. Eine inadäquate Immunantwort, hervorgerufen durch akute oder chronische Primärerkrankungen, Langzeitbeatmung oder Sepsis-assoziierte Immunparalyse, erhöht das Risiko, an einer Pneumokokkenpneumonie zu erkranken. Spezifische Strategien zur Verbesserung der angeborenen Immunabwehr der Lunge fehlen jedoch weitgehend. *In vivo* Studien zeigten, dass die lokale Immunstimulation mit bakteriellen Bestandteilen oder spezifischen synthetischen TLR-Agonisten die pulmonale Immunabwehr verbessern und protektiv bei verschiedenen nachfolgenden Lungeninfektionen wirkt. Die pulmonale Immunstimulation vor einer Infektion stellt somit möglicherweise eine vielversprechende alternative Therapiestrategie dar. Der *toll-like* Rezeptor 2 (TLR-2) erkennt neben Lipoteichonsäure und Peptidoglykanen auch Lipoproteine und Lipopeptide und ist bei der Pneumokokkenpneumonie an der Induktion einer frühen Immunantwort beteiligt. Eine spezifische Stimulation des TLR-2 mit dem synthetischen MALP-2 bewirkte darüber hinaus die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen *in vitro* und die lokale Rekrutierung von Entzündungszellen *in vivo*.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, den Einfluss einer TLR-2-spezifischen lokalen Immunstimulation mit dem synthetischen Lipopeptid MALP-2 auf die pulmonale Immunantwort, die Erregerelimination und den klinischen Verlauf bei der Pneumokokkenpneumonie im etablierten Mausmodell zu untersuchen. Dabei wurde zunächst die Auswirkung von MALP-2 auf das angeborene Immunsystem der Lunge analysiert. Dazu erfolgte *in vivo* die intratracheale Applikation von MALP-2 und nachfolgend die Untersuchung der lokalen Zytokinfreisetzung und der Rekrutierung von Entzündungszellen in den bronchoalveolären Raum. Zusätzlich wurde die Rolle des TLR-2 anhand von Wildtyp- und TLR-2-defizienten Mäusen *in vivo* sowie in Zellkultur *in vitro* eruiert. In weiteren experimentellen Untersuchungen wurden Tiere 24 h nach intratrachealer Applikation von MALP-2 mit *S. pneumoniae* infiziert. Anschließend erfolgte die Analyse der lokalen

Entzündungsreaktion sowie des klinischen Verlaufes bei der murinen Pneumokokkenpneumonie. Beachtung fanden hierbei insbesondere die pulmonale Zytokinproduktion und Leukozytenrekrutierung in den Atemwegen sowie die Erregerelimination und die Überlebensraten im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie.

Die lokale Applikation von MALP-2 in die Lunge bewirkte in Abhängigkeit von TLR-2 die lokale Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie die Rekrutierung von Leukozyten in den bronchoalveolären Raum. MALP-2 erhöhte darüber hinaus die Genexpression des TLR-2 in der Lunge *in vivo* und in humanen Alveolarepithelzellen *in vitro* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Die lokale Applikation von MALP-2 24 h vor der intranasalen Infektion mit *S. pneumoniae* verursachte eine erhöhte Freisetzung von CCL5 (RANTES) in Verbindung mit einer gesteigerten Rekrutierung von Leukozyten und einer verminderten Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 in den bronchoalveolären Raum. Die Gesamtleukozytenzahl und das Differentialzellbild im Blut blieben jedoch unverändert. Klinisch zeigten MALP-2-vorbehandelte Tiere im Vergleich zu kontrollbehandelten infizierten Tieren höhere Überlebensraten sowie weniger Gewichtsverlust und Abfall der Körpertemperatur bei der Pneumokokkenpneumonie. MALP-2 bewirkte ferner eine Reduktion der Bakteriämie und verbesserte die Elimination von *S. pneumoniae* im Lungenparenchym.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 vor der Infektion mit *S. pneumoniae* die lokale Immunabwehr verbessert und die Überlebensrate der murinen Pneumokokkenpneumonie erhöht. Die präventive lokale Immunstimulation könnte somit für Patienten mit einem erhöhten Risiko, an einer Pneumokokkenpneumonie zu erkranken, eine vielversprechende pharmakologische Interventionsstrategie darstellen.

7. Summary

Pulmonary immunostimulation with lipopeptide MALP-2: effect on the course of murine pneumococcal pneumonia

Community-acquired pneumonia (CAP) is a significant cause of morbidity and mortality worldwide, and *Streptococcus pneumoniae* is the major causative agent of CAP. The risk of pneumococcal pneumonia may be greatly increased in specific pathologic situations with impaired pulmonary host defense including acute or chronic primary diseases, long-term ventilation or sepsis-associated immune paralysis. However, specific strategies to strengthen the pulmonary host defense are rare. Pre-activation of the pulmonary immune system with bacterial components or specific synthetic TLR-agonists has been reported to improve local host defense and increase resistance to various experimental pulmonary infections. Thus, pulmonary immune stimulation prior to infection may be a promising alternative therapeutic strategy. Toll-like receptor-2 (TLR-2) recognizes microbial components including lipoteichoic acid, peptidoglycan as well as lipoproteins and lipopeptides. TLR-2 contributes to the induction of early immune responses in pneumococcal pneumonia. Further, TLR-2 specific stimulation with MALP-2 induced the release of proinflammatory cytokines *in vivo* and recruited leukocytes to the local site of stimulation *in vivo*.

In the current study, the effect of local TLR-2 mediated immune stimulation with MALP-2 on the pulmonary host defense, the bacterial clearance and the course of pneumococcal pneumonia was investigated in a murine model of pneumococcal pneumonia. Mice were treated with intratracheal injections of MALP-2 and the pulmonary innate immune response was analysed including inflammatory cytokine release and leukocyte recruitment into the bronchoalveolar space. In addition, the role of TLR-2 was investigated *in vivo* using wildtype and TLR-2-deficient mice, as well as *in vitro*, human alveolar epithelial cells. Furthermore, mice were infected with *S. pneumoniae* 24 h after intratracheal MALP-2 application. The pulmonary immune response and the course of murine pneumococcal pneumonia after MALP-2 pretreatment were examined with respect to pulmonary cytokine production, leukocyte immigration, bacterial clearance and survival rates.

In the presence of TLR-2, intratracheal MALP-2 application evoked inflammatory cytokine and chemokine release, resulting in leukocyte immigration into the bronchoalveolar space. MALP-2 increased TLR-2 expression levels at both mRNA and protein level in murine lungs

in vivo and in human alveolar epithelial cells *in vitro*. Pulmonary pretreatment with MALP-2 24 h before intranasal pneumococcal infection resulted in increased levels of CCL5 (RANTES) associated with augmented leukocyte recruitment, and decreased levels of anti-inflammatory IL-10 in the bronchoalveolar lavage fluid. Blood leukocyte numbers and populations remained unchanged. Importantly, MALP-2-pretreated as compared to untreated mice showed increased survival, decreased loss of body weight as well as reduced hypothermia in pneumococcal pneumonia. MALP-2 also reduced bacteremia and improved pneumococcal clearance in lung parenchyma.

In conclusion, pulmonary immunostimulation with MALP-2 before infection with *S. pneumoniae* improved local host defense and increased survival in murine pneumococcal pneumonia. Thus, preventive pulmonary immunostimulation may provide a promising pharmacological strategy for high-risk patients to improve pneumococcal pneumonia outcome.

8. Literaturverzeichnis

1. **Arevalo I, Tulliano G, Quispe A, Spaeth G, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A and Pollack H.** Role of imiquimod and parenteral meglumine antimoniate in the initial treatment of cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44: 1549-1554, 2007.
2. **Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, Robertson J, Witherden IR, Tetley TD and Millar AB.** Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31: 241-245, 2004.
3. **Ben David I, Price SE, Bortz DM, Greineder CF, Cohen SE, Bauer AL, Jackson TL and Younger JG.** Dynamics of Intrapulmonary Bacterial Growth in a Murine Model of Repeated Microaspiration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 476-482, 2005.
4. **Borsutzky S, Fiorelli V, Ebensen T, Tripiciano A, Rharbaoui F, Scoglio A, Link C, Nappi F, Morr M, Butto S, Cafaro A, Muhlradt PF, Ensoli B and Guzman CA.** Efficient mucosal delivery of the HIV-1 Tat protein using the synthetic lipopeptide MALP-2 as adjuvant. *Eur J Immunol* 33: 1548-1556, 2003.
5. **Borsutzky S, Kretschmer K, Becker PD, Muhlradt PF, Kirschning CJ, Weiss S and Guzman CA.** The mucosal adjuvant macrophage-activating lipopeptide-2 directly stimulates B lymphocytes via the TLR2 without the need of accessory cells. *J Immunol* 174: 6308-6313, 2005.
6. **Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Corral RS, Guzman CA and Malchiodi EL.** Prime-boost immunization with cruzipain co-administered with MALP-2 triggers a protective immune response able to decrease parasite burden and tissue injury in an experimental *Trypanosoma cruzi* infection model. *Vaccine* 26: 1999-2009, 2008.
7. **Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, Moghaddam SJ, Scott BL, Melicoff E, Adachi R, Dickey BF and Tuvim MJ.** Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 1322-1330, 2008.
8. **Cluff CW, Baldrige JR, Stover AG, Evans JT, Johnson DA, Lacy MJ, Clawson VG, Yorgensen VM, Johnson CL, Livesay MT, Hershberg RM and Persing DH.** Synthetic toll-like receptor 4 agonists stimulate innate resistance to infectious challenge. *Infect Immun* 73: 3044-3052, 2005.

9. **Cockeran R, Durandt C, Feldman C, Mitchell TJ and Anderson R.** Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect Dis* 186: 562-565, 2002.
10. **Cole M, Cox S, Inman E, Chan C, Mana M, Helgerson S and Tawil B.** Fibrin as a delivery vehicle for active macrophage activator lipoprotein-2 peptide: in vitro studies. *Wound Repair Regen* 15: 521-529, 2007.
11. **Deiters U, Barsig J, Tawil B and Muhlradt PF.** The macrophage-activating lipopeptide-2 accelerates wound healing in diabetic mice. *Exp Dermatol* 13: 731-739, 2004.
12. **Deiters U and Muhlradt PF.** Mycoplasmal lipopeptide MALP-2 induces the chemoattractant proteins macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha), monocyte chemoattractant protein 1, and MIP-2 and promotes leukocyte infiltration in mice. *Infect Immun* 67: 3390-3398, 1999.
13. **Delclaux C and Azoulay E.** Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J Suppl* 42: 10s-14s, 2003.
14. **Deng JC, Moore TA, Newstead MW, Zeng X, Krieg AM and Standiford TJ.** CpG Oligodeoxynucleotides Stimulate Protective Innate Immunity against Pulmonary Klebsiella Infection. *J Immunol* 173: 5148-5155, 2004.
15. **Dessing MC, Florquin S, Paton JC and van der PT.** Toll-like receptor 2 contributes to antibacterial defence against pneumolysin-deficient pneumococci. *Cell Microbiol* 10: 237-246, 2008.
16. **Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P and Vollmer E.** Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol* 119: 103-108, 2003.
17. **Empey KM, Hollifield M and Garvy BA.** Exogenous heat-killed Escherichia coli improves alveolar macrophage activity and reduces Pneumocystis carinii lung burden in infant mice. *Infect Immun* 75: 3382-3393, 2007.
18. **Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev A, Equils O and Arditi M.** Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 166: 2018-2024, 2001.
19. **Feterowski C, Novotny A, Kaiser-Moore S, Muhlradt PF, Rossmann-Bloeck T, Rump M, Holzmann B and Weighardt H.** Attenuated pathogenesis of polymicrobial

- peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *Int Immunol* 17: 1035-1046, 2005.
20. **Feterowski C, Weighardt H, Emmanuilidis K, Hartung T and Holzmann B.** Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *Eur J Immunol* 31: 1268-1277, 2001.
 21. **File TM.** Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: A cause for concern. *Am J Med* 117: 39-50, 2004.
 22. **Flo TH, Halaas O, Torp S, Ryan L, Lien E, Dybdahl B, Sundan A and Espevik T.** Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* 69: 474-481, 2001.
 23. **Galanos C, Gumenscheimer M, Muhlradt P, Jirillo E and Freudenberg M.** MALP-2, a Mycoplasma lipopeptide with classical endotoxic properties: end of an era of LPS monopoly? *J Endotoxin Res* 6: 471-476, 2000.
 24. **Gao H, Leaver SK, Burke-Gaffney A and Finney SJ.** Severe sepsis and Toll-like receptors. *Semin Immunopathol* 2007.
 25. **Garcia J, Lemercier B, Roman-Roman S and Rawadi G.** A Mycoplasma fermentans-derived synthetic lipopeptide induces AP-1 and NF-kappa B activity and cytokine secretion in macrophages via the activation of mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 273: 34391-34398, 1998.
 26. **Garcia X and Stein F.** Nitric oxide. *Semin Pediatr Infect Dis* 17: 55-57, 2006.
 27. **Georges H, Leroy O, Vandebussche 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.
 28. **Gorelik E, Wiltrout RH, Okumura K, Habu S and Herberman RB.** Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int J Cancer* 30: 107-112, 1982.
 29. **Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF and Suerbaum S.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer Medizin Verlag* 6. Auflage: 213-218, 2009.
 30. **Hament JM, Kimpen JLL, Fleer A and Wolfs TFW.** Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 189-195, 1999.

31. **Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E and Rohde M.** Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73: 4653-4667, 2005.
32. **Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismuller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH and Modlin RL.** Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol* 171: 6820-6826, 2003.
33. **Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringer U and Beutler B.** CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433: 523-527, 2005.
34. **Hof H and Dörries R.** Medizinische Mikrobiologie. *Thieme Verlag* 3. Auflage: 315-317, 2005.
35. **Holländer GA.** Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis. *Urban & Fischer Verlag* 1. Auflage: 7-38, 2006.
36. **Holländer GA.** Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis. *Urban & Fischer Verlag* 1. Auflage: 39-133, 2006.
37. **Holländer GA.** Immunologie - Grundlagen für Klinik und Praxis. *Urban & Fischer Verlag* 1. Auflage: 147-177, 2006.
38. **Holzappel B and Wickert L.** Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biologie in unserer Zeit* 37: 120-126, 2007.
39. **Hoogerwerf JJ, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Pater JM, de Boer A, Tanck M, Lundell DL, Her-Jenh C, Draing C, von Aulock S and van der PT.** Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 178: 34-41, 2008.
40. **Huntemann I and Lorenz J.** Ambulant Erworbene Pneumonie (AEP) - Community Acquired Pneumonia (CAP). 2004. Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie. *Ref Type: Report*
41. **Irvin CG and Bates JH.** Measuring the lung function in the mouse: the challenge of size. *Respir Res* 4: 4, 2003.
42. **Janssens S and Beyaert R.** Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 16: 637-646, 2003.
43. **Jean D, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, Leclercq R, Lafuma C, Brun-Buisson C, Harf A and Delclaux C.** Protective effect of endotoxin instillation on subsequent

- bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1702-1708, 1998.
44. **Jedrzejak MJ.** Pneumococcal virulence factors: Structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 187-207, 2001.
 45. **Johnson CM and Tapping RI.** Microbial products stimulate human Toll-like receptor 2 expression through histone modification surrounding a proximal NF-kappaB-binding site. *J Biol Chem* 282: 31197-31205, 2007.
 46. **Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC and Andrew PW.** The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* 6: 288-301, 2008.
 47. **Karaolis DK, Newstead MW, Zeng X, Hyodo M, Hayakawa Y, Bhan U, Liang H and Standiford TJ.** Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia. *Infect Immun* 75: 4942-4950, 2007.
 48. **Kaufmann A, Muhlradt PF, Gernsma D and Sprenger H.** Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by 12 Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2. *Infect Immun* 67: 6303-6308, 1999.
 49. **Kawai T and Akira S.** Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13: 460-469, 2007.
 50. **Knapp S, Wieland CW, van't Veer C, Takeuchi O, Akira S, Florquin S and van der Poll T.** Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 172: 3132-3138, 2004.
 51. **Knorr C, Hubschle T, Murgott J, Muhlradt P, Gerstberger R and Roth J.** Macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) induces a localized inflammatory response in rats resulting in activation of brain sites implicated in fever. *Brain Res* 1205: 36-46, 2008.
 52. **Koedel U, Angele B, Rupprecht T, Wagner H, Roggenkamp A, Pfister HW and Kirschning CJ.** Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 170: 438-444, 2003.
 53. **Koedel U, Bernatowicz A, Frei K, Fontana A and Pfister HW.** Systemically (but not intrathecally) administered IL-10 attenuates pathophysiologic alterations in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol* 157: 5185-5191, 1996.

-
54. **Leonhardt H.** Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. *Thieme Verlag* 8. Auflage: 403-409, 1990.
 55. **Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, Espinosa M and Landmann R.** Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by Granulocytes. *Infect Immun* 73: 8397-8401, 2005.
 56. **Li Q and Verma IM.** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2: 725-734, 2002.
 57. **Lim JH, Ha U, Sakai A, Woo CH, Kweon SM, Xu H and Li JD.** Streptococcus pneumoniae synergizes with nontypeable Haemophilus influenzae to induce inflammation via upregulating TLR2. *BMC Immunol* 9: 40, 2008.
 58. **Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E and Guzman CA.** The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol* 34: 899-907, 2004.
 59. **Lorente L, Blot S and Rello J.** Evidence on measures for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 30: 1193-1207, 2007.
 60. **Lührmann A, Deiters U, Skokowa J, Hanke M, Gessner JE, Muhlradt PF, Pabst R and Tschernig T.** In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of Mycoplasma fermentans after pulmonary application. *Infect Immun* 70: 3785-3792, 2002.
 61. **Lührmann A, Grote K, Stephan M, Tschernig T and Pabst R.** Local pulmonary immune stimulation by the Toll-like receptor 2 and 6 ligand MALP-2 in rats is age dependent. *Immunol Lett* 108: 167-173, 2007.
 62. **Lührmann A, Tschernig T and Pabst R.** Stimulation of bronchus-associated lymphoid tissue in rats by repeated inhalation of aerosolized lipopeptide MALP-2. *Pathobiology* 70: 266-269, 2002.
 63. **Lührmann A, Tschernig T, Pabst R and Niewiesk S.** Improved intranasal immunization with live-attenuated measles virus after co-inoculation of the lipopeptide MALP-2. *Vaccine* 23: 4721-4726, 2005.
 64. **Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR and Golenbock DT.** Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 1966-1971, 2003.

65. **Matsukura S, Kokubu F, Kubo H, Tomita T, Tokunaga H, Kadokura M, Yamamoto T, Kuroiwa Y, Ohno T, Suzaki H and Adachi M.** Expression of RANTES by normal airway epithelial cells after influenza virus A infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 255-264, 1998.
66. **McHutchison JG, Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Shiffman M, Afdhal NH, Jacobson IM, Muir A, Al Adhami M, Morris ML, Lekstrom-Himes JA, Efler SM and Davis HL.** Phase 1B, randomized, double-blind, dose-escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. *Hepatology* 46: 1341-1349, 2007.
67. **Medzhitov R.** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449: 819-826, 2007.
68. **Meng G, Rutz M, Schiemann M, Metzger J, Grabiec A, Schwandner R, Luppa PB, Ebel F, Busch DH, Bauer S, Wagner H and Kirschning CJ.** Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113: 1473-1481, 2004.
69. **Mitchell TJ, Andrew PW, Saunders FK, Smith AN and Boulnois GJ.** Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* 5: 1883-1888, 1991.
70. **Mizgerd JP.** Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 358: 716-727, 2008.
71. **Moll KJ and Moll M.** Anatomie. Elsevier Verlag 17. Auflage:435-437, 2002.
72. **Moll KJ and Moll M.** Anatomie. Elsevier Verlag 17. Auflage: 430-434, 2002.
73. **Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM and Muhlradt PF.** Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* 32: 3337-3347, 2002.
74. **Muhlradt PF, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R and Jung G.** Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *J Exp Med* 185: 1951-1958, 1997.
75. **Musher DM.** Infektionskrankheiten: Erkrankungen durch grampositive Bakterien /Pneumokokkeninfektionen. In: *Harrisons Innere Medizin* 1, edited by Dietel M, Dudenhausen J and Suttorp N. *ABW Wissenschaftsverlag* 15. Auflage: 974-980, 2003.
76. **Mytar B, Siedlar M, Woloszyn M, Ruggiero I, Pryjma J and Zembala M.** Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity. *Br J Cancer* 79: 737-743, 1999.

-
77. **Niebuhr M, Muhlradt PF, Wittmann M, Kapp A and Werfel T.** Intracutaneous injection of the macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2) which accelerates wound healing in mice--a phase I trial in 12 patients. *Exp Dermatol* 17: 1052-1056, 2008.
 78. **O'Neill LA and Bowie AG.** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 7: 353-364, 2007.
 79. **Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, Into T, Yasuda M, Yoshimura A, Hara Y, Hasebe A, Golenbock DT, Morita M, Kuroki Y, Ogawa T and Shibata K.** Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by toll-like receptors 2 and 6. *Infect Immun* 72: 1657-1665, 2004.
 80. **Omueti KO, Beyer JM, Johnson CM, Lyle EA and Tapping RI.** Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* 280: 36616-36625, 2005.
 81. **Pabst R, Durak D, Roos A, Luhrmann A and Tschernig T.** TLR2/6 stimulation of the rat lung: effects on lymphocyte subsets, natural killer cells and dendritic cells in different parts of the air-conducting compartments and at different ages. *Immunology* 126: 132-139, 2009.
 82. **Pabst R and Tschernig T.** Perivascular capillaries in the lung: An important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol* 110: 209-214, 2002.
 83. **Pack RJ, Al Ugaily LH and Morris G.** The cells of the tracheobronchial epithelium of the mouse: a quantitative light and electron microscope study. *J Anat* 132: 71-84, 1981.
 84. **Palaniappan R, Singh S, Singh UP, Singh R, Ades EW, Briles DE, Hollingshead SK, Royal W, III, Sampson JS, Stiles JK, Taub DD and Lillard JW, Jr.** CCL5 modulates pneumococcal immunity and carriage. *J Immunol* 176: 2346-2356, 2006.
 85. **Pallares R, Fenoll A and Linares J.** The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 22 Suppl 1: S15-S24, 2003.
 86. **Pletz MWR.** Ambulant erworbene Pneumonie - Häufige Erreger und Antibiotikaresistenz. *Pneumologie* 2: 17-27, 2005.

-
87. **Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volker HD and Meisel A.** Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med* 198: 725-736, 2003.
 88. **Pugin J.** Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp* 280: 21-27, 2007.
 89. **Rawadi G, Ramez V, Lemercier B and Roman-Roman S.** Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in murine macrophages: involvement in cytokine synthesis. *J Immunol* 160: 1330-1339, 1998.
 90. **Reinert RR, Al Lahham A, Lemperle M, Tenholte C, Briefs C, Haupts S, Gerards HH and Luttkicken R.** Emergence of macrolide and penicillin resistance among invasive pneumococcal isolates in Germany. *J Antimicrob Chemother* 49: 61-68, 2002.
 91. **Reinert RR, Reinert S, van der LM, Cil MY, Al Lahham A and Appelbaum P.** Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2903-2913, 2005.
 92. **Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, Winckler U, Morr M, Ensoli B, Muhlradt PF and Guzman CA.** The *Mycoplasma*-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol* 32: 2857-2865, 2002.
 93. **Rharbaoui F, Westendorf A, Link C, Felk S, Buer J, Gunzer M and Guzman CA.** The *Mycoplasma*-derived macrophage-activating 2-kilodalton lipopeptide triggers global immune activation on nasal mucosa-associated lymphoid tissues. *Infect Immun* 72: 6978-6986, 2004.
 94. **Robert Koch-Institut.** Zur Impfung gegen Pneumokokken-Infektionen. *Epid Bull* 12: 97-99, 2000.
 95. **Robert Koch-Institut.** Pneumokokken-Impfung mit 7-valentem Konjugatimpfstoff für Kinder unter 2 Jahren. *Epid Bull* 31: 255-259, 2006.
 96. **Rosseau S and Suttorp N.** Ambulant erworbene Infektionen der Atemwege und des Lungenparenchyms. *Internist* 41: 1158-1169, 2000.

97. **Sacht G, Marten A, Deiters U, Sussmuth R, Jung G, Wingender E and Muhlradt PF.** Activation of nuclear factor-kappaB in macrophages by mycoplasmal lipopeptides. *Eur J Immunol* 28: 4207-4212, 1998.
98. **Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, Opitz B, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N and Hippenstiel S.** Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappa B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L730-L737, 2006.
99. **Schmidt J, Welsch T, Jager D, Muhlradt PF, Buchler MW and Marten A.** Intratumoural injection of the toll-like receptor-2/6 agonist 'macrophage-activating lipopeptide-2' in patients with pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *Br J Cancer* 97: 598-604, 2007.
100. **Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Muhlradt PF, Schmidt J and Marten A.** Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut* 53: 355-361, 2004.
101. **Shingu K, Kruschinski C, Luhrmann A, Grote K, Tschernig T, von Horsten S and Pabst R.** Intratracheal macrophage-activating lipopeptide-2 reduces metastasis in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 316-321, 2003.
102. **Takeda K and Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17: 1-14, 2005.
103. **Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K and Akira S.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451, 1999.
104. **Takeuchi O, Kaufmann A, Grote K, Kawai T, Hoshino K, Morr M, Muhlradt PF and Akira S.** Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* 164: 554-557, 2000.
105. **Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K and Akira S.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 13: 933-940, 2001.
106. **te Velde AA and Figdor CG.** Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Melanoma Res* 1: 303-309, 1992.

107. **Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR and Modlin RL.** Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 291: 1544-1547, 2001.
108. **Todar K.** 2005 Streptococcus pneumoniae: Pneumococcal pneumonia [Online]. 2005.
109. **Tschernig T, Luhrmann A and Pabst R.** Recruitment of lymphocytes and dendritic cells from the blood to the bronchoalveolar space and the draining lymph nodes after a single intrabronchial application of the lipopeptide MALP-2. *Pathobiology* 70: 260-265, 2002.
110. **Uehara A, Sugawara S and Takada H.** Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol* 51: 626-634, 2002.
111. **van der Poll T, Marchant A, Keogh CV, Goldman M and Lowry SF.** Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 174: 994-1000, 1996.
112. **van der Sluijs KF, van Elden LJ, Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, Goldman M, Jansen HM, Lutter R and van der PT.** IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 172: 7603-7609, 2004.
113. **van Rossum AM, Lysenko ES and Weiser JN.** Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by Streptococcus pneumoniae in a murine model. *Infect Immun* 73: 7718-7726, 2005.
114. **von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A and Uhlig S.** Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Critl Care Med* 157: 263-272, 1998.
115. **Weighardt H, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H and Holzmann B.** Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response. *J Immunol* 165: 4537-4543, 2000.
116. **Weigt H, Muhlradt PF, Emmendorffer A, Krug N and Braun A.** Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology* 207: 223-233, 2003.

117. **Wilde I, Lotz S, Engelmann D, Starke A, van Zandbergen G, Solbach W and Laskay T.** Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes. *Med Microbiol Immunol* 196: 61-71, 2007.
118. **Witzenrath M, Guthier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de IT, Jr., Rosseau S, Suttorp N and Schutte H.** Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 34: 1947-1954, 2006.
119. **Yamamoto M, Takeda K and Akira S.** TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40: 861-868, 2004.
120. **Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R and Golenbock D.** Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 163: 1-5, 1999.
121. **Zarembek KA and Godowski PJ.** Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168: 554-561, 2002.

9. Anhang

9.1 Material

Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen

Aqua ad iniectabilia (10 ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bepanthen [®] Augen-und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Bio-Plex [™] Mouse Cytokine 13-Plex Panel	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex [®] Reagent Kit	BioRad Laboratories (München)
Braunol [®]	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
Chloroform, stabilisiert	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
ECL Solution	GE Healthcare (USA)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
FACS [™] Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
Fast Red [®]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Glycergel Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH (Trittau)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (USA)
Ketamin 10 %	WDT (Garbsen)
Mayers Häkalaunlösung	Merck (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Natriumchloridlösung, 0,9 % (10 ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)

Anhang

Natriumchloridlösung, isotonisch (100 ml)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
2-Propanol, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Protease-Inhibitor complete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Rompun 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems (USA)
TE Buffer, endotoxin free	Qiagen GmbH (Hilden)
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek (Niederlande)
Tris Pufferan® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH & CO (Karlsruhe)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
TRIzol Reagent	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

Nährmedien und Zusätze

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

Verbrauchsmaterial

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (USA)
---	--------------------------

Anhang

BD Falcon™ 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount™ Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
ECL Film (Hyperfilm ECL)	GE Healthcare (USA)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 µl)	Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden)
Falcon Blue Max™ (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
PVDF Membranen	GE Healthcare (USA)
QIAshredder homogenizer	Qiagen GmbH (Hilden)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipak™ (1 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit™ II (2 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Belgien)
Venenverweilkanüle BD Neoflon™ (24 G)	BD Biosciences (Heidelberg)

Geräte

AB 7300-Real Time PCR System	Applied Biosystems (USA)
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Biometra® T1 Thermocycler	Biomedizinische Analytik (Göttingen)
Bio-Plex™ Millipore	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex™ Workstation	BioRad Laboratories (München)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O ₂	Kendro Laboratory Products (Osterode)
FACS Calibur (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
Fiberoptik-Laryngoskop für Kleinnager	Welch Allyn GmbH & CO.KG (Jungingen)
GeneGenius Imaging System	Syngene (Großbritannien)
Heraeus Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products (Osterode)
IKA®-Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kryostat Leica CM 3050S	Leica Mikrosysteme Vertrieb (Wetzlar)
Kühlschrank (4 °C)/Gefrierschrank (-80 °C)	Engmann Kühleysteme GmbH (Mannheim)
Megafuge 1.0R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit Axiocam und LSM 5 Pascal)	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
Mikroskop Labolux 12 Typ: 020-435.025	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Photometer Uvikon _{XS}	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Rektalsonde physitemp Model BAT-12	physitemp Instruments, Inc. (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Ultra-Turrax T 8	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Schweiz)

Anhang

Variomag [®] Elektronicrührer Mono	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Vortex-Genie 2 [®] Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (USA)
Waage Model CS 200	Ohaus Corporation (USA)
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

Präparationsplatz

Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & CO.KG (Lauda-Königshofen)
Differentialdruckaufnehmer MPX Typ 399/2 und Validyne DP 45-14	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Druckaufnehmer P75 Typ 379	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Peristaltikpumpe Ismatec [®] Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH (Wertheim-Mondfeld)
Plexiglaskammer (Größe 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Plugsys [®] -Grundgerät mit Messmodulen(CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Software Pulmodyn [®] W	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

PCR-Primer

<p>TaqMan[®] Gene Expression Assay</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hs0187248_s1 (human TLR-2) • Mm00442346_m1 (mouse TLR-2) • Hs_99999905_m1 (human GAPDH) • Mm_99999915_g1 (mouse GAPDH) 	Applied Biosystems (USA)
---	--------------------------

Antikörper

rabbit anti-A66 serotype 3 antiserum (anti- <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotype 3)	Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Ernst Moritz Arndt Universität, Greifswald
goat anti-rabbit immunoglobulin, AP conjugated (Dako D0487)	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
rat anti-mouse CD16/CD32 (FcγII/III receptor block; clone:2.4G2)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated (panleukocyte marker; clone: 30-F11)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, APC conjugated (alveolar macrophage marker; clone: BM8)	Caltag Laboratories
rat anti-mouse Ly-6G/Ly-6C, PE conjugated (GR-1) (neutrophil marker; cloneRB6-8C5)	BD Biosciences (Heidelberg)
monoclonal mouse anti-TLR-2 antibody (sc-21759)	Santa Cruz Biotechnology (USA)
polyclonal sheep anti-mouse antibody, horseradish peroxidase-conjugated	GE Healthcare (USA)
monoclonal mouse anti-GAPDH antibody	Santa Cruz Biotechnology (USA)

9.2 Abkürzungsverzeichnis

AEP	Ambulant Erworbene Pneumonie
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
APC-konjugiert	Allophycocyanin-konjugiert
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
CbpA	<i>Choline-binding Protein A</i>
CCL5	= RANTES
CpG-ODN	<i>CpG-Oligodeoxynucleotide</i>
di-GMP	<i>Dimeric Guanosine Monophosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FCS	<i>Foetal Calf Serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
GRO- α	<i>Growth Regulated Oncogene-α</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin

Anhang

IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRAK	<i>Interleukine-1 Receptor-associated Kinase</i>
i.t.	intratracheal
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KC	<i>Keratinocyte-derived Cytokine</i>
KM	Körpermasse
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	<i>Lipoteichoic Acid</i>
MALP-2	<i>Macrophage-activating Lipopeptide of 2kDa</i>
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i>
MBL	<i>Mannose-binding Lectin</i>
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein</i>
MDHM	<i>Mycoplasma-derived High Molecular Weight Material</i>
MCP	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MLI	<i>Mean Linear Intercept</i>
MyD88	<i>Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
NaCl	Natriumchlorid
NALT	<i>Nasal Mucosa-associated Lymphoid Tissue</i>

Anhang

NEMO	<i>NF-κB Essential Modifier</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'κ-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
n.m.	nicht messbar
NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p.a.	<i>post applicationem</i>
Pam3Cys	<i>N-α-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-L-cysteine</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll Protein
PMN	<i>Polymorphkernige neutrophile Granulozyten</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
PsaA	<i>Pneumococcal Surface Adhesin A</i>
PspA	<i>Pneumococcal Surface Protein A</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-Cell Expressed, and Secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RSV	<i>Respiratory Syncycial Virus</i>
RT	Reverse Transkription
SP-A (-D)	Surfactantprotein A (D)
<i>S. pneumoniae (S.pn.)</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (syn. Pneumokokken)

Anhang

<i>SD</i>	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung vom Mittelwert)
TAB	<i>TAK1 Binding Protein</i>
TAK	<i>TGF-β Activated Kinase</i>
TIRAP	<i>Toll-Interleukin 1 Receptor Domain Containing Adaptor Protein</i>
THY	Todd Hewitt-Bouillion
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TLR-2 ^{-/-} Mäuse	homozygot TLR-2-defiziente Mäuse
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TRAF	<i>TNF Receptor-associated Factor</i>
vs.	<i>versus</i>
WT Mäuse	Wildtyp Mäuse
ZNS	Zentrales Nervensystem

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gliederung des Bronchialbaums
Tabelle 2:	Studiendesign
Tabelle 3:	Beatmungsparameter
Tabelle 4:	Handlungsanweisung
Tabelle 5:	Leukozytenzahl in der BALF
Tabelle 6:	Körpermasse [%] im Verlauf der murinen <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie
Tabelle 7:	Körpertemperatur [°C] im Verlauf der murinen <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie
Tabelle 8:	Körpermasse [%] im Verlauf der murinen <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie (Dosisreihe)
Tabelle 9:	Körpertemperatur [°C] im Verlauf der murinen <i>S. pneumoniae</i> -Pneumonie (Dosisreihe)

9.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: *Streptococcus pneumoniae*, einzeln und in paariger Anordnung
- Abbildung 2: Struktur des MALP-2
- Abbildung 3: Signaltransduktion von TLR-2/6
- Abbildung 4: Skizze der IPML
- Abbildung 5: Zeitlicher Verlauf der Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum
- Abbildung 6: MALP-2-induzierte, TLR-2-abhängige Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum
- Abbildung 7: MALP-2-induzierte, TLR-2-abhängige Zytokinproduktion im bronchoalveolären Raum
- Abbildung 8: Genexpression des murinen TLR-2 nach MALP-2-Stimulation *in vivo*
- Abbildung 9: Proteinsynthese des murinen TLR-2 nach MALP-2-Stimulation *in vivo*
- Abbildung 10: Genexpression des TLR-2 (human) nach MALP-2-Stimulation (*in vitro*)
- Abbildung 11: Proteinsynthese des TLR-2 (human) nach MALP-2-Stimulation (*in vitro*)
- Abbildung 12: Mortalität
- Abbildung 13: Mortalität nach Dosisreihe
- Abbildung 14: Leukozytenrekrutierung in den bronchoalveolären Raum 48 h nach Infektion
- Abbildung 15: Zytokine im bronchoalveolären Raum 48 h nach Infektion
- Abbildung 16: Bakterienlast der Lunge
- Abbildung 17: Immunhistochemische Darstellung von neutrophilen Granulozyten und *S. pneumoniae* in der Lunge 48 h nach Infektion
- Abbildung 18: Bakterienlast des Blutes
- Abbildung 19: Leukozytenrekrutierung im Blut 48 h nach Infektion

Danksagung

Zur erfolgreichen Erstellung meiner Dissertation trugen diverse Menschen entscheidend bei, jeder auf seine eigene Art und Weise. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich für ihre Hilfe bedanken. 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 Infektiologischen Forschungslabor Charité Campus Mitte anfertigen zu können.

Herrn Dr. Martin Witzenrath, Arbeitsgruppenleiter im Forschungslabor Charité Campus Mitte, für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, interessante fachliche Gespräche und Diskussionen. Trotz seines engen Terminplanes nahm er sich stets die Zeit, mir mit fachlichem und methodischem Rat zur Seite zu stehen. Vielen Dank auch für die vielfältigen Möglichkeiten, mich neuen Herausforderungen erfolgreich zu stellen.

Herrn Prof. Dr. H. Hartmann, Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin, für die Übernahme der veterinärmedizinischen Betreuung der Dissertation und die Möglichkeit der Einreichung der Dissertation über das Institut für Veterinär-Physiologie.

Prof. Dr. T. Tschernig und Dr. A. Lührmann, Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie, Medizinische Hochschule Hannover, für die Vermittlung des MALP-2, die methodische Beratung zum Umgang mit dem MALP-2 und für die Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung der Lungen.

Herrn Prof. Dr. P. Mühlradt, BioTech Gründerzentrum Braunschweig, für die Bereitstellung des MALP-2.

Herrn Vincent van Laak, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, für die Untersuchungen in der Zellkultur und die Durchführung der quantitativen RT-PCR.

Herrn Prof. Dr. K. Grote, Institut für Kardiologie und Angiologie, Medizinische Hochschule Hannover, für die Durchführung der Western Blot-Analyse.

Danksagung

Herr S. Akira, World Premier International Research Center – Immunology Frontier Research Center, Osaka University, Japan, und Herrn Dr. M. Kursar, Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, für die Bereitstellung respektive Vermittlung der TLR-2-defizienten Tiere.

Herrn Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Abteilung Genetik der Mikroorganismen, Ernst Moritz Arndt Universität, Greifswald, für die Bereitstellung des *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3-Antiserums.

Ein besonders großes Dankeschön möchte ich Birgitt Gutbier für die gründliche Einarbeitung aussprechen. Sie hatte immer ein offenes Ohr und stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Tausend Dank!

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Maren Zemlin und Jenny Thiele für die tatkräftige Unterstützung zu Beginn meiner Labortätigkeit, Tipps und Tricks und die vielen aufmunternden Worte auf den wohlbekannten Durststrecken.

Für ein tolles Arbeitsklima und das Durchstehen von Krisenphasen, die jedem Doktoranden wohlbekannt sind, ist der Zusammenhalt und der Gedankenaustausch innerhalb des Labors unerlässlich. Deshalb möchte ich mich beim ganzen Laborteam herzlich bedanken, v.a. Holger Müller, Jan Doehn, Stefanie Kube, Franziska Runge, Christoph Tabeling, Katharina Hellwig, Daniel Lorenz, Anne-Kathrin Neuhauß, Katja Fischer, Daniel Will und vielen mehr.

Den größten Dank verdienen jedoch meine Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir gemeinsam mit meiner Schwester Sandra, meinem „Schwager“ Michael und ihrem Sohn Leonhard den nötigen Rückhalt in schweren Zeiten boten und die Freude in guten Zeiten mit mir teilten.

Tausend Dank meiner besten Freundin Christiane, mein Fels in der Berliner Brandung. Sie hatte immer ein aufmunterndes Wort auf Lager.

Zuletzt ein großes Dankeschön an meine beiden Großmütter und alle meine lieben Freunde und Verwandte. Jeder von Euch hat auf seine eigene Art und Weise, bewusst oder unbewusst zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

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 12.01.2010

Katrin Reppe