

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

DISSERTATION

**Die Rolle des lectin-like oxidized lipoprotein receptor-1
in der postviralen Pneumokokkenpneumonie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander A. Perić

aus

Bonn – Bad Godesberg

Datum der Promotion: 25.6.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 ABSTRAKT.....	10
2 ABSTRACT.....	12
3 EINLEITUNG.....	14
3.1 Synergismus von Viren und <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
3.2 Respiratorische Viren.....	15
3.2.1 <i>Influenza A</i>	15
3.2.1.1 Mikrobiologie.....	16
3.2.1.2 Epidemiologie.....	16
3.2.1.3 Infektion.....	16
3.2.1.4 Klinik und Diagnose.....	17
3.2.1.5 Komplikationen und antivirale Therapie.....	17
3.2.1.6 Prophylaxe.....	17
3.3 Pneumonie.....	18
3.3.1 <i>Ambulant erworbene Pneumonie</i>	18
3.3.1.1 Definition.....	18
3.3.1.2 Epidemiologie.....	18
3.3.1.3 Erregerspektrum.....	18
3.3.2 <i>Nosokomiale Pneumonie</i>	18
3.3.3 <i>Pneumokokkenpneumonie</i>	19
3.3.3.1 Epidemiologie.....	19
3.3.3.2 Kolonisation.....	19
3.3.3.3 Serotypen.....	20
3.3.3.4 Infektion.....	20
3.3.3.5 Klinik.....	20
3.3.3.6 Diagnose.....	21
3.3.3.7 Risikoklassen und CRB-65 bzw. CURB-65.....	21
3.3.3.8 Mikrobiologische Diagnostik.....	22
3.3.3.9 Therapie.....	22
3.3.3.10 Prophylaxe.....	22
3.3.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
3.3.4.1 Virulenzfaktoren.....	23

3.4	Pulmonale Abwehrmechanismen	25
3.4.1	<i>Angeborene Immunität</i>	26
3.4.2	<i>Pattern-Recognition Receptors, PRRs</i>	26
3.4.2.1	Toll-like Rezeptoren	27
3.4.2.2	Scavenger Rezeptoren und LOX-1	29
3.4.3	<i>Zytokine</i>	32
3.4.3.1	Interleukin-8	32
3.5	Diskutierte Mechanismen viral-bakterieller Interaktionen	33
3.5.1	<i>Epitheliale Schädigung</i>	33
3.5.2	<i>Störung der angeborenen Immunität</i>	33
3.5.3	<i>Steigerung der Zugänglichkeit und Expression von Adhäsionsrezeptoren</i>	34
3.6	Zielsetzung	35
4	MATERIAL UND METHODEN	37
4.1	Material	37
4.1.1	<i>Humane Lungengewebeproben</i>	37
4.1.2	<i>Humane bronchiale Epithelzelllinie (BEAS-2B)</i>	37
4.1.3	<i>Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen</i>	37
4.1.4	<i>Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten</i>	38
4.1.5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	38
4.1.6	<i>Bakterienkultur</i>	38
4.1.7	<i>Influenza A/Panamá/2007/1999 (H3N2)</i>	39
4.1.8	<i>Stimulantien und Enzyme</i>	39
4.1.9	<i>Puffer, Lösungen und Gele</i>	39
4.1.10	<i>Primer, small interfering RNAs (SIRNAs) und Plasmide</i>	41
4.1.11	<i>Primäre und sekundäre Antikörper Western blot und Konfokalmikroskopie</i>	41
4.1.12	<i>Geräte</i>	42
4.1.13	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	42
4.2	Methoden	43
4.2.1	<i>Zellbiologische Methoden</i>	43
4.2.1.1	Kultivierung und Subkultivierung der BEAS-2B-Zellen	43
4.2.1.2	Bestimmung der Zellzahlen	44
4.2.1.3	Kryokonservierung	44
4.2.1.4	Auftauen der Zellen	44
4.2.2	<i>Mikrobiologische Methoden</i>	44
4.2.2.1	Sterilisation	45
4.2.2.2	Bakterienkultur	45
4.2.2.3	Adhäsionsassay mit <i>S. pneumoniae</i> R6x	46

4.2.2.4	Infektion humaner Lungengewebeproben mit Influenza A/Panamá/2007/1999 (H3N2).....	46
4.2.3	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	46
4.2.3.1	Extraktion und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA.....	46
4.2.3.2	Semiquantitative RT-PCR.....	47
4.2.3.3	Transiente Transfektion von small interfering RNA (siRNA) und Plasmid-DNA.....	48
4.2.4	<i>Biochemische Methoden</i>	48
4.2.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	48
4.2.4.2	Isolierung von Gesamt- und fraktionierten Proteinextrakten.....	49
4.2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	49
4.2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	50
4.2.4.5	Western blot.....	50
4.2.4.6	Konfokalmikroskopie.....	50
4.2.5	<i>Statistik</i>	51
5	ERGEBNISSE	52
5.1	BEAS-2B-Zellen exprimieren LOX-1.....	52
5.2	Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Toll-like Rezeptor 3 und 7 Agonisten steigert die Expression von LOX-1.....	53
5.3	LOX-1 dient <i>S. pneumoniae</i> R6x an BEAS-2B-Zellen als Adhäsionsrezeptor.....	54
5.3.1	<i>Beas-2B-Zellen binden nach LOX-1 Knockdown weniger S. pneumoniae</i>	54
5.3.2	<i>LOX-1 überexprimierende BEAS-2B-Zellen binden mehr S. pneumoniae</i>	55
5.3.2.1	Adhäsionsassay.....	55
5.3.2.2	Konfokalmikroskopie.....	56
5.4	Poly I:C und Resiquimod haben keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion von <i>S. pneumoniae</i> an BEAS-2B-Zellen.....	57
5.5	Die IL-8 Regulation bei Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> ist abhängig von LOX-1.....	58
5.6	LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch <i>ex vivo</i> Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert.....	59
6	DISKUSSION	61
6.1	BEAS-2B-Zellen exprimieren LOX-1.....	61
6.2	Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Toll-like Rezeptor Agonisten 3 und 7 steigert die Expression von LOX-1.....	62
6.3	LOX-1 dient <i>S. pneumoniae</i> R6x an BEAS-2B-Zellen als Adhäsionsrezeptor.....	63
6.3.1	<i>Knockdown mittels siRNA</i>	63
6.3.2	<i>Überexpression mittels LOX-1 Plasmid</i>	64

6.4	Poly I:C und Resiquimod haben keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion von <i>S. pneumoniae</i> an BEAS-2B-Zellen.....	64
6.5	Die IL-8 Regulation bei Infektion von BEAS-2B-Zellen mit <i>S. pneumoniae</i> ist abhängig von LOX-1.....	66
6.6	LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch <i>ex vivo</i> Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert.....	67
6.7	Ausblick	69
	LITERATURVERZEICHNIS	70
	ANHANG	77
	Eidesstattliche Versicherung	77
	Tabellarischer Lebenslauf	78
	Kongressbeiträge und Auszeichnungen	79
	Danksagung	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Ätiologie der ambulant erworbenen Pneumonie.....	19
Abbildung 3-2: Pathogenese verschiedener durch <i>S. pneumoniae</i> verursachte Erkrankungen	20
Abbildung 3-3: Elektronenmikroskopisches Bild von <i>S. pneumoniae</i>	23
Abbildung 3-4: Adhäsionsfördernde Oberflächenproteine von <i>S. pneumoniae</i>	25
Abbildung 3-5: Übersicht der Toll-like-Rezeptoren und ihrer Liganden.	27
Abbildung 3-6: Signaltransduktion der endosomalen Toll-like Rezeptoren 3 und 7.....	29
Abbildung 3-7: Molekulares Mimikry von <i>S. pneumoniae</i> und oxLDL.....	31
Abbildung 3-8: Auswirkung einer Rhinovirusinfektion auf die Expression von PAFr.....	34
Abbildung 5-1: <i>S. pneumoniae</i> induziert LOX-1 auf BEAS-2B-Zellen	52
Abbildung 5-2: Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Agonisten der Toll-like Rezeptoren 3 und 7 steigert die Expression von LOX-1	53
Abbildung 5-3: BEAS-2B-Zellen binden nach LOX-1 Knockdown weniger <i>S.p.</i> R6x.....	54
Abbildung 5-4: Nach transienter Transfektion von LOX-1 Plasmiden binden BEAS-2B-Zellen vermehrt <i>S. pneumoniae</i> R6x.....	55
Abbildung 5-5: Mit LOX-1 Plasmid transfizierte BEAS-2B-Zellen binden vermehrt <i>S.p.</i> R6x.....	56
Abbildung 5-6: Einfluss von Toll-like Rezeptor 3 und 7 Agonisten auf die Adhäsion von <i>S.p.</i> R6x an BEAS-2B- Zellen.....	57
Abbildung 5-7: LOX-1 ist an der Inflammationsvermittlung beteiligt	58
Abbildung 5-8: LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch <i>ex vivo</i> Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert	59
Abbildung 6-1: Anlagerung verschiedener Influenza Stämme (rot) an Trachea, Bronchus, Bronchiole und Alveoli des Menschen.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1: Auswahl respiratorischer Viren, nach (Kayser, 2010).....	15
Tabelle 3-2: CRB/CURB-65 Score der British Thoracic Society.....	21
Tabelle 3-3: Ausgewählte Oberflächenproteine von <i>S. pneumoniae</i>	24
Tabelle 3-4: LOX-1 induzierende Faktoren und zugehörige Zelllinie.....	30
Tabelle 4-1: Kulturmedien und Kryokonservierung BEAS-2B-Zellen.....	38
Tabelle 4-2: Kulturmedien und Kryokonservierung humanes Lungengewebe.....	38
Tabelle 4-3: Medien für die Bakterienkultur	38
Tabelle 4-4: Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien.....	38
Tabelle 4-5: Stimuli.....	39
Tabelle 4-6: Enzyme	39
Tabelle 4-7: PCR-Puffer	39
Tabelle 4-8: PCR-Gel	39
Tabelle 4-9: Western blot-Puffer.....	39
Tabelle 4-10: Western blot-Gele.....	40
Tabelle 4-11: ELISA Puffer.....	40
Tabelle 4-12: PCR-Primer-Sequenzen für semiquantitative PCR	41
Tabelle 4-13: Sonstige PCR-Primer.....	41
Tabelle 4-14: siRNA Sequenzen	41
Tabelle 4-15: Plasmide.....	41
Tabelle 4-16: Primäre Antikörper Western blot	41
Tabelle 4-17: Sekundäre Antikörper Western blot	42
Tabelle 4-18: Primäre Antikörper Konfokalmikroskopie	42
Tabelle 4-19: Sekundäre Antikörper Konfokalmikroskopie.....	42
Tabelle 4-20: Speziell verwendete Geräte.....	42
Tabelle 4-21: Speziell verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen.....	42
Tabelle 6-1: Poly I:C Stimulation mit konsekutiv signifikant erhöhtem Inflammationssignal	62
Tabelle 6-2: Übersicht relevanter LOX-1 <i>in vivo</i> Studien.....	67

Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (usw., bzw., etc.) sowie SI (Système International d'unités) - Einheiten und deren Präfixe.

16 HBE	immortalisierte bronchiale Epithelzellen	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
A. bidest.	doppelt destilliertes Wasser	ERK-2	extracellular-signal regulated kinase 2
ARDS	acute respiratory distress syndrome	FAK	Fokale Adhäsionskinase
ATS	American Thoracic Society	FCS	fetal calve serum
BAEC	bovine arterial endothelial cells	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
BAL	bronchoalveoläre Lavage	HAP	hospital-acquired pneumonia
BASMC	bovine aortic smooth muscle cells	HBEC	primäre bronchiale Epithelzellen
BEAS-2B	humane bronchiale Epithelzellen	HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
CAP	community-acquired pneumonia	HLOX-1-CHO	Chinesische Hamsterovarialzellen mit stabiler LOX-1 Expression
CBP	Cholin-bindende Proteine	IL	Interleukin
CDC	Center for Disease Control	IFN	Interferon
cDC	konventionelle dendritische Zelle	IRF	interferon regulatory factor
CFU	colony forming unit	LDL	low density lipoproteins
CRP	C-reaktives Protein	LOX-1	lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1
DC	dendritische Zelle	LPS	Lipopolysaccharide
DMSO	Dimethylsulfoxid	MAPK	mitogen-activated protein kinase
DNA	desoxyribonucleic acid	MBL	Mannan-bindendes Lektin
dNTP	Desoxyribonukleotide	M-MLV	moloney murine leukemia virus
dsRNA	Doppelstrang-RNA	mRNA	messenger RNA
DTT	Dithiothreitol	MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
E-C	E-Cadherin		
ECV-304	einst für Endothel gehaltene humane Harnblasen-Karzinomzelllinie		
EDTA	ethylendiamintetraacetic acid		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	Psp	Oberflächenprotein von <i>S. pneumoniae</i>
NHBE	Natürliche Humane Bronchialepithelzellen	RIG-I	retinoic acid-inducible gene I
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen	RLH	RIG-I-like helicase
NLR	NOD-like Rezeptor	RNA	ribonucleic acid
NLRP	NOD-like receptor family, pyrin domain containing	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
NOD	nucleotide-binding and oligomerization domain	Rpm	rounds per minute
OD	optische Dichte	RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
oxLDL	oxidierte LDL	RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
PAFr	platelet-activating factor receptor	RT	Reverse Transkriptase
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster	RV-14	Rhinovirus Serotyp 14
Pav	Pneumokokkus Adhäsion und Virulenz	SAEC	small airway epithelial cells
PBS	phosphate buffered saline	SDS	Natriumdodecylsulfat
PCho	Phosphorylcholin	SFM	synthetic freshwater medium
PCR	Polymerase Kettenreaktion	ssRNA	Einzelstrang-RNA
PCV-7	7 valente Pneumokokken-konjugatvakzine	STIKO	Ständige Impfkommission
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen	TAE	Tris-Azetat-EDTA
PFA	Paraformaldehyd	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PFU	plaque forming units	THY	Todd Hewitt yeast
pIgR	polymerer Immunoglobulinrezeptor	TGF-β	transforming growth factor β
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	TIR	Toll-IL-1 Rezeptor
Poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid	TLR	Toll-like Rezeptor
PPV23	23 valente Pneumokokken-Polysaccharid Vakzine	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
PRR	pattern-recognition receptor	TRIF	TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β
Psa	Oberflächenadhesin von <i>S. pneumoniae</i>	WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 ABSTRAKT

Einleitung:

Respiratorische Viren wie Influenza sind regelmäßige Erreger pulmonaler Infektionen, sie werden vom angeborenen Immunsystem u.a. über die Toll-like Rezeptoren 3 (TLR3) sowie TLR7 erkannt. Eine häufige Komplikation dieser viralen Infektionen ist die Pneumonie durch *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), welche mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht. Bei der Abwehr bakterieller Pneumonien ist das Chemokin IL-8 ein wesentlicher Vertreter des angeborenen Immunsystems. Es steuert die Emigration von Neutrophilen und deren Degranulation. Obwohl verschiedene Hypothesen formuliert wurden um die erhöhte Vulnerabilität der Lunge gegenüber *S. pneumoniae* nach viraler Infektion zu erklären, sind die zugrunde liegenden Mechanismen bislang nur unvollständig verstanden. Der lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) ist verantwortlich für die Aufnahme von oxidierten low-density Lipoproteinen (oxLDL). Studien zeigen, dass eine molekulare Mimikry von oxLDL und *S. pneumoniae* existiert und weisen auf LOX-1 als möglichen Rezeptor für *S. pneumoniae* hin.

Methodik:

In allen Versuchen wurden bronchiale Epithelzellen (BEAS-2B-Zellen) als Lungenmodell verwendet. Wir untersuchten die Auswirkungen von TLR3 (Poly I:C) und TLR7 Agonisten (Resiquimod) auf die im Western blot gemessene LOX-1 Expression der Zellen. Mit Hilfe von LOX-1-siRNA und LOX-1 Plasmid wurde an BEAS-2B-Zellen der Einfluss von LOX-1 auf die Bindung von *S. pneumoniae* R6x mittels Adhäsionsassay und Konfokalmikroskopie geprüft. Das Bindungsverhalten von *S. pneumoniae* R6x wurde zudem nach Stimulation mit TLR3 und TLR7 Agonisten ermittelt. Des Weiteren wurde ein möglicher Einfluss von LOX-1 auf die Immunantwort ermittelt, indem BEAS-2B Zellen mit oder ohne LOX-1-siRNA Vorbehandlung mit *S. pneumoniae* R6x infiziert wurden und die CXCL-8 (IL-8) Antwort mittels ELISA verglichen wurde. Abschließend wurden im Western blot an chirurgisch gewonnenen, humanen Lungenbiopsaten die Auswirkungen einer Infektion mit einem Influenza Virus A auf die LOX-1 Expression getestet.

Ergebnisse:

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bronchiale Epithelzellen (BEAS-2B-Zellen) LOX-1 exprimieren und dieser als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* wirkt. Eine Aktivierung von

TLR3 und TLR7 führt darüber hinaus an BEAS-2B-Zellen zu einer Expressionssteigerung von LOX-1 Protein, hatte jedoch keine vermehrte Bindung der Pneumokokken an bronchiale Epithelzellen zur Folge. Hinsichtlich einer immunmodulatorischen Komponente wiesen mit LOX-1-siRNA vorbehandelte BEAS-2B-Zellen nach *S. pneumoniae* Infektion eine signifikant reduzierte IL-8 Antwort auf. Abschließend offenbarten die humanen Lungenbioptate nach Infektion mit Influenza ein gesteigertes LOX-1 Signal *ex vivo*.

Schlussfolgerung:

Indem LOX-1 die Adhäsion von *S. pneumoniae* an bronchiale Epithelzellen erleichtert und immunmodulatorisch wirkt, könnte dieser Rezeptor eine bedeutsame Funktion in der Vermittlung der postviralen Pneumokokkenpneumonie einnehmen.

2 ABSTRACT

Introduction:

Influenza and other respiratory viruses are recognized by innate immunity via pattern recognition receptors, e.g. toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR7. A common complication of respiratory viral infections is pneumococcal pneumonia, which leads to increased rates of morbidity and mortality. In bacterial pneumonia, IL-8 plays an important role as a chemokine attracting neutrophils and supporting neutrophil degranulation. Although different hypotheses exist to explain the interaction of viral and secondary bacterial pulmonary infection, the underlying mechanisms remain unclear. The lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) is responsible for uptake of oxidized low-density lipoproteins (oxLDL). Interestingly, a molecular mimicry was shown between oxLDL molecules and *S. pneumoniae*, suggesting LOX-1 as a receptor for *S. pneumoniae*.

Methods:

We used bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells) for all experiments as a pulmonary model and investigated via Western blot whether activation of TLR3 and TLR7 with their agonists Poly I:C and Resiquimod influenced the level of LOX-1 expression. Furthermore, we compared adhesion of *S. pneumoniae* R6x to BEAS-2B cells after pretreatment of cells with either LOX-1-siRNA or LOX-1 plasmid using an adhesion assay and confocal microscopy. Adhesion of *S. pneumoniae* R6x was again measured after pretreatment of cells with Poly I:C and Resiquimod. Also, the influence of LOX-1 on immune response was evaluated with an ELISA kit by comparing the CXCL-8 secretion of BEAS-2B cells with or without LOX-1-siRNA pretreatment after infection with pneumococcus. Finally, we investigated the effect of infection of primary human pulmonary tissue with Influenza Virus A on LOX-1 expression via Western blot.

Results:

We could demonstrate that human bronchial epithelium cells (BEAS-2B cells) express the lectin-like oxidized lipoprotein receptor-1 (LOX-1) and that LOX-1 functions as an adhesion receptor for *S. pneumoniae* R6x on BEAS-2B cells. Furthermore, after activation of TLR3 and TLR7, expression of LOX-1 on BEAS-2B cells increase whereas adhesion of *S. pneumoniae* R6x was not enhanced. Also, LOX-1 silencing significantly reduces the CXCL-8 response after infection with *S. pneumoniae* R6x. On primary human lung tissue, LOX-1 expression increases after infection with Influenza A virus.

Summary:

Our results suggest that LOX-1 may play a relevant role in pneumococcal pneumonia after viral infection by facilitating adherence of bacteria and modulating the immune response.

3 EINLEITUNG

„Die Grippe verdammt, die Sekundärinfektionen töten“, wird Louis Cruveilhier bereits im Jahre 1919, während der Spanischen Grippepandemie, zitiert. Damals wurde erstmals beobachtet, dass ein tödlicher Synergismus von viralen Infektionen des oberen Respirationstraktes und bakteriellen Superinfektionen existiert (Cruveilhier, 1919, Muir and Wilson, 1919). Speziell die bakterielle Pneumonie nach Influenzainfektion ist für eine hohe Mortalität verantwortlich (McCullers, 2006). Unter den verursachenden Erregern wird *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) dabei eine Sonderrolle zuteil, da dieses Bakterium nicht nur der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie ist, sondern auch bei bis zu 54% der postviralen Pneumonien isoliert werden kann (Michelow et al., 2004).

Obwohl vereinzelte synergetische Effekte von viraler und bakterieller Infektion identifiziert werden konnten, ist fast 100 Jahre nach Cruveilhiers Zitat weiterhin nur unvollständig verstanden, warum Infektionen respiratorischer Viren für Pneumokokkenpneumonien prädisponieren und welche molekularen Mechanismen *S. pneumoniae* dabei nutzt, um an respiratorischem Epithel zu adhären (Hament et al., 1999).

Vor dem Hintergrund sich häufender Influenzapandemien nimmt zum einen die Bedeutung bakterieller Ko-Infektionen zu. Zum anderen gestaltet sich die Behandlung bakterieller Sekundärinfektionen durch die global wachsende Antibiotikaresistenz langfristig komplizierter (Dalhoff, 2012). Um Ansatzpunkte neuer Therapien formulieren zu können, ist deshalb ein detailliertes Verständnis der Mechanismen von Nöten, welche nach einer viralen Infektion für bakterielle Infektionen prädisponieren (Mitchell and Mitchell, 2010).

3.1 Synergismus von Viren und *Streptococcus pneumoniae*

Die ausführlichsten Daten zu viral-bakterieller Interaktion bei Pneumonie liegen für das Influenza Virus vor. So konnten Morens et al. die von Louis Cruveilhier gemachten Beobachtungen bestätigen, indem sie Autopsieproben von Opfern der Influenzapandemie des Jahres 1918 erneut auf bakterielle Infektionen untersuchten. Es zeigte sich, dass pulmonale Infektionen durch Bakterien eine Haupttodesursache während der Influenzapandemie von 1918 darstellten (Morens et al., 2008). Auch eine postmortale Analyse von im Jahre 2009 an Influenza A (H1N1) verstorbenen Personen ergab, dass bei 29% eine bakterielle Superinfektion der Lunge vorlag (CDC, 2009). Patienten, die an einer pulmonalen Ko-Infektion von Influenza A (H1N1) und Bakterien leiden, weisen zudem signifikant häufiger respiratorische Komplikationen (erforderliche Beatmung, Pleuraerguss, ARDS) auf als jene, die ausschließlich an Grippe erkrankt sind (Viasus et al., 2011). Entsprechend steigt die Letalität im Falle einer Ko-Infektion von 3 auf 9 Prozent (von Baum et al., 2011). In allen genannten Studien wurde *S. pneumoniae* als häufigster Erreger einer Influenza-assoziierten, bakteriellen Pneumonie identifiziert.

Doch auch im Zusammenhang mit anderen respiratorischen Viren tritt eine Pneumokokkenpneumonie häufig auf. In einer taiwanesischen Studie über ambulant erworbene Pneumonien wies ein Drittel der erkrankten Kinder eine viral-bakterielle Koinfektion auf. Das Adenovirus stellte dabei noch vor Influenza, RSV und Parainfluenza den häufigsten viralen Erreger dar, während *S. pneumoniae* die Liste der bakteriellen Keime dominierte (Chen et al., 2012). Der direkte Zusammenhang von Infektion mit respiratorischen Viren und Pneumokokkenpneumonie konnte in einer randomisierten Doppelblindstudie dargestellt werden. Diese zeigte, dass eine Pneumokokkenimpfung nicht nur die Anzahl der bakteriellen Pneumonien gegenüber der Plazebogruppe signifikant reduzierte, sondern auch die Anzahl der Virus-assoziierten Pneumonien. Konkret nahm die Häufigkeit der klinischen Diagnose Pneumonie mit gleichzeitig nachgewiesener Virusinfektion, darunter das Respiratorische Synzytial Virus (RSV), Parainfluenza oder Adenovirus, bei Kindern nach Pneumokokkenimpfung um fast ein Drittel ab (Madhi and Klugman, 2004). Die Autoren folgern daraus, dass viele als „Virus-assoziierte Pneumonie“ deklarierte Fälle durch bakterielle Ko-Infektionen hervorgerufen werden.

Diese Beobachtungen deuten auf Mechanismen viral-bakterieller Interaktion hin, welche einer Vielzahl respiratorischer Viren gemein sind und die Entstehung einer Pneumonie durch *S. pneumoniae* fördern.

3.2 Respiratorische Viren

Eine Reihe von Viren nutzt den direkten Kontakt der Lunge mit der Umwelt als Eintrittspforte in den Menschen. Während das Adenovirus meist Infektionen mit klinisch unkompliziertem Verlauf verursacht, sind Paramyxoviridae wie RSV und Parainfluenza als Erreger respiratorischer Erkrankungen bei Kindern gefürchtet. Bei Erwachsenen mit Vorerkrankung oder immunkompromittiertem Status kann eine Infektion mit diesen Einzelstrang-RNA (ssRNA, s.Tabelle 3-1) tragenden Viren jedoch ebenfalls letal enden (Lynch et al., 2011, Nair et al., 2011, Hall, 2001).

Tabelle 3-1: Auswahl respiratorischer Viren, nach (Kayser, 2010)

Familie	Gattung / Art	Genom	Hülle
Orthomyxoviridae	Influenza A	(-) ssRNA, segmentiert	ja
Paramyxoviridae	Masern, RSV, Parainfluenza	(-) ssRNA, linear	ja
-	Adenovirus	dsDNA, linear	nein
Picornaviridae	Rhinovirus	(+)ssRNA, linear	nein

3.2.1 *Influenza A*

Unter den respiratorischen Viren nimmt das Influenza A Virus eine Sonderstellung ein, da es sowohl Erreger der regelmäßigen Grippewellen als auch von unregelmäßig auftretenden Pandemien ist. Wirte sind vor allem der Mensch und Wildvögel (Lagacé-Wiens et al., 2010,

Clementi et al., 2012). Dem Influenza B Virus hingegen dient als Wirt nur der Mensch, weshalb es zwar mitverantwortlich für die saisonalen Grippewellen ist, jedoch nicht als spezienübergreifendes Virus auftritt und damit kein hinreichendes Pandemiepotential besitzt (Paul Glezen et al., 2013).

3.2.1.1 Mikrobiologie

Das der Familie der Orthomyxoviridae zugehörige Influenza A Virus trägt ein segmentiertes Einzelstrang-RNA Genom (s. Tabelle 3-1) und lässt sich anhand von Unterschieden seiner Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) weiter subtypisieren. HAs und NAs sind die primären Antigene des Virus. Über Punktmutationen im viralen Genom, dem Antigendrift, wandeln sich diese immunogenen Proteine kontinuierlich und verhindern so eine langfristige, kompetente Immunisierung der Wirte. Daneben existiert mit dem Antigen shift die Möglichkeit, bei Infektion eines Wirtes mit zwei Influenzatyphen, ganze Gensegmente auszutauschen. Durch diese sogenannte Reassortierung z.B. aviärer und humaner Influenzagenen können so neue, dem menschlichen Immunsystem unbekanntere Influenzatyphen entstehen und eine Pandemie verursachen (Lagacé-Wiens et al., 2010).

3.2.1.2 Epidemiologie

In Deutschland konnten in der Wintersaison 2012/2013 insgesamt 66.176 labordiagnostisch bestätigte saisonale Influenzainfektionen diagnostiziert werden. In 10.725 Fällen (16%) war eine Hospitalisierung erforderlich (Buda S. et al., 2013). Die als Exzessmortalität bezeichneten Influenza-assoziierten Todesfälle schwanken stark je nach Saison und lagen in den letzten 20 Jahren zwischen 0 (2010/2011) und 26.500 (1995/1996) pro Grippesaison (Buda S. et al., 2012).

Die letzte Pandemie des Jahres 2009 mit dem Influenza A Virus (H1N1) hatte in Deutschland mit 172.449 gemeldeten Einzel- und 250 Todesfällen einen milden Verlauf. Im Gegensatz zur saisonalen Influenza erkrankten die Menschen früher im Jahresverlauf und es waren vermehrt junge Personen ohne Vorerkrankungen unter den Betroffenen (Buda S. et al., 2010).

3.2.1.3 Infektion

Das Influenzavirus wird über Tröpfcheninfektion verbreitet. Über die Hämagglutinine H1, H2 und H3, die bevorzugt an Sialinsäuren humaner Zellen adhären, invadiert das Virus das respiratorische Epithel. Während saisonale Influenzaviren grundsätzlich den oberen Respirationstrakt, Trachea und Bronchien als Infektionsort bevorzugen, zeigt H5N1 einen Tropismus gegenüber Bronchiolen und Alveolen (Kuiken et al., 2012). Nach Adhäsion und Invasion ist die Neuraminidase entscheidend für die Sekretion intrazellulär neu synthetisierter Viruspartikel und befördert so die Ausbreitung der Infektion. Wird das Virus schließlich von Muster-erkennenden Rezeptoren (PRRs, pattern-recognition receptors, s. Kapitel 3.4.2)

erkannt, führt dies zu einer proinflammatorischen Immunantwort sowie einer Nekrose zilienträger Epithelzellen (Beigel, 2008, Lagacé-Wiens et al., 2010).

3.2.1.4 Klinik und Diagnose

Nach einer Inkubationszeit von ein bis maximal vier Tagen ist ein plötzlicher Beginn von Fieber, respiratorischen Symptomen (unproduktiver Husten, Rhinitis) und konstitutionellen Symptomen (Myalgie, Abgeschlagenheit) typisch. Diese Krankheitszeichen haben meist eine Dauer von zwei bis drei Tagen (Beigel, 2008). Aufgrund dieser unspezifischen Klinik sind die Anzüchtung oder die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Diagnosestellung einer Influenzainfektion nötig (Monto et al., 2000).

3.2.1.5 Komplikationen und antivirale Therapie

Die häufigste Komplikation einer Influenzainfektion ist die Pneumonie. Hierbei ist eine sekundäre bakterielle Pneumonie mit entsprechenden Auswirkungen auf Verlauf und Letalität der Infektion (s. Kapitel 3.1) von der rein viralen Influenza-Pneumonie zu unterscheiden. In Deutschland können ca. 7 Prozent aller ambulanten Pneumonien auf eine Infektion mit Influenza ohne bakterielle Superinfektion zurückgeführt werden, die Letalität beträgt hier 3,2% (s. Abbildung 3-1) (von Baum et al., 2011).

Daneben sind kardiopulmonale Vorerkrankungen ein Risikofaktor für einen tödlichen Verlauf (Beigel, 2008). Entsprechend sollten vor allem Hochrisikopatienten und Erkrankte mit kompliziertem Verlauf innerhalb von 24h nach Symptombeginn Neuraminidase-Inhibitoren (z.B. Oseltamivir) erhalten. Die hohen Kosten und die Möglichkeit der Resistenzselektion sprechen jedoch gegen eine generelle antivirale Therapie (Schmidt, 2004). Die Wirksamkeit des Präparates ist zudem weiterhin umstritten (Dobson et al., 2015).

3.2.1.6 Prophylaxe

Entscheidend in Pandemiesituationen ist, ob die saisonale Grippeimpfung das pandemische Virus mitabdeckt oder nicht. Bezüglich der Pandemie 2009 war dies nicht der Fall. Es musste ein neuer Impfstoff hergestellt werden, welcher in Studien eine Wirksamkeit von 68% bei Personen über 14 Jahren erzielte (Buda S. et al., 2010).

Als Prophylaxe der saisonalen Influenza steht das jährliche Vakzin zur Verfügung. Die Impfquote liegt in Deutschland jedoch bei unter 30 Prozent, obwohl die Influenzaimpfung als gut wirksam eingestuft wird (Pletz et al., 2011b). Geimpfte Patienten erkranken u.a. signifikant seltener an der Grippe und ihre Gesamtmortalität ist im Vergleich zu ungeimpften Personen niedriger. Schließlich ist das Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken oder zu sterben, herabgesetzt (Tessmer et al., 2011).

3.3 Pneumonie

Die Pneumonie ist definiert als „akute oder chronische Entzündung des Lungenparenchyms, meist infektiöser, seltener allergischer, chemischer oder physikalischer Genese“ (Yap et al., 2013). Sie ist die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit in den Industrieländern und belegt Platz eins der Todesursachenstatistik bei Kindern unter 5 Jahren weltweit (WHO, 2008).

Die infektiöse Pneumonie kann unterteilt werden in die ambulant erworbene Pneumonie (community-acquired pneumonia, CAP) und nosokomial erworbene Pneumonie (hospital-acquired pneumonia, HAP) (Grossman et al., 2005).

3.3.1 *Ambulant erworbene Pneumonie*

3.3.1.1 Definition

Definitionsgemäß ist die ambulant erworbene Pneumonie eine akute Infektion des Lungenparenchyms, die sich immunkompetente Patienten ohne Krankenhausaufenthalt im zurückliegenden Monat in der Öffentlichkeit zugezogen haben (Höffken et al., 2010).

3.3.1.2 Epidemiologie

Im Rahmen des bundesweiten Kompetenznetzwerkes CAPNETZ wird die seit 2001 ermittelte Inzidenz der CAP in Deutschland auf bis zu 1010 Fälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr beziffert. Besonders häufig erkranken Kinder unter 5 Jahren und Menschen über 70 Jahren, wobei Letztere 65% aller Erkrankten stellen (Pletz et al., 2011a).

Die Letalität der hospitalisierten Patienten nimmt mit dem Alter zu und kann 14% erreichen (Höffken et al., 2010, Pletz et al., 2011a).

3.3.1.3 Erregerspektrum

Häufigster Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland ist mit 40% *Streptococcus pneumoniae* (s. Abbildung 3-1). Influenza A Viren werden bei bis zu 7% der Patienten nachgewiesen. Die eindeutige Identifikation eines Erregers gelingt jedoch nur bei circa einem Drittel der erkrankten Patienten (Welte and Köhnlein, 2009). Werden aufwendige diagnostische Verfahren wie Feinnadelbiopsien angewendet und damit in 80% der Fälle eine Erregeridentifikation erreicht, kann *S. pneumoniae* bei zwei Drittel aller Erkrankten nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass ein Großteil der Pneumonien mit fehlendem Erregernachweis ebenfalls auf eine Pneumokokkeninfektion zurückzuführen ist (Pletz et al., 2011a)

3.3.2 *Nosokomiale Pneumonie*

Im Gegensatz zur CAP ist die nosokomial erworbene Pneumonie laut Definition eine Lungenentzündung, welche frühestens nach 48 Stunden Krankenhausaufenthalt oder bis zu 14

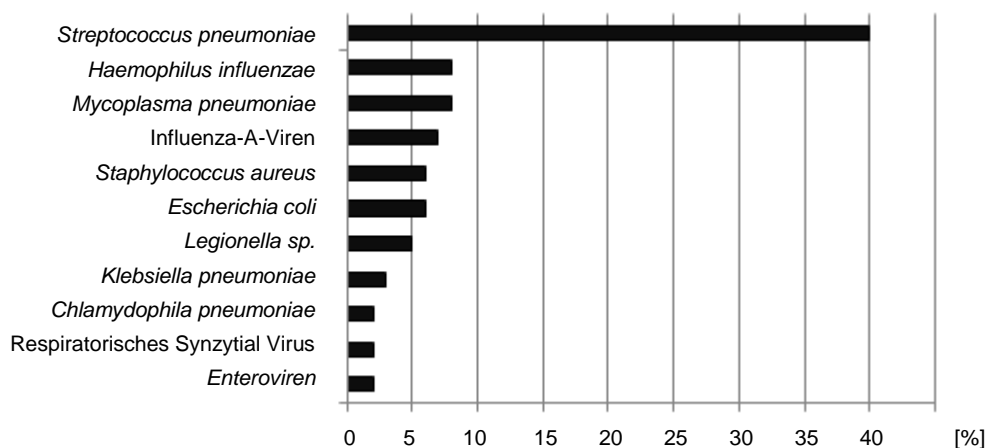


Abbildung 3-1: Ätiologie der ambulant erworbenen Pneumonie
 Anteil aus Blut und Sputum identifizierter Erreger in Prozent bei Patienten mit CAP
 (Welte and Köhnlein, 2009)

Tage nach Entlassung auftritt (Ewig et al., 2010). Sie unterscheidet sich von der CAP im Wesentlichen durch eine höhere Letalität, ein abweichendes Erregerspektrum mit einem größeren Anteil sowohl an gramnegativen Bakterien als auch an *S. aureus* und schließlich durch ein erhöhtes Risiko multiresistenter Erreger (ATS, 2005).

3.3.3 *Pneumokokkenpneumonie*

3.3.3.1 Epidemiologie

Als häufigster Vertreter der ambulant erworbenen Pneumonie nimmt die Pneumokokkenpneumonie eine Sonderrolle ein. Ihr fallen weltweit jedes Jahr mindestens 1-2 Millionen Kleinkinder zum Opfer. Die Zahl der Verstorbenen unter alten, immunkompromittierten oder vorerkrankten Menschen übersteigt wahrscheinlich noch die Letalität bei Kleinkindern (van der Poll and Opal, 2009). In Deutschland liegt die Inzidenz der Pneumokokkenpneumonie bei 150 bis 670 pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Pletz et al., 2011a).

Zu den Risikofaktoren einer invasiven Pneumokokkeninfektion zählen u.a. Asplenie, Alkoholismus, Diabetes mellitus, Alter über 65 Jahre, pulmonale Vorerkrankungen, Influenza- und andere respiratorische Virusinfektionen sowie immunkompromittierende Erkrankungen wie HIV (van der Poll and Opal, 2009). Man spricht von einer invasiven Pneumokokkeninfektion, wenn *S. pneumoniae* aus einem eigentlich sterilen Kompartiment isoliert werden kann, wie z.B. Liquor oder Blut (Lynch and Zhanel, 2010).

3.3.3.2 Kolonisation

Der Erreger der Pneumokokkenpneumonie, *S. pneumoniae*, wird per Tröpfcheninfektion übertragen und kolonisiert anschließend den Nasopharynx. Diese Kolonisation ist altersabhängig und erreicht ihr Maximum von 55% bei dreijährigen Kindern, bevor sich der Anteil an Pneumokokkenträgern bei Kindern über zehn Jahren um 8% einpendelt.

Entsprechend stellen Kleinkinder den wichtigsten Vektor für die horizontale Ausbreitung von *S. pneumoniae* Stämmen dar (Bogaert et al., 2004). Erwachsene sind zu 4-12% Träger eines *S. pneumoniae* Stammes (Lynch and Zhanel, 2010).

3.3.3.3 Serotypen

Unter den bislang 91 beschriebenen Serotypen existieren Isolate mit besonders invasivem Potential, welche als primäre Pathogene fungieren, schnell zu einer invasiven Pneumokokkeninfektion führen und sogar lokal begrenzte Epidemien auslösen können (van der Poll and Opal, 2009).

Auf der anderen Seite existieren Stämme mit geringem invasivem Potential und opportunistischem Verhalten. Obwohl die Kolonisation in diesen Fällen meist asymptomatisch verläuft, kann eine Abwehrschwäche des Wirtes oder ein lokaler inflammatorischer Reiz, z.B. eine Infektion mit respiratorischen Viren, die Konversion von stiller Besiedlung zu invasiver Pneumokokkeninfektion bedingen (Bogaert et al., 2004).

3.3.3.4 Infektion

Gelangt *S. pneumoniae* durch Aspiration in die unteren Atemwege, kann dies zur Entstehung einer Pneumokokkenpneumonie führen (vgl. Abbildung 3-2). Unklar ist in Bezug auf die Septikämie, ob an erster Stelle die Pneumonie mit sukzessiver Blutstrominfektion steht, oder ob Letztere bereits vor der Pneumonie besteht und diese verursacht (Dockrell et al., 2012).

3.3.3.5 Klinik

Die Pneumokokkenpneumonie beginnt meist abrupt mit Schüttelfrost, Fieber, Husten und Kurzatmigkeit. Im Verlauf entwickelt sich ein produktiver Husten mit purulentem Sputum, teils

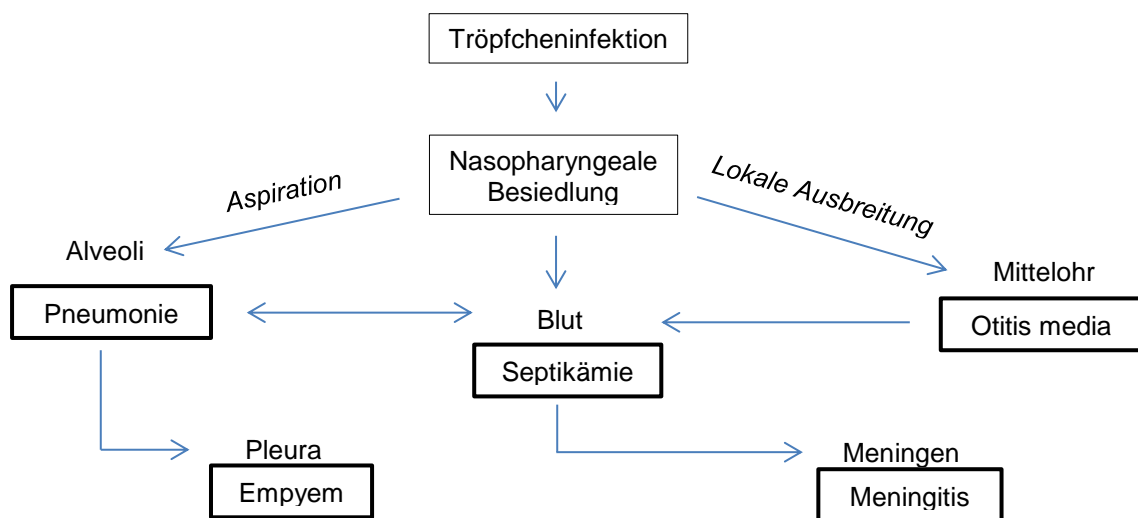


Abbildung 3-2: Pathogenese verschiedener durch *S. pneumoniae* verursachte Erkrankungen
 modifiziert nach Lynch and Zhanel, 2010

begleitet von atemabhängigem Brustschmerz und zunehmender Dyspnoe. Unbehandelt kann die Erkrankung innerhalb weniger Tage zu akutem respiratorischem Versagen, septischem Schock, Multiorganversagen und Tod führen (van der Poll and Opal, 2009).

3.3.3.6 Diagnose

Die Diagnose einer Pneumokokkenpneumonie ist wie jede CAP klinisch nicht zuverlässig zu stellen. Zur differentialdiagnostischen Abgrenzung gegenüber anderen Erkrankungen der unteren Atemwege wie akuter Bronchitis, Influenzainfektion oder akuter Exazerbation einer COPD sollte unter Berücksichtigung des anamnestischen, klinischen (Rasselgeräusch in der Lungenauskultation) und laborchemischen Befundes auch im ambulanten Bereich eine Thoraxröntgenaufnahme in zwei Ebenen durchgeführt werden mit der Frage nach Infiltrat (Höffken et al., 2010).

3.3.3.7 Risikoklassen und CRB-65 bzw. CURB-65

Liegt ein pneumonisches Infiltrat vor, muss zunächst geklärt werden, ob eine stationäre Einweisung erforderlich ist. Neben der Berücksichtigung von Komorbiditäten und anderen Begleitumständen kann die Schweregradeinschätzung z.B. mittels CRB-65 Score als Orientierung dienen (Pletz et al., 2011a) (s.Tabelle 3-2). Die Gesamtpunktzahl des CRB-65 errechnet sich aus der Addition der Punkte aus den beim Patienten vorhandenen Kategorien und korreliert mit der Sterblichkeit (Bauer et al., 2006). Dadurch entstehen drei Risikoklassen oder Schweregrade: Leichte CAP (Letalität<1%) bei 0 Punkten, mittelschwere CAP (circa 10% Letalität) bei 1-2 Punkten und schwere CAP (Letalität 25-35%) bei 3-4 Punkten (Höffken et al., 2010).

Der CURB-65 beinhaltet als weiteres Kriterium den Harnstoffspiegel (**Urea**), welcher bei über 7mmol/l einen zusätzlichen Punkt ergibt. Es ergeben sich die drei folgenden Risikoklassen: Leichte CAP (0-1 Punkte), mittelschwere CAP (2 Punkte) und schwere CAP (3-5 Punkte). In Vergleichsstudien erzielten beide Scores annähernd identische Ergebnisse bezüglich der Risikostratifizierung (Lim et al., 2003).

Tabelle 3-2: CRB/CURB-65 Score der British Thoracic Society

Englisch	Deutsch	Erläuterung	Punkte
C onfusion	Verwirrung	bei alten Patienten evtl. einziges Symptom	1
U rea	Harnstoff	>7mmol/l	1
R espiratory Rate	Atemfrequenz	definiert als Atemfrequenz >30/min	1
B lood pressure	Blutdruck	<90mmHg systolisch	1
A ge	Alter	≥65 Jahre	1*

*Alter über 65 ergibt nur in Kombination mit einem weiteren Kriterium einen Punkt

3.3.3.8 Mikrobiologische Diagnostik

Je nach Risikoklasse der CAP können als mikrobiologische Diagnostik im Verlauf Blutkulturen, Sputum bzw. Trachealsekret, Thorakozentese oder eine bronchoalveoläre Lavage herangezogen werden. Die Anwendung des Antigentests auf *S. pneumoniae* im Urin wird in den aktuellen Leitlinien nicht vorgeschrieben, da Pneumokokken durch das Spektrum der kalkulierten Antibiose abgedeckt werden und zudem stets die Möglichkeit einer polymikrobiellen Infektion besteht (Höffken et al., 2010).

3.3.3.9 Therapie

Die empirische Therapie richtet sich ebenfalls nach dem Schweregrad, da der Erreger der Pneumonie initial unbekannt ist. Vereinfacht dargestellt, können Patienten mit leichter CAP ambulant mit Penicillinderivaten behandelt werden, Patienten mit mittelschwerer CAP sollten stationär eine Ampicillin / Inhibitorkombination ggf. plus Makrolid erhalten. Bei Patienten mit schwerer CAP auf der Intensiv- oder Überwachungsstation scheint eine Kombination aus Beta-Laktamantibiotikum und Makrolidantibiotikum einer Monotherapie überlegen (Welte, 2010).

Antibiotikaresistenzen spielen in Deutschland bei der Behandlung der Pneumokokkenpneumonie derzeit eine untergeordnete Rolle. Im Falle einer Makrolidmonotherapie sollte bei fehlendem Ansprechen nach zwei bis drei Tagen die Möglichkeit einer Infektion mit makrolidresistenten Pneumokokken in Betracht gezogen werden, da 20% der Pneumokokken eine derartige Resistenz aufweisen (Pletz et al., 2011a). Es ist zudem – z.B. bei positiver Reiseanamnese – zu beachten, dass in Ländern wie Spanien und Griechenland bis circa 30% der *S. pneumoniae* Stämme eine Penicillinresistenz aufweisen und auch die Makrolidresistenz höher zu veranschlagen ist (Woodhead, 2002).

3.3.3.10 Prophylaxe

Um einer Pneumokokkenpneumonie oder anderen durch eine *S. pneumoniae* Infektion verursachten Erkrankungen vorzubeugen, stehen zwei Impfungen zur Verfügung.

Zum einen die 23-valente Polysaccharidimpfung (PPV23) für Erwachsene über 60 Jahre sowie Personen ab fünf Jahren mit Risikofaktoren. Die Wirksamkeit des Polysaccharidimpfstoffes ist allerdings umstritten. Eine Metaanalyse aus dem Jahr 2009 kommt zu dem Ergebnis, dass PPV23 weder in der Zielgruppe mit erhöhter Infektionsgefahr noch in gesunden Populationen Pneumonien zu verhindern mag (Huss et al., 2009).

Zum anderen existiert ein 7-valenter Konjugatimpfstoff (PCV-7) für Kinder unter zwei Jahren, welcher die Serotypen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F und 23F umfasst und in US-amerikanischen Studien einen Rückgang invasiver Pneumokokkeninfektionen um 82% zur Folge hatte (CDC, 2008). Neben dem direkten protektiven Effekt konnte durch die Immunisierung von

Kleinkindern, dem Hauptvektor für die Übertragung invasiver Pneumokokkeninfektionen, zudem eine Herdimmunität erreicht werden (Musher, 2006).

2006 wurde PCV-7 in Deutschland von der Ständigen Impfkommission (STIKO) in den Impfkalender aufgenommen und allen Kindern unter 2 Jahren als Standardimpfung empfohlen (RKI, 2006). Nachdem erste Studien zeigten, dass die Anzahl an invasiven Pneumokokkenerkrankungen durch nicht in PCV-7 enthaltene Serotypen seit Einführung der Impfung zugenommen hatten (Hicks et al., 2007), wurde 2010 ein neuer, 13-valenter Konjugatimpfstoff für Kinder eingeführt. Dieser enthält auch den problematischen Serotyp 19A, welcher vermehrt Resistenzen gegenüber einigen Antibiotika entwickelt hat (Huang et al., 2005, Pletz et al., 2011b). In einer Studie an ca. 85.000 Erwachsenen über 65 Jahre konnte zwar ein Schutz vor einem invasiven Verlauf der Pneumokokkenpneumonie gezeigt werden, die Zahl der an Vakzinsertypen oder allgemein Pneumokokkeninfektion Verstorbenen unterschied sich zwischen Verum- und Placebogruppe jedoch nicht (Bonten et al., 2015). Neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der durch *S. pneumoniae* verursachten Pneumonie sind daher notwendig, um innovative Therapieansätze entwickeln zu können.

3.3.4 *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae ist ein circa 1 µm großes, aerophiles, gram-positives Bakterium, das 1881 von Georg Miller Sternberg und Louis Pasteur erstmals beschrieben wurde (Flaumenhaft and Flaumenhaft, 1993). Es ist in Kettenform oder als charakteristisch lanzettförmiger Diplokokkus in klinischen Isolaten, z.B. Sputumproben, nachweisbar (Coonrod, 1989) (s.Abbildung 3-3).

Neben der Pneumokokkenpneumonie kann eine Infektion mit *S. pneumoniae* u.a. Erkrankungen wie akute Otitis media, Meningitis oder Sepsis hervorrufen (s.Abbildung 3-2).



Abbildung 3-3:
Elektronenmikroskopisches Bild
von *S. pneumoniae*
(www.ecuadorciencia.org)

3.3.4.1 Virulenzfaktoren

S. pneumoniae besitzt eine Vielzahl an Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren, welche seine krankmachende Wirkung bestimmen. Unterschiedliche Serotypen können dabei unterschiedliche Virulenzfaktoren besitzen. Diese Faktoren dienen dem Bakterium zur Adhäsion, Kolonisation und Invasion des Wirtes. In der komplexen Interaktion zwischen Bakterium und menschlichem Immunsystem sind die Virulenzfaktoren einerseits Inhibitor verschiedener Wirtsmechanismen zur Abwehr einer Infektion von *S. pneumoniae*. Andererseits wird eine Immunantwort erst durch die Erkennung charakteristischer Strukturen der Virulenzfaktoren aktiviert (van der Poll and Opal, 2009).

- **Polysaccharidkapsel**

Den bedeutendsten Virulenzfaktor stellt nach wie vor die Polysaccharidkapsel dar. Sie erschwert die mechanische Entfernung von *S. pneumoniae* durch Mukus und mindert die Exposition gegenüber Antibiotika. Vor allem aber schützt sie durch räumliche Trennung von Komplementfaktor C3b und Bakterium vor der Komplement-vermittelten Opsonophagozytose bei Invasion (Kadioglu et al., 2008).

- **PAMPs**

Die bakteriellen Zellwandkomponenten wie Peptidoglykane, Teichon- und Lipoteichonsäuren werden zu den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) gezählt und durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt (s. Kapitel 3.4.1) (Mizgerd, 2008).

- **Pneumolysin**

Daneben existiert das Exotoxin Pneumolysin, welches als Porenbildner zytotoxische Wirkung besitzt, die ziliäre Aktivität der bronchialen Epithelzellen inhibiert und über eine Toll-like Rezeptor 4 Interaktion an der Inflammationsvermittlung beteiligt ist (Mitchell and Mitchell, 2010).

- **Virulenz-assoziierte Oberflächenproteine**

Des Weiteren besitzt *S. pneumoniae* zahlreiche Virulenz-assoziierte Oberflächenproteine, die sich in vier Gruppen einteilen lassen: Cholin-bindende Proteine (CBPs), Lipoproteine, Proteine mit einem LPxTG Motiv und Proteine, die keiner bestimmten Klasse zuzuordnen sind (Bergmann and Hammerschmidt, 2006). In Tabelle 3-3 ist eine Übersicht bedeutender Vertreter der Gruppen dargestellt.

Tabelle 3-3: Ausgewählte Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*

Kategorie	Vertreter	Funktion
Cholin-bindende Proteine	PspA	hemmt den klassischen und alternativen Weg der Komplementaktivierung
	PspC (=CbpA)	bindet an plgR und ist so an Transzytose beteiligt
Lipoproteine	PsaA	bindet an E-Cadherin
	Neuraminidase	spaltet terminale Zucker der Wirtszellen und könnte so Adhäsionsrezeptoren freilegen
Nicht klassifizierbar	PavA	bindet an Fibronectin
	Enolase	bindet an Plasminogen

Psp – Oberflächenprotein von *S. pneumoniae*, Cbp - Cholin-bindendes Protein, Psa – Oberflächenadhäsion von *S. pneumoniae*, Pav - Pneumokokkus Adhäsion u. Virulenz, plgR - polymerer Immunoglobulinrezeptor. Modifiziert nach (Kadioglu et al., 2008).

Zwei Oberflächenproteinen konnten bereits Rezeptoren zugeordnet werden: Das pneumococcal surface protein C (PspC) adhärirt an den polymeren Immunoglobulinrezeptor (plgR) und ermöglicht *S. pneumoniae* durch die folgende Transzytose die Überwindung der epithelialen Barriere (Zhang et al., 2000). Das pneumococcal surface adhesin A (PsaA) hingegen

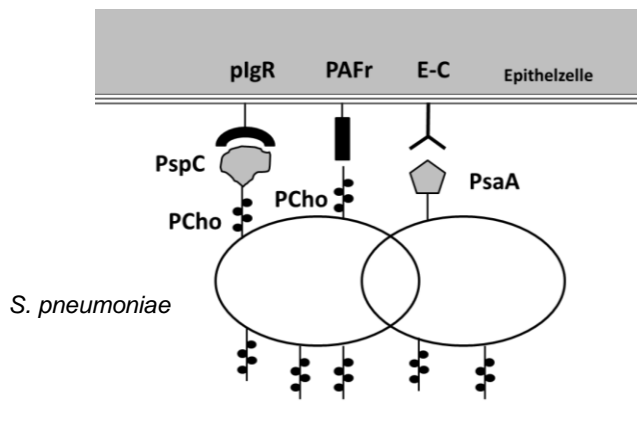


Abbildung 3-4: Adhäsionsfördernde Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*

(nach Bergmann und Hammerschmidt, 2006)

PCho – Phosphorylcholin, PsaA – Pneumokokkus Oberflächenadhäsion A, PspC – Pneumokokkusoberflächenprotein C, E-C – E-Cadherin, plgR – polymerer Immunglobulinrezeptor, PAFr – platelet-activating factor receptor

begünstigt durch Adhäsion an E-Cadherin die Kolonisation und die anschließende perizelluläre Invasion (s. Abbildung 3-4) (Anderton et al., 2007, Attali et al., 2008).

- **Phosphorylcholin**

Eine besondere Oberflächenstruktur stellt das Phosphorylcholin (PCho) der Zellwand dar. Es bindet CBPs wie PspC über ihre Cholin-bindende Domäne nicht-kovalent an die Zellwand und wird über das C-reaktive Protein (CRP) vom angeborenen Immunsystem erkannt. Zudem unterstützt Phosphorylcholin die bakterielle Invasion. Es dient dem platelet-activating factor receptor (PAFr) als Ligand und ermöglicht dadurch *S. pneumoniae* die transzelluläre Migration (Kadioglu et al., 2008, Cundell et al., 1995). PAFr wurde als erster Rezeptor herangezogen, um eine mögliche Interaktion von viraler Erkrankung und *S. pneumoniae* zu erklären (s. Kapitel 3.5.3) (McCullers and Rehg, 2002).

Die Virulenzfaktoren sind entscheidende Werkzeuge um *S. pneumoniae* die Infektion zu ermöglichen. Ihnen steht dabei ein komplexes System aus humoralen Faktoren, Zellen und Rezeptoren gegenüber – das Immunsystem.

3.4 Pulmonale Abwehrmechanismen

Obwohl die Hauptaufgabe der Lunge der Gasaustausch ist, nimmt sie als Grenzfläche zwischen der Umwelt und dem Wirt eine besondere Rolle in der Abwehr von Pathogenen ein. Neben dem Hustenreflex, der mukoziliären Clearance und dem mechanischen Effekt der Epithelbarriere soll vor allem das Immunsystem die Lunge vor Infektionen bewahren (Strieter et al., 2003).

Die Immunität lässt sich in zwei miteinander kommunizierende Systeme einteilen: Das angeborene und das erworbene Immunsystem. Während das phylogenetisch ältere, angeborene Immunsystem keine Antigen-spezifität besitzt, zeichnet sich das erworbene Immunsystem durch die spezifische Erkennung fremder Antigene, eine immunologische Gedächtnisfunktion und pathogen-spezifische Adapterproteine aus. Bei der Ausübung dieser

sich erst im Laufe eines Lebens entwickelnden Funktionen ist das erworbene Immunsystem von der Aktivierung durch das angeborene Immunsystems abhängig (Janeway and Medzhitov, 2002).

3.4.1 *Angeborene Immunität*

Um Pathogene abwehren zu können, muss der Wirt diese erkennen und anschließend eine zielgerichtete Abwehrreaktion ausführen. Das angeborene Immunsystem identifiziert Mikroorganismen über eine begrenzte Zahl von Keimbahn-kodierten, Muster-erkennenden Rezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs). Es existieren verschiedene Klassen von PRRs, denen jedoch gemeinsam ist, dass sie hochkonservierte mikrobielle Strukturen erkennen, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs, s. Kapitel 3.3.4.1) (Janeway and Medzhitov, 2002). Dazu zählen u.a. Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand, aber auch virale RNA. Je nach Rezeptorklasse werden unterschiedliche PAMPs erkannt und spezifische Signalkaskaden aktiviert. Diese münden über die Freisetzung von Zytokinen und Beeinflussung der Zellfunktion in einer charakteristischen Immunantwort (Akira et al., 2006).

Zu den Zellen der angeborenen Immunität werden Monozyten und Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Mastzellen und dendritische Zellen (DCs) gezählt (Lacy and Stow, 2011).

3.4.2 *Pattern-Recognition Receptors, PRRs*

Die PRRs kommen in drei verschiedenen Kompartimenten vor: membranständig, zytosolisch und als sekretorischer Bestandteil der Körperflüssigkeiten.

Die membranständigen Rezeptoren werden durch die Toll-like Rezeptoren repräsentiert (TLRs). Ihre Aktivierung durch Erkennung von PAMPs führt über spezifische Signalwege zur Sekretion verschiedener Chemo- und Zytokine sowie antimikrobieller Peptide (AMPs). Neben der daraus resultierenden Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen wird über die induzierte Reifung dendritischer Zellen das erworbene Immunsystem in die antimikrobielle Abwehr involviert (Kawai and Akira, 2011).

Ebenfalls zur Gruppe der membranständigen Rezeptoren zählen die Scavenger-Rezeptoren (SR). Von vielen Zelltypen exprimiert, können sie eine Reihe unterschiedlichster Liganden wie Bakterien oder apoptotische Zellen internalisieren und werden zunehmend als wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität betrachtet (Peiser et al., 2002).

Die zytosolischen PRRs setzen sich u.a. aus den nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs) und den retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) zusammen. NLRs erkennen bakterielle und virale PAMPs im Zytosol, während RLRs vor allem mit viraler RNA interagieren (Mizgerd, 2008).

Beispiele sezernierter PRRs sind das CRP sowie das Mannan-bindende Lektin (MBL). Beide gehören der Klasse der Akute-Phase Proteine an und werden in der Leber synthetisiert. Während CRP an das Phosphorylcholin (PCho) bakterieller Zellwände bindet und den klassischen Weg des Komplementsystems aktiviert, erkennt MBL mikrobielle Kohlenhydrate und aktiviert den Lektinweg (vgl. Phosphorylcholin, Kapitel 3.3.4.1) (Kadioglu et al., 2008, Medzhitov and Janeway, 2000).

3.4.2.1 Toll-like Rezeptoren

TLRs werden von verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten, aber auch Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert. TLRs bestehen aus einer Ektodomäne mit Leucin-reichen Wiederholungen zur PAMP Erkennung, an die sich eine Transmembrandomäne anschließt, welche in eine zytosolische Toll-IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne übergeht. Die TIR ist für die Aktivierung der nachgeschalteten Signalwege zuständig. Über verschiedene Adapterproteine wie MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) und TRIF (TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β) erfolgt eine Verstärkung der Signalkaskade, welche schließlich zur Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und / oder IRF3/7 (interferon regulatory factor) und damit zur Einleitung einer Immunantwort führt (Kawai and Akira, 2011).

Bislang konnten zehn verschiedene humane TLRs identifiziert werden. TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10

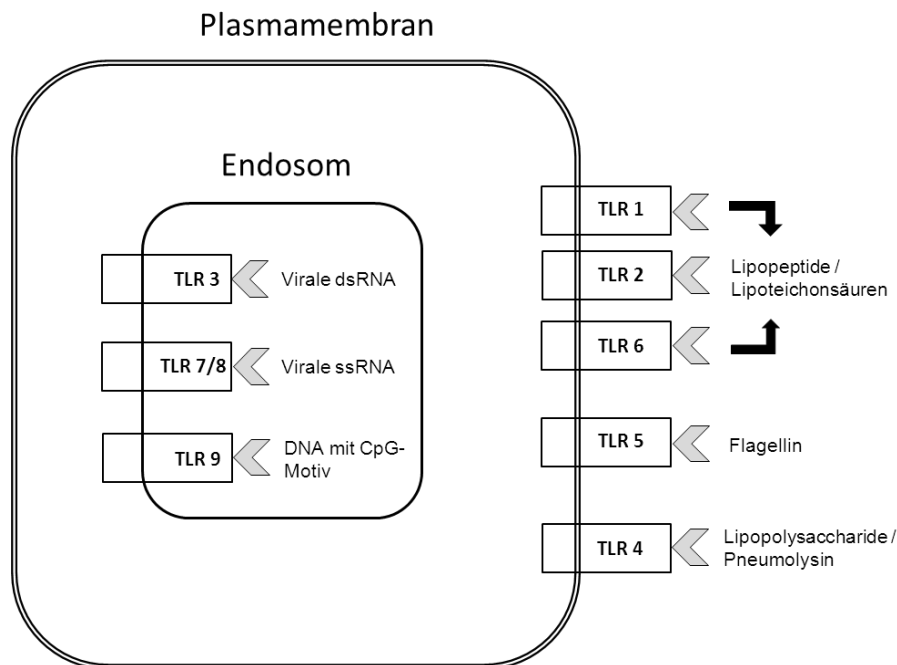


Abbildung 3-5: Übersicht der Toll-like-Rezeptoren und ihrer Liganden.

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) 1 und 6 liegen jeweils mit TLR2 in der Plasmamembran als Dimer vor und erkennen Lipopeptide und Lipoteichonsäuren. Ebenfalls dort lokalisiert sind TLR5, welcher bakterielles Flagellin erkennt, und TLR4, der Lipopolysaccharide und Pneumolysin zu seinen Liganden zählt.

Im Endosom erkennt TLR3 virale Doppelstrang-RNA (dsRNA), TLR7/8 Einzelstrang-RNA (ssRNA) und TLR9 Cystin- und Guaninreiche DNA-Motive (CpG-Motiv). Modifiziert nach (Hippenstiel et al., 2006).

befinden sich in der Zellmembran, während TLR3 und 7-9 von endosomalen Membranen beherbergt werden (s. Abbildung 3-5).

Die TLRs der Zellmembranen erkennen unterschiedliche PAMPs, darunter Lipoproteine (TLR1, TLR2 und TLR6), Lipopolysaccharide und Pneumolysin (TLR4) (Koppe et al., 2011).

Endosomale TLRs hingegen erkennen primär virale RNA (TLR3, TLR7 und TLR8) sowie DNA mit CpG-Motiv (TLR9). Durch ihre Lokalisation können sie virale Nukleinsäuren identifizieren, die von Zellen nach Infektion, Apoptose und Phagozytose im Milieu des Endosoms freigegeben wurden. Zudem werden viele behüllte Viren durch ein Endosom aufgenommen und können so mit endosomalen TLRs in Kontakt treten (Akira et al., 2006). Die Gemeinsamkeit der Viren-erkennenden TLRs besteht in der Freisetzung von Interferonen der Klasse I, die die antivirale Immunantwort des Wirtes einleiten (Kawai and Akira, 2011).

- **TLR3**

TLR3 erkennt virale Doppelstrang-RNA (dsRNA). Da Viren mit Einzelstrang-RNA (ssRNA) wie Influenza bei der Replikation temporär dsRNA produzieren, können auch diese einen Ligand für TLR3 darstellen. Lokalisiert ist TLR3 primär im Endosom, wobei jedoch Ausnahmen existieren: In humanen Fibroblasten z.B. befindet sich dieser Rezeptor an der Zelloberfläche (Vercammen et al., 2008, Jacobs and Langland, 1996).

Erkennt TLR3 dsRNA oder Poly I:C, ein synthetisches dsRNA-Analogon, kommt es über die Aktivierung von TRIF und Zwischenschaltung weiterer Proteine zur Translokation von NF- κ B bzw. IRF3 in den Nukleus. Dies führt zur Sekretion inflammatorischer Zytokine und Interferone der Klasse I (s. Abbildung 3-6) (Ren et al., 2011).

Die Rolle von TLR3 bei viralen Infektionen stellt sich kontrovers dar. Einerseits verhindert TLR3 bei einer pulmonalen Infektion mit dem Respiratorischen Synzytial Virus (RSV) die Entwicklung einer pathologischen Ausbreitung des Virus. Auf der anderen Seite haben Mäuse, deren Lunge mit einem Influenza A Virus inkubiert wird, einen Überlebensvorteil, wenn sie TLR3 nicht exprimieren können (Groskreutz et al., 2006, Le Goffic et al., 2006). Neben seinen unvollständig verstandenen Funktionen im Rahmen der angeborenen Immunität, hat TLR3 als Ko-Rezeptor von CD8+ T-Lymphozyten auch Einfluss auf das erworbene Immunsystem (Vercammen et al., 2008).

- **TLR7**

TLR7 ist ein Rezeptor für virale Einzelstrang-RNA (ssRNA). In konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) erkennt er jedoch auch RNA phagozytierter Streptokokken der Gruppe B (Mancuso et al., 2009). Wie TLR3 ist TLR7 im Endosom lokalisiert. Seine Expression ist besonders in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) ausgeprägt (Kawai and Akira, 2010). Nach Aktivierung von TLR7 durch ssRNA oder Resiquimod, einem synthetischen Agonisten der Toll-like Rezeptoren 7 und 8, wird über das Adapterprotein MyD88 und nachgeschaltete

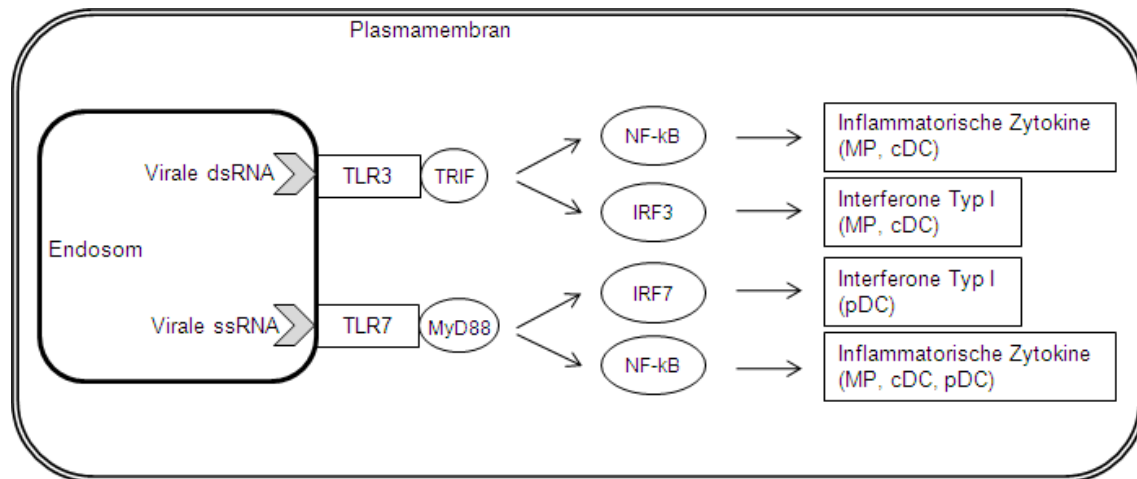


Abbildung 3-6: Signaltransduktion der endosomalen Toll-like Rezeptoren 3 und 7

TLR3 erkennt virale Doppelstrang-(ds)-RNA. Über TRIF (TIR domain-containing adaptor-inducing IFN- β) sowie NF- κ B und IRF3 (interferon-regulatory factor) werden inflammatorische Zytokine bzw. Typ I Interferone in Makrophagen (MP) und konventionellen dendritischen Zellen (cDC) induziert. TLR7 erkennt virale Einzelstrang-(ss)-RNA und veranlasst über MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) und IRF7 exklusiv die Induktion von Typ I Interferonen in plasmazytoiden DCs (pDCs). Via MyD88 und NF- κ B erfolgt die Freisetzung inflammatorischer Zytokine in MPs, cDCs und pDCs. Modifiziert nach (Kawai and Akira, 2011).

Signalmoleküle die Translokation von NF- κ B in den Nukleus veranlasst. Dort initiiert NF- κ B die Sekretion inflammatorischer Zytokine (Hemmi et al., 2002, Jurk et al., 2002).

In pDCs aktiviert TLR7 nach der Erkennung von Liganden neben NF- κ B exklusiv zusätzlich IRF7, und führt so zur Induktion von Interferonen der Klasse I (s.Abbildung 3-6) (Reizis et al., 2011). Es wird angenommen, dass TLR7 in pDCs als eine Art Reserverezeptor für die Erkennung viraler RNA dient, sollte ein Virus die zytosolischen PRRs von Makrophagen und cDCs unerkannt passiert haben (Kawai and Akira, 2011).

3.4.2.2 Scavenger Rezeptoren und LOX-1

- Scavenger Rezeptoren

Die Scavenger Rezeptoren (SRs, engl. *scavenger* Aasfresser) stellen eine Gruppe von strukturell unterschiedlichen Glykoproteinen dar und werden vornehmlich von Makrophagen, dendritischen Zellen und bestimmten Endothelzellen exprimiert. Zu den Liganden gehören Zelltrümmer, apoptotische Zellen, grampositive wie gramnegative Bakterien, aber auch low-density lipoproteins (LDL) des Fettstoffwechsels (Dunn et al., 2008).

Nach bisherigen Erkenntnissen fungieren SRs als wichtige, Phagozytose vermittelnde Rezeptoren und wirken als Ko-Rezeptoren für bestimmte TLRs immunmodulatorisch. SR-defiziente Mäuse sind entsprechend anfälliger für Infektionen durch eine Vielzahl an Bakterien. Zwei SR-Typen, SR-A und MARCO, konnten dabei als Phagozytoserezeptoren für *S. pneumoniae* identifiziert werden. Auf der anderen Seite nutzen Mikroorganismen wie das Hepatitis C Virus und *Plasmodium falciparum* SRs als Eintrittspforte in den Wirt (Areschoug and Gordon, 2009).

- **LOX-1**

Der lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) wurde 1997 als Rezeptor beschrieben, der oxidierte LDL (oxLDL) bindet und internalisiert (Sawamura et al.). Er wird u.a. auf Endothel, glatten Muskelzellen und Makrophagen aber auch Neutrophilen exprimiert (Wu et al., 2011). Des Weiteren wurde kürzlich seine Expression auf bronchialen Epithelzellen beschrieben (Dieudonne et al., 2012). LOX-1 ist ein 50kDa großes, transmembranes Glykoprotein aus 273 Aminosäuren, das in drei Domänen aufgeteilt ist: Eine zytoplasmatische N-terminale ist mit der transmembranen Domäne verbunden, an die sich eine extrazelluläre, C-terminale, Lektin-ähnliche Domäne anschließt, welche Liganden bindet (Ogura et al., 2009).

Als oxLDL Rezeptor rückte LOX-1 primär in den Fokus der Atheroskleroseforschung. Weitere Liganden wie apoptotische Zellen, Phospholipide aber auch grampositive Bakterien wurden identifiziert (Oka et al., 1998, Shimaoka et al., 2001). Zahlreiche Faktoren, darunter oxLDL und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor α), konnten als Induktoren der LOX-1 Expression ausgemacht werden. Interessant ist, dass auch das Herpes simplex Virus eine expressionssteigernde Wirkung hat (s.Tabelle 3-4) (Dunn et al., 2008).

Tabelle 3-4: LOX-1 induzierende Faktoren und zugehörige Zelllinie

Induktor	Zelllinie	Referenz
TNF- α	BAEC	(Kume et al., 1998)
Scherkräfte	BAEC	(Murase et al., 1998)
Lipopolysaccharide	BAEC	(Nagase et al., 1998)
oxLDL	BAEC	(Aoyama et al., 1999)
TGF- β	BAEC, BASMC	(Minami et al., 2000)
Herpes simplex Virus	ECV-304	(Chirathaworn et al., 2004)
TNF- α	16 HBE	(Dieudonne et al., 2012)

Die proatherogenen und proinflammatorischen Eigenschaften von LOX-1 lassen sich wie folgt zusammenfassen: Nach Adhäsion und Internalisation von oxLDL via LOX-1 erfolgt eine Aktivierung der NADPH-Oxidase, welche in der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) mündet. Diese befördern die Atheroskleroseentstehung auf drei Arten: (I) In die Intima eingeschlossene LDL werden durch ROS zu oxLDL oxidiert, eine Grundvoraussetzung für die Entstehung von Schaumzellen. (II) ROS inaktivieren Stickstoffoxid, das als Vasodilatator der Plaqueformation entgegenwirkt. (III) Über die ROS-vermittelte Aktivierung von NF- κ B adhären Monozyten und reifen nach der Einwanderung in die Intima zu Makrophagen, die an der Phagozytose von oxLDL zu Grunde gehen und so die Plaqueformation unterstützen. Die ebenfalls NF- κ B vermittelte Einleitung apoptotischer Prozesse befördert die Ausbildung nekrotischer Areale und erhöht so das Risiko einer Plaqueruptur (Dunn et al., 2008).

Der Ausgangspunkt dieser atherogenen Reaktionen liegt in der Internalisierung von oxLDL durch LOX-1 in Intima bzw. Makrophagen. Durch einen gegen oxidierte Phospholipide bzw.

oxidierte Lipoproteine gerichteten monoklonalen Antikörper kann die Erkennung und Internalisierung von oxLDL durch LOX-1 inhibiert werden. Das entscheidende Epitop, gegen welches diese anti-oxLDL Antikörper gerichtet sind, ist Phosphorylcholin (Horkko et al., 1999, Caligiuri et al., 2007).

In Kapitel 3.3.4.1 wurde Phosphorylcholin (PCho) bereits als Bestandteil der Zellwand von *S. pneumoniae* erwähnt (s. Abbildung 3-4). Damit teilen sich der Ligand von LOX-1, nämlich oxLDL, und *S. pneumoniae* ein Epitop. Die Beobachtung, dass Mäuse, die eine *S. pneumoniae* Impfung erhalten haben, eine geringere Progredienz atherosklerotischer Läsionen aufweisen, zeigt auf, dass eine molekulare Mimikry zwischen dem PCho des Pneumokokkus und dem PCho der oxLDL existiert (Binder et al., 2003). Auch das gegen PCho gerichtete CRP (s. Kapitel 3.3.4.1) bindet sowohl an *S. pneumoniae* als auch an oxLDL, wie in Abbildung 3-7 dargestellt (Szalai et al., 1995, Chang et al., 2002).

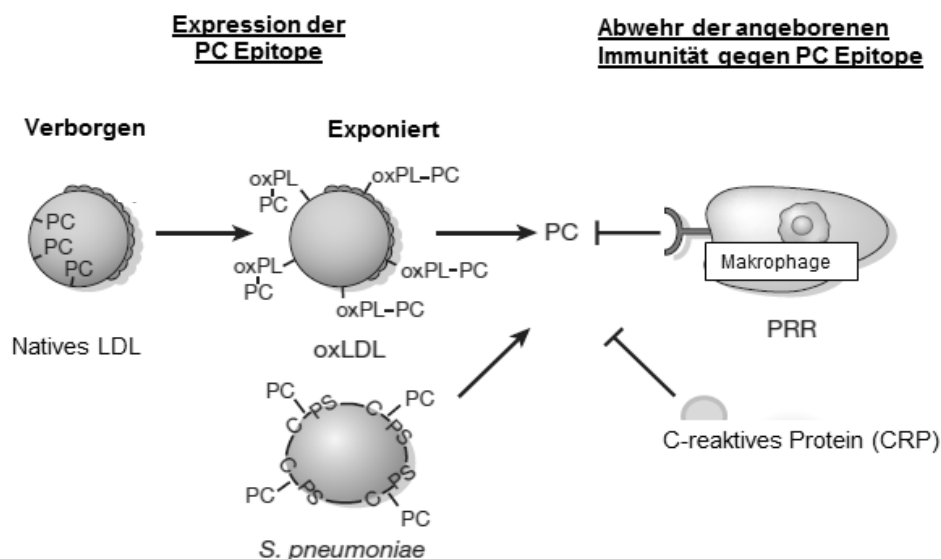


Abbildung 3-7: Molekulares Mimikry von *S. pneumoniae* und oxLDL

Durch Oxidation der Phospholipide (oxPL) nativer LDL wird das verborgene Phosphorylcholin (hier: PC) der LDL exponiert und kann von CRP aber auch PRRs wie LOX-1 erkannt werden.

S. pneumoniae besitzt an seiner Oberflächen neben kapsulären Polysacchariden (C-PS) ebenfalls PC und wird von CRP erkannt. Modifiziert nach (Binder et al., 2002).

Diese Zusammenhänge weisen auf eine mögliche Rolle von LOX-1 als einen – neben PAFr – weiteren Rezeptor für *S. pneumoniae* hin. Da die Expression von LOX-1 durch eine virale Infektion gesteigert werden kann (s. Tabelle 3-4), könnte postviral vermehrt exprimiertes, epitheliales LOX-1 als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* dienen.

Diese Hypothese beschreibe einen neuen Mechanismus, um den Synergismus von Pneumokokkenpneumonien nach viraler Vorerkrankung zu erklären.

3.4.3 Zytokine

Zytokine sind pleiotropische Peptide, die als Botenstoffe von verschiedenen Zellen freigesetzt werden und immunologische sowie inflammatorische Reaktionen regulieren. Dabei beteiligen sie sich bei der Erkennung von Pathogenen, der Rekrutierung von Leukozyten und der Abwehr der eingedrungenen Mikroorganismen (Strieter et al., 2003).

Man kann Zytokine in verschiedene Klassen einteilen, darunter der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Interferone der Klasse I und II (IFN), Interleukine wie IL-10 und Chemokine (wie Interleukin-8) (Strieter et al., 2003).

Wie bereits beschrieben, haben viele PAMP-Rezeptor Interaktionen die Aktivierung des NF- κ B Signalweges zur Folge. Dabei werden TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und andere proinflammatorische Zytokine freigesetzt und zeichnen für die frühe Inflamationsreaktion verantwortlich. Sie induzieren weitere proinflammatorische Zytokine und Enzyme wie die Cyclooxygenase-2, veranlassen Makrophagen zur Phagozytose und setzen Akute-Phase Proteine frei (Chen and Goeddel, 2002).

Typ I Interferone werden v.a. nach Detektion viraler PAMPs über die Aktivierung von IRFs freigesetzt (Abbildung 3-6). Über eine Vielzahl von Mechanismen wirken sie einer progredienten viralen Infektion entgegen. Dazu zählen u.a. die Reduktion der zellulären Proteinbiosynthese mit konsekutiver Replikationshemmung der viralen Erbinformation, die Induktion des Reifungsprozesses bei DCs und Monozyten sowie die Aktivierung von NK-Zellen (Alsharifi et al., 2008). Interferon γ , ein Typ II Interferon, wird von T-Helfer Zellen abgegeben und unterstützt über die Aktivierung von Makrophagen die Abwehr viraler und intrazellulärer bakterieller Pathogene (Weyand et al., 2011).

IL-10 hingegen übt seine Wirkung über Monozyten aus. An diesen Zellen hemmt es die Phagozytose, verhindert die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und hält die Zellen außerdem von der Antigenpräsentation ab. So wirkt IL-10 insgesamt immunsuppressiv und antiinflammatorisch (Sabat, 2010).

3.4.3.1 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8 / CXCL-8) ist ein wichtiges Zytokin für die von neutrophilen Granulozyten vermittelte, akute Entzündungsreaktion. Es besteht aus 69 bis 77 Aminosäuren und wird u.a. von Neutrophilen, NK-, Endothel- sowie Epithelzellen als Antwort auf bestimmte Reize synthetisiert. Dazu zählen proinflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF, aber auch bakterielle PAMPs wie CbpA und Pneumolysin (s. Kapitel 3.3.4.1) (Bernatoniene et al., 2008).

IL-8 bindet an zwei Rezeptoren, CXCR1 und CXCR2, und übt durch die Aktivierung von Kinasen verschiedene Effekte auf die Zelle aus: Seine chemotaktische Wirkung vermittelt IL-8 über die Beeinflussung von Integrinen und Selektinen, was zu Adhäsion und Transmigration von Neutrophilen durch Endothel und pulmonales Epithel führt. An Neutrophilen induziert es

zudem die Degranulation sowie den oxidativen Burst und trägt so zur Pathogenabwehr bei. Darüber hinaus wirkt IL-8 auch auf B-Zellen und CD4+ T-Zellen chemotaktisch (Mukaida, 2003).

3.5 Diskutierte Mechanismen viral-bakterieller Interaktionen

Es existieren verschiedene Ansätze, um den Synergismus von viraler Infektion und bakterieller Superinfektion in der Lunge zu erklären. Drei Kategorien lassen sich dabei aufstellen: Epitheliale Schädigung, Störung der angeborenen Immunantwort und die Steigerung der Expression bzw. Zugänglichkeit von Adhäsionsrezeptoren.

3.5.1 *Epitheliale Schädigung*

Eine der ersten aufgestellte Hypothesen beschrieb die bronchopulmonalen Läsionen nach Influenzainfektion als den Faktor, welcher die sekundär-bakterielle Adhäsion begünstigt (vgl. Kapitel 3.2) (Muir and Wilson, 1919). Tatsächlich unterstützen verschiedene Mausmodelle diese Theorie, wenn ein besonders pathogenes Virus, wie das Maus-adaptierte Influenza Virus A/Puerto Rico/8/34(H1N1) verwendet wird (McCullers and Rehg, 2002, Loosli et al., 1975). Zum einen wird durch Nekrose des respiratorischen Epithels mit seinem Zilienapparat (Influenza A) oder durch die direkte Schädigung der Zilien (Rhinovirus) ein wichtiger Mechanismus zur Entfernung aspirierter Bakterien beseitigt. Zum anderen liegt die basale Zellmembran der Epithelien nach einer Schädigung frei und könnte so die bakterielle Adhäsion begünstigen (Hament et al., 1999).

Gegen diese Hypothese als singuläre Erklärung spricht jedoch, dass auch bei Verwendung von Viren niedriger Pathogenität und entsprechend intaktem Epithel, eine intensivere bakterielle Besiedlung *in vivo* gelingt (Harford and Hara, 1950, Sellers et al., 1961). Andere Mechanismen müssen entsprechend in Betracht gezogen werden.

3.5.2 *Störung der angeborenen Immunität*

Neutrophile und Makrophagen haben als phagozytierende Vertreter der angeborenen Immunität eine Schlüsselrolle bei der Beseitigung von Pathogenen inne. Bereits 1982 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass der oxidative Metabolismus und die bakteriziden Kapazitäten von Monozyten und Granulozyten nach postviraler Infektion mit Bakterien abgeschwächt sind (Abramson et al.). Diese Beobachtung konnte für neutrophile Granulozyten *in vivo* bestätigt werden und ging mit einem hohen Level an IL-10 einher (McNamee and Harmsen, 2006). Werden Mäuse mit einem anti-IL-10 Antikörper behandelt, weisen sie nach postviraler *S. pneumoniae* Infektion eine signifikant niedrigere Letalität auf als unbehandelte Mäuse. Entsprechend wird IL-10 als ein weiterer, für postvirale Pneumokokkenpneumonien prädisponierender Faktor ausgemacht (van der Sluijs et al., 2004).

Daneben konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Interferon- α Knockoutmäuse nach Poly I:C Stimulation und *S. pneumoniae* Infektion eine verminderte bakterielle Belastung der Lunge und ein verbessertes Überleben gegenüber dem Wildtyp aufweisen (Tian et al., 2012). In einer weiteren *in vivo* Studie hatte IFN- γ nach einer viralen Infektion der Lunge einen supprimierenden Effekt auf die alveoläre, Makrophagen-vermittelte Abwehr von applizierten Pneumokokken (Sun and Metzger, 2008). Eine mögliche Erklärung bietet die Tatsache, dass IFN- γ die Expression des Phagozytose- bzw. Scavengerrezeptors MARCO vermindert und so eine pulmonale Ausbreitung von *S. pneumoniae* fördert. Doch auch nach Blockade von IFN- γ lässt sich ein – wenn auch abgeschwächter – Synergismus von viraler Infektion und sekundär-bakterieller Besiedlung messen (Sun and Metzger, 2008). Dies deutet auf weitere, diesem Synergismus zugrunde liegende, Mechanismen hin.

3.5.3 Steigerung der Zugänglichkeit und Expression von Adhäsionsrezeptoren

Bevor *S. pneumoniae* erfolgreich in den Wirt eindringen kann, bedarf es der Adhäsion an das pulmonale Epithel. Entsprechend existieren neben den bereits beschriebenen Einflüssen verschiedener Zytokine auch Erklärungsmodelle, welche die Adhäsion ins Zentrum rücken. So könnten die nach viraler Infektion zur Regeneration freigesetzten Fibrine und Fibrinogene neue Adhäsionsflächen bieten. Des Weiteren ist bekannt, dass virale Neuraminidasen terminale Sialinsäuren aus den Glykokonjugaten epithelialer Zellen schneiden können und eindringenden Pneumokokken so initial kryptische Adhäsionsrezeptoren zugänglich machen (McCullers, 2006).

Ein zusätzlicher Mechanismus scheint die durch das Virus induzierte vermehrte Expression von Pneumokokken-bindenden Rezeptoren zu sein (Hakansson et al., 1994). Konkrete Adhäsionsrezeptoren für *S. pneumoniae* nach postviraler Infektion konnten bislang jedoch nicht benannt werden. Die einzige Ausnahme bildet der platelet-activating factor receptor (PAFr). Dieser ubiquitäre, G-Protein gekoppelte Rezeptor zeichnet sich durch drei Eigenschaften aus: (I) Er bindet auf aktivierten Zellen das in der Zellwand von *S. pneumoniae* enthaltene Phosphorylcholin (PCho, s. Kapitel 3.3.4.1). (II) PAFr fördert dabei die Internalisierung der gebundenen Bakterien und ihre intravasale Migration, (III) ohne eine rezeptoreigene

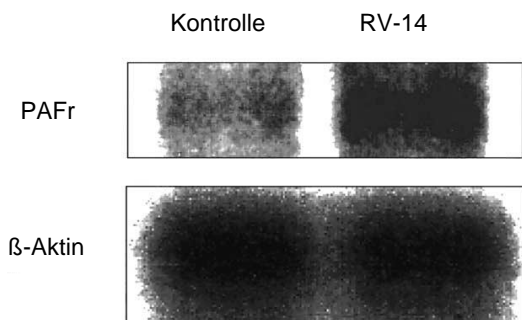


Abbildung 3-8: Auswirkung einer Rhinovirusinfektion auf die Expression von PAFr
 Humane tracheale Epithelzellen wurden mit einem Rhinovirus Serotyp 14 (RV-14) infiziert und anschliessend die Expression des platelet-activating factor receptor (PAFr) auf mRNA Ebene detektiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen. β -Aktin wurde als Beladungskontrolle verwendet (Ishizuka et al., 2003).

Signaltransduktion zu aktivieren (Cundell et al., 1995).

Die Expression von PAFr auf humanen trachealen Epithelzellen wird *in vitro* nach Infektion mit einem Rhinovirus gesteigert (s. Abbildung 3-8) und bedingt so konsekutiv eine verstärkte Adhäsion von *S. pneumoniae*. Dieser Synergismus von Virus und *S. pneumoniae* stellt eine mögliche Erklärung für gehäufte Pneumokokkenpneumonien nach Infektion mit einem Rhinovirus dar (Ishizuka et al., 2003).

In vivo stehen sich unterschiedliche Beobachtungen gegenüber. Van der Sluijs und Kollegen inkubierten PAFr-defiziente Mäuse und einen Wildtyp erst mit einem Influenza A Virus und 14 Tage später mit *S. pneumoniae*. In den Kategorien pulmonale bakterielle Besiedlung, Mortalität und pulmonale IL-10 Level wiesen Tiere ohne PAFr niedrigere Werte auf (van der Sluijs et al., 2006). Dem widersprechend zeigten PAFr-defiziente Mäuse in einem ähnlichen Versuch nach Influenza- und konsekutiver *S. pneumoniae*-Infektion eine größere Mortalität sowie höhere IL-1 β , TNF- α und IL-6 Level. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass „die erhöhte Adhäsion von Pneumokokken an respiratorischem Epithel, welche nach Inkubation mit Influenza *in vitro* beobachtet wird, nicht ausschließlich von PAFr vermittelt wird“ (McCullers et al., 2008).

3.6 Zielsetzung

Die postvirale Pneumokokkenpneumonie ist eine häufige Komplikation respiratorischer Virusinfektionen und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Der beobachtete Synergismus von viraler Infektion und postviraler bakterieller Superinfektion ist bislang allerdings nur unvollständig verstanden. Eine Schlüsselrolle könnten dabei Rezeptoren einnehmen, die *S. pneumoniae* die Adhäsion und Invasion an pulmonalem Gewebe ermöglichen und nach viraler Infektion vermehrt zugänglich sind oder exprimiert werden.

LOX-1 erscheint hier ein möglicher Kandidat: Bereits bei anderen Bakterien konnte eine Bindung an LOX-1 nachgewiesen werden, zudem besteht zwischen seinem natürlichen Liganden oxLDL und dem maßgebenden Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, *S. pneumoniae*, eine molekulare Mimikry (Binder et al., 2003, Shimaoka et al., 2001). Seine Expression kann durch eine Vielzahl an Reizen induziert werden, u.a. mittels viraler Infektion bzw. Simulation derselben (Chirathaworn et al., 2004, Dieudonne et al., 2012). Über die Expression von LOX-1 auf pulmonalem Gewebe ist allerdings bislang wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine mögliche Rolle von LOX-1 bei der Pathogenese postviraler Pneumokokkenpneumonien zu untersuchen. BEAS-2B Zellen dienen dabei als Modell für das bronchiale Epithel des Menschen als direkte Kontaktfläche des Körpers mit Pathogenen. Durch Verwendung von TLR 3 und -7 Agonisten sollen universelle, Virustyp-unabhängige Aussagen über die Auswirkungen viraler Infektionen auf LOX-1 Expression und die *S. pneumoniae* Adhäsion gewonnen werden. Des Weiteren sollen evtl. Unterschiede zwischen LOX-1 und dem bereits identifizierten Pneumokokkenrezeptor PAFr geprüft werden (s. Kapitel 3.5.3).

Zusammenfassend sollen die folgenden maßgeblichen Fragen beantwortet werden:

- Wird LOX-1 auf pulmonalem Gewebe exprimiert?
- Wird die Expression von LOX-1 durch die Aktivierung von TLR3 bzw. TLR7 beeinflusst?
- Bindet *S. pneumoniae* an LOX-1?
- Hat LOX-1 immunmodulatorische Funktion?

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen.

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Assays (z.B. ELISA, RNA Aufreinigung) werden hier nicht extra gelistet. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen sind den entsprechenden Abschnitten im Kapitel Methoden zu entnehmen.

4.1.1 *Humane Lungengewebeproben*

Vitale Lungengewebeproben wurden Patienten entnommen, die sich einer Lungenresektion aufgrund peripherer Lungenkarzinome unterzogen hatten. Das Durchschnittsalter der Studienpopulation betrug $69,7 \pm 2,1$ Jahre. Patienten mit klinischen und diagnostizierten Lungeninfektionen wurden aus der Studie ausgeschlossen. Der Locus der Biopsie musste mindestens 5 cm vom Karzinom entfernt sein. Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt. Entnommene Biopate wurden geschnitten und in RPMI mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS über Nacht inkubiert. Nach Wechsel des Mediums wurden je nach Versuchsaufbau entsprechende Stimulanzen hinzugegeben.

4.1.2 *Humane bronchiale Epithelzelllinie (BEAS-2B)*

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten BEAS-2B-Zellen entstammen normalen humanen bronchialen Epithelzellen (NHBE), die per Autopsie aus einer gesunden Spenderlunge gewonnen wurden. Nach Transfektion dieser Zellen mit einem Adenovirus hybrid 12-SV40 (Ad12SV40) wurde eine verlängerte *in vitro* Lebensdauer sowie eine kontinuierliche Proliferation erreicht (Reddel et al., 1988). In einigen Arbeiten wurde bestätigt, dass BEAS-2B-Zellen weiterhin Bronchialzell-spezifische Eigenschaften besitzen (Adamou et al., 1998). Die BEAS-2B-Zellen bleiben ohne Zugabe von Serum undifferenziert. Sie wurden zwischen Passage 7 und 30 eingesetzt.

4.1.3 *Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen*

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen verschiedenster Ausführungen wurden alle bei Falcon® bezogen.

4.1.4 Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten

Das für das Zellkulturmedium verwendete FCS wurde für eine Dauer von 30 min auf 56°C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt.

Tabelle 4-1: Kulturmedien und Kryokonservierung BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Stimulationsmedium	500 ml Keratinocyte SFM	Gibco
	2.50 µg Epithelial Growth Factor	Gibco
	25 mg Bovine pituitary extract	Gibco
	5 ml 200 mM Glutamine 100x	Gibco
	250 µl Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	Sigma
	50 µl trans-Retinolsäure (1 mg/ml)	Sigma
Zellkulturmedium	500 ml Stimulationsmedium	
	200 µl Amphotericin B 500x	Roche
Adhäsionsflüssigkeit	100 ml Keratinocyte SFM	Gibco
	1 ml Bovine Serumalbumin (BSA) (100 mg/ml)	Sigma
	1 ml Fibrinectin (1mg/ml)	Sigma
	100 µl Vitronectin (50 µg/ml)	Sigma
EinfriermEDIUM	500 ml Zellkulturmedium	
	10% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Tabelle 4-2: Kulturmedien und Kryokonservierung humanes Lungengewebe

Humanes Lungengewebe	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Kulturmedium	500 ml RPMI Medium	Gibco
	10% FCS	Gibco
	5 ml Glutamin 200 mM 100 x	Gibco

4.1.5 *Streptococcus pneumoniae*

Der unbekapselte *Streptococcus pneumoniae* R6x Stamm wurde über chemische Mutagenese aus der Unterlinie 6 des Rockefeller Stammes R36A generiert (Tiraby and Fox, 1973). Letzterer entstammt ursprünglich dem Stamm D39 wt (Serotyp 2).

4.1.6 Bakterienkultur

Nach Fertigstellung der Medien wurden diese für 10 min bei 115°C autoklaviert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 4-3: Medien für die Bakterienkultur

S.p. R6x	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Anzuchtsbouillon	30 g Todd Hewitt Broth	BD Mikrobiologie
THY-Medium	5 g Hefeextrakt	Sigma
	A. bidest. ad 1000 ml	
<i>S. pneumoniae</i> Kryomedium	80% Anzuchtsbouillon 20% Glycerol (99%)	Sigma

Tabelle 4-4: Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Bezugsquelle
-----------------------	------------------	--------------

Columbia Agar Platten	Anzucht von <i>S. pneumoniae</i>	BD Mikrobiologie
Gentamycin 20 ml	Antiinfektivum	Gibco
Sterile Watteträger	Überführen von Bakterien	Applimed SA
Einmal Impfösen 10 µl	Ausplattieren von Bakterien	Roth

4.1.7 *Influenza A/Panamá/2007/1999 (H3N2)*

Das zur Infektion der humanen Lungengewebeproben verwendete Influenza Virus A/Panamá/2007/1999 (H3N2) wurde freundlicherweise gebrauchsfertig von der Arbeitsgruppe um Stefan Hippenstiel und unter Unterstützung von Anne Becher zur Verfügung gestellt.

4.1.8 *Stimulantien und Enzyme*

Tabelle 4-5: Stimuli

Stimulus	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Poly I:C	synthetisch	Amersham
Resiquimod R-848	synthetisch	Novartis

Tabelle 4-6: Enzyme

BEAS-2B-Zellen	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Trypsin / EDTA 1x	Ablösen der Zellen	Gibco
M-MLV Reverse Transkriptase	Umschreibung mRNA zu cDNA	Invitrogen
Red Taq Polymerase	Vermehrung der cDNA	Sigma

4.1.9 *Puffer, Lösungen und Gele*

Tabelle 4-7: PCR-Puffer

PCR Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Lysepuffer	1 ml RLT	Quiagen
TAE Puffer, pH 8,0	4,84 g Tris Base	Sigma
	1,14 ml Eisessig 100%ig	Merck
	2 ml EDTA 0,5 M	Roth
	Aqua bidest ad. 1000 ml	

Tabelle 4-8: PCR-Gel

PCR-Gel	Zusammensetzung	Bezugsquelle
	TAE Puffer	
	1,5% Agarose	Promega
	0,4 µg/ml Ethidiumbromid	Invitrogen

Tabelle 4-9: Western blot-Puffer

Western blot-Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Phosphoprotein- waschpuffer	5 ml Natriumorthovanadat 98%ig 200 mM	Sigma
	50 ml Natriumpyrophosphat 150 mM	Sigma
	50 ml Natriumfluorid 99%ig 1 M	Sigma
	Dulbeccos PBS 1 x ad 500 ml	PAA
Gesamtprotein- extraktionslysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	Sigma
	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	1 mM PMSF	Sigma
	je 10 µg/ml Antipain, Leupeptin,	

MATERIAL UND METHODEN

Lyse-Puffer fraktionierte Proteinextraktion	Pepstatin	Sigma
	0,25 mM EDTA	Roth
	Phosphoproteinwaschpuffer ad 1 ml	
	1,5 mM MgCl ₂	Sigma
	10 mM KCl	Merck
Western blot-Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
(Zytosol/Kern)	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	1 mM DTT	Serva
	Phosphoproteinwaschpuffer ad 1 ml	
Lyse-Puffer fraktionierte Proteinextraktion (Zytosol/Membran)	0,1 M NaCl	Merck
	1 % Triton	Sigma
	10 mM HEPES ph 7,9	Roth
	2 mM EDTA	Roth
	4 mM Natriumrthovanadat	Sigma
Bradford Reagenz	40 mM Natriumfluorid	Sigma
	1 mM PMSF	Sigma
	20% BioRad Protein Assay	BioRad
Gelladepuffer (Blaupuffer)	80% A. bidest.	
	1 ml Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	Sigma
	0,8 ml Glycerol	Sigma
	0,6 ml SDS (10% w/v)	Serva
	0,4 ml Bromphenolblau (1% w/v)	BiotechPharmacia
Gelelektrophoresepuffer	0,4 ml β-Mercaptoethanol (1% v/v)	Sigma
	A.bidest. ad 5 ml	
	3 g Tris-Base	Sigma
	14,4 g Glycin	Merck
	1 g SDS (10% w/v)	Serva
Blotpuffer	A. bidest. ad 1000 ml	
	3 g Tris-Base	Sigma
	14,4 g Glycin	Merck
	20% Methanol	Merck
Blockpuffer	A. bidest. ad 1000 ml	
	50% Ody Blocking Buffer	LI-COR

Tabelle 4-10: Western blot-Gele

Western blot-Gele	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Sammelgel	2,5 µl Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Sigma
	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	1,33 ml 40%iges Bis-Acrylamid	Serva
	10 µl TEMED R&D	Systems
	40 µl Ammoniumpersulfat 10%ig	Serva
Trenngel 10 %ig	A. bidest. ad 10 ml	
	2,5 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Sigma
	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	3,35 ml 40%ige Bis-Acrylamid	Serva
	5 µl TEMED	R&D Systems
	50 µl Ammoniumpersulfat 10%ig	Serva#
	A. bidest. ad 10 ml	

Tabelle 4-11: ELISA Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Carbonatpuffer 0,1 M pH 9,5	4,2 g NaHCO ₃	Merck

	1,78 g Na ₂ CO ₃	Merck
	500 ml A. bidest. Ad	
Blockpuffer	45 ml Dulbecco PBS 1x	PAA
	5 ml FCS	Gibco
Stopplösung 2NH ₂ SO ₄	27,47 ml H ₂ SO ₄	Merck
	500 ml A. bidest ad	

4.1.10 Primer, small interfering RNAs (siRNAs) und Plasmide

Alle verwendeten PCR-Primer wurden über TIB MOLBIOL erworben. Die spezifischen siRNAs stammen von Ambion.

Tabelle 4-12: PCR-Primer-Sequenzen für semiquantitative PCR

Gen		Sequenz
TLR3	vorwärts	5'-TAGCAGTCATCCAACAGAATCAT
	rückwärts	5'-AATCTTCTGAGTTGATTATGGGTAA
TLR7	vorwärts	5'-CTCCCTggATCTgTACACCTgTgAg
	rückwärts	5'-CTCCACAgAgCCTTTTCCggAgCT
GAPDH	vorwärts	5'-CCACCCATGGCAAATTCC ATGGCA
	rückwärts	5'-TCTAGACGGCAGGCAGGTCAGGTCCACC

Tabelle 4-13: Sonstige PCR-Primer

Primer	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Random Hexamer Primer	Reverse Transkription	Promega

Tabelle 4-14: siRNA Sequenzen

Gen		Sequenz
Kontrolle	vorwärts	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt
	rückwärts	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA
TLR3	vorwärts	5'-GGAUAGGUGCCUUUCGUCAtt
	rückwärts	5'-UGACGAAAGGCACCUAUCCgt
TLR7	vorwärts	5'-GGAUUACUCAUAUGCUAAtt
	rückwärts	5'-UUAGCAUAUGAGUAAUUCctt
LOX-1	vorwärts	5'-UUCUUUAUGAGAUCAGACCUGGG
	rückwärts	5'-ACUUCUUGGAGAUUCAGGUUCUGGC
PAFr	vorwärts	5'-ACUGUUUCCUCACCAAGAAtt
	Rückwärts	5'-UUCUUGGUGAGGAAACAGUag

Tabelle 4-15: Plasmide

Plasmid	BezugsQuelle
pcDNA6.2 LOX-1	Invitrogen

4.1.11 Primäre und sekundäre Antikörper Western blot und Konfokalmikroskopie

Tabelle 4-16: Primäre Antikörper Western blot

Primärer Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
LOX-1	Maus	Hycult Technologies
PAFr	Ziege	Santa Cruz
TLR3	Kaninchen	Santa Cruz
TLR7	Ziege	Santa Cruz
β-Aktin	Ziege	Santa Cruz
FAK	Maus	Santa Cruz

ERK2	Maus	Santa Cruz
------	------	------------

Tabelle 4-17: Sekundäre Antikörper Western blot

Sekundärer Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	LI-COR
anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	LI-COR
anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an IRDye800	LI-COR
anti-Ziege-IgG	Esel, gekoppelt an IRDye800	LI-COR

Tabelle 4-18: Primäre Antikörper Konfokalmikroskopie

Primärer Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
anti-S.p. R6x	Kaninchen	Invitrogen

Tabelle 4-19: Sekundäre Antikörper Konfokalmikroskopie

Sekundärer Antikörper	Spezies	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen

4.1.12 Geräte

Die in Laboratorien standardmäßig eingesetzten Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Schüttler, Eismaschinen usw. werden in dieser Arbeit nicht extra aufgeführt. Sie entsprechen alle den gängigen Standards und wurden regelmäßig gewartet.

Tabelle 4-20: Speziell verwendete Geräte

Gerät	Verwendungszweck/Methode	Bezugsquelle
BioRad Gelelektrophorese-System	Gelelektrophorese (Western blot)	BioRad
BlotSystem	Proteintransfer (Western blot)	Transblot
Odyssey Infrared Imaging System	Dokumentation (Western blot)	LI-COR
Platereader	Auslesen der ELISA Platten	STL
Thermomixer Comfort (Western blot)	Erhitzen der Proteine auf 95°C	Eppendorf
LSM5 Pascal	Konfokalmikroskopie	Zeiss
AtuFECT01	siRNA und cDNA Transfektion	Silence Therapeutics
FastPrep®-24	Lyse, Homogenisation und Aufschluss	MP Biomedicals

4.1.13 Verbrauchsmaterialien

Allgemein verwendete Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Ähnliches entsprechen den gängigen Standards und werden hier nicht extra aufgeführt.

Tabelle 4-21: Speziell verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen

Produkt	Verwendungszweck	Bezugsquelle
dNTP Mix	DNA-Bausteine (RT-PCR)	Promega
Hybond Membran	Proteintransfer (Western blot)	Santa Cruz
Quarzglasküvetten	RNA- und Plasmid DNA-Messung	Hellma
Recombinant Protein	Standard zur Größenbestimmung eines	Amersham
Molecular weight marker	Proteins im Western blot	Life science
ThermowellTM Tubes	DNase und RNase-freie Reaktionsgefäße	Costar®
Whatman Filterpapier	Proteintransfer (Western blot)	Whatman

RNase A	RNA-Abbau	Sigma
DNase I	DNA-Abbau	Qiagen
Produkt	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Proteinase K	Protein-Abbau	Merck
Protein	Agarose A und G Immunpräzipitation	Upstate
PFA	Zellfixation	Merck
Triton	Zellpermeabilisierung	Sigma
Phalloidin	Färbung des Aktins	Invitrogen
Perma Fluor	Eindeckelmedium	Beckmann Coulter
Biopsiestanzen	Probenentnahme aus den Biopaten	PFM
Ampuwa 1000 ml	Zellyse	Fresenius Kabi

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einem Arbeitsplatz mit der Sicherheitsstufe S2 an einer Reinraumwerkbank und entsprechend sterilen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Geräte waren heißluftsterilisiert, Lösungen sterilfiltriert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit. Medien und Lösungen wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

4.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der BEAS-2B-Zellen

Vor jedem Versuch mit BEAS-2B-Zellen bzw. Splitting derselben wurden die entsprechenden Kulturflaschen (T₇₅) bzw. -schalen mit Adhäsionsflüssigkeit versehen. Dabei musste die Oberfläche des zu besäenden Kulturkörpers mit ausreichend Lösung bedeckt und für eine halbe Stunde bei 37°C im Inkubator belassen werden. Nach flüssiger Lösung wurde in einem nächsten Schritt abpipettiert und gesammelt, um wiederverwertet werden zu können.

Nach Ausbildung eines Monolayers konnten die Zellen zur Subkultivierung herangezogen werden. Hierzu wurde das Medium der T₇₅ Flaschen entfernt und die Zellschicht einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung je T₇₅er Flasche hinzugegeben und diese fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen konnten nun in 10ml PBS gesammelt werden. Nach Überführung in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen wurde die entstandene Suspension fünf Minuten bei Raumtemperatur und 172 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes konnte das aus BEAS-2B-Zellen bestehende Zellpellet in 200 µl Trypsin-Inhibitor (30mg/ml, Roche) resuspendiert werden. Nun folgte die Aufnahme in 40 ml Zellkulturmedium, wobei auf eine mehrmalige Resuspension geachtet wurde um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Medium zu erreichen. Nachdem die BEAS-2B-Zellen eine 1:4 Verdünnung erfahren hatten, konnten mit dem nunmehr vorhandenen Medium entsprechend Zellkulturflaschen oder Kulturschalen neu versetzt werden. Bis zur Entstehung neuer Monolayers wurde das

Zellkulturmedium alle drei Tage gewechselt. Anschließend konnte der gewünschte Versuch oder eine erneute Verdünnung zur Gewinnung weiterer Zellen begonnen werden.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahlen

Um die Zellzahlen zu bestimmen, wurden 20 µl der, wie oben beschrieben, erhaltenen Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Es wurden jeweils die Zellzahlen von 16 Kleinquadraten herangezogen um die Zellzahl eines Großquadrates zu bestimmen. Dabei wurden alle Zellzahlbestimmungen als Duplikate angelegt und die Mittelwerte errechnet. Die Zellzahl pro ml Suspension errechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Zellzahl aus 2 Großquadraten} / 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

4.2.1.3 Kryokonservierung

Die BEAS-2B-Zellen wurden zur Kryokonservierung wie bei der Subkultivierung beschrieben behandelt. Nach der Abzentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml des entsprechenden Einfriermediums resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt (2-3 x 10⁵ Zellen pro Kryoröhrchen). Diese wurden zunächst für fünf Stunden auf -20°C und anschließend für 15 Stunden auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Danach wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

4.2.1.4 Auftauen der Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellen in 10 ml warmem Zellkulturmedium und die Sedimentation für fünf Minuten bei 172 g. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten. Alle mit Bakterien in Kontakt getretene Materialien oder Geräte wurden anschließend mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert. Materialien, welche mit den Bakterien in Kontakt getreten waren und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden im Anschluss autoklaviert.

4.2.2.1 Sterilisation

Autoklavierbare Nährmedien und Lösungen wurden bei 115°C und 1 bar Überdruck für zehn Minuten im Autoklaven sterilisiert, Glaswaren und Pipetten wurden im Hitzeschrank bei 180°C trockensterilisiert.

4.2.2.2 Bakterienkultur

- Lagerung und Anzucht von *S. pneumoniae* R6x

Die Infektion der BEAS-2B-Zellen mit *S. pneumoniae* erfolgte aus einem Bakterienstock, welcher bei -80°C gelagert wurde.

Zur Gewinnung des Stocks wurden die Pneumokokken auf Columbia Agarplatten (supplementiert mit 5% Schafsblut) ausgestrichen. Die Agarplatten wurden bis zur Ausbildung deutlicher Kolonien im CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Einzelne stehende Kolonien konnten nun erneut auf frische Columbia Agarplatten übertragen werden und ihrerseits inkubiert werden. Am folgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien mittels eines sterilen Watteträger in Kryoröhrchen, welche 1ml Kryomedium enthielten, eingebracht und bei -80°C gelagert.

Am Tag vor der Stimulation wurde dem Stock eine geringe Menge gefrorenes Kryomedium entnommen, in 3-Strich-Methode auf Columbia Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Einzelne stehende Kolonien konnten anschließend mittels sterilem Watteträger in vorgewärmte Todd Hewitt Bouillon (mit 0,5% Hefe supplementiert) überführt werden. Dabei wurde eine Pneumokokkenkonzentration zwischen $3-6 \times 10^7$ cfu/ml eingestellt, wobei zur Ermittlung dieser Konzentration ein Spektralphotometer bei einer optischen Dichte (OD) von 600nm herangezogen wurde (OD₆₀₀ 0,03-0,06 entspricht $3-6 \times 10^7$ cfu/ml). Von dieser Anfangskonzentration ausgehend, wurde die Pneumokokkus-Todd Hewitt Bouillon unter mikroaerophilen Bedingungen gelagert, bis eine Konzentration von $2-4 \times 10^8$ cfu/ml (OD₆₀₀ 0,2-0,4) erreicht war. Bei dieser Konzentration erreichen die Pneumokokken optimale Infektionseigenschaften und befinden sich in einer mittleren logarithmischen Wachstumsphase.

- Stimulation der Zellen mit *S. pneumoniae*

Nachdem eine OD von 0,2-0,4 erreicht war, wurden die Pneumokokken in 50 ml Zentrifugationsröhrchen bei 1800 g für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Bouillon-Überstand abgesaugt und das verbleibende Bakterienpellet in BEAS-2B Kulturmedium so resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^8 cfu/ml erreicht wurde. Die den Versuchen entsprechenden Infektionskonzentrationen wurden durch weitere Verdünnungsreihen des Infektionsmediums eingestellt.

Die Hitzeinaktivierung der Pneumokokken erfolgte bei 65°C im Wasserbad für sechs Stunden.

4.2.2.3 Adhäsionsassay mit *S. pneumoniae* R6x

BEAS-2B-Zellen wurden dem Versuch entsprechend vorbehandelt, z.B. mit siRNA oder Toll-like Rezeptor Agonisten. Nach Ablauf der versuchsspezifischen Stimulationszeit erfolgte die Zugabe des Infektionsmediums in die einzelnen Kulturschalen bis zu einer Zielkonzentration von 1×10^7 cfu/ml. Die Zellen wurden dabei über einen Zeitraum von 30, 60, 120 oder 240 Minuten mit *S. pneumoniae* R6x inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und jedes Well dreimal mit sterilem PBS gewaschen, um nicht adhärierte Kokken zu entfernen. Es folgte die Lyse der BEAS-2B-Zellen durch Zugabe von Ampuwa H₂O, wobei das hinzugegebene Volumen der Menge des ehemals enthaltenen Kulturmediums entsprach. Nach fünfminütiger Wartezeit wurden die lysierten Zellen mit einem Scraper durchmischt und mehrmals mit der Pipette zur Herstellung einer homogenen Suspension resuspendiert. Abschließend wurde der Ampuwa-Zell Suspension ein festgelegtes Volumen entnommen und dieses nochmals mit PBS verdünnt, um dann auf Blutagarplatten ausgestrichen zu werden. Diese wurden unter Standardbedingungen im Inkubator über Nacht aufbewahrt. Am Folgetag konnte die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten von *S. pneumoniae* R6x gezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsgrades die ursprüngliche Anzahl adhärierter Pneumokokken pro Well errechnet werden.

4.2.2.4 Infektion humaner Lungengewebeproben mit Influenza A/Panamá/2007/1999 (H3N2)

Tumorfrees Lungengewebe wurde wie in 4.1.1 beschrieben gewonnen und den resultierenden Gewebestreifen durch Biopsiestanzen ca. 3 mm dicke und 8 mm im Querschnitt messende Zylinder entnommen. Die Biopate wurden zehn Minuten in 50 ml eisgekühltem RPMI Medium gewaschen, um anschließend in 24-Wellplatten mit 1,5 ml RPMI Infektions- und Kulturmedium eingewogen zu werden. Das mittlere Gewicht der Proben lag bei 110mg. Vor der Stimulation wurden die Proben bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert.

Dann erfolgte bei Raumtemperatur über eine Stunde und unter leichtem Schwenken die Beimpfung der Gewebezylinder in 500 µl RPMI Medium mit 4×10^5 Plaque-Forming Units des von der AG Hippenstiel bereitgestellten Virus. Nach Ablauf der Beimpfungszeit wurde das Kulturmedium gewechselt und das infizierte Lungengewebe 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Sofern keine direkte Weiterverarbeitung erfolgte wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Extraktion und Konzentrationsbestimmung von Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen und wird hier nicht aufgeführt.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde anhand der Lichtabsorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm im Abgleich gegen das verwendete Lösungsmittel (RNase-freies Wasser) bestimmt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten in einem Spektralphotometer. Das Absorptionsmaximum von RNA beträgt 260 nm, das von Proteinen 280 nm. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der RNA-Gehalt wird wie folgt berechnet: $OD_{260} \times 4 = \text{RNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$. Eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD_{260} (Optimum RNA Absorption) und OD_{280} (Optimum Protein Absorption) bestimmt werden. Als „rein“ wurden RNA-Proteinquotienten zwischen 1,7 und 1,9 angesehen. Bis zur weiteren Verwendung wurde RNA bei -80°C eingefroren.

4.2.3.2 Semiquantitative RT-PCR

- **cDNA Synthese**

Pro Ansatz wurde 1 μg RNA mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 10 μl verdünnt. Die Proben wurden nach Zugabe von je 0,5 M dNTPs und 10 ng/ml Hexamer-Primer für fünf Minuten bei 65°C im Thermal Cycler inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt und folgendes zum Denaturierungsansatz hinzugefügt:

1/5 Vol 5 x M-MLV Puffer, 1/10 Vol DTT und 40 U RNasin zu einem Gesamtvolumen von 20 μl . Die Proben wurden für weitere zwei Minuten bei 37°C im Thermal Cycler inkubiert.

Anschließend wurde 200 U M-MLV RT pro Ansatz dazugegeben. Die Reaktion erfolgte bei einer Inkubation für 50 Minuten bei 37°C und wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 72°C beendet. Die cDNA wurde durch 80 μl A. bidest. verdünnt. Nicht direkt für die PCR eingesetzte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

- **Polymerase Kettenreaktion und Gelelektrophorese**

Die PCR Reaktionen wurden auf den Peltier Thermalcycler von MJ Research abgestimmt. In einem PCR Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 μl wurden 2 μl cDNA, 1/10 Vol. 10x PCR Puffer, 200 μM dNTPs, 6,25 ng/ml jedes Primers und 1 U Red-Taq Polymerase eingesetzt. Die PCR im Thermal Cycler lief unter folgenden Konditionen: drei Minuten Denaturierung bei 94°C , eine Minute Hybridisierung bei primerspezifischer Hybridisierungstemperatur, eine Minute Elongation bei 72°C und nach entsprechend häufiger Wiederholung dieses Zyklus abschließend fünf Minuten Extension bei 72°C .

Am Ende der Reaktion wurde der Ansatz auf 4°C heruntergekühlt. Zum Nachweis der DNA-Fragmente wurden die PCR Produkte auf ein 2%iges Agarosegel in 1 x TAE Puffer aufgetragen. Dazu wurde Agarosepulver mit 1 x TAE Puffer vermischt und in der Mikrowelle erhitzt. Zur späteren Sichtbarmachung der DNA-Fragmente wurde Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) hinzugegeben. Die noch flüssige Agarose wurde in eine Gelkammer mit eingesetztem Gelkamm gegossen. Nachdem sich die Agarose verfestigt hatte, konnten die Proben in die

Probentaschen gegeben werden. An die Elektrophoreskammer wurde eine konstante Spannung von 120 V angelegt und nach Progression von 2/3 des Ladepuffers durch das Gel wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel mittels UV-Transilluminator und einer Olympus Kamera (CAMEDIA C-4040 200M) fotografiert.

4.2.3.3 Transiente Transfektion von small interfering RNA (siRNA) und Plasmid-DNA

Für BEAS-2B-Zellen erfolgte die transiente Transfektion mittels Atufect™. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Lipofektion, bei der es zur Bildung von positiv geladenen Lipid-DNA-Komplexen kommt. Diese binden an die negativ geladene eukaryotische Zellmembran und werden anschließend durch Endozytose aufgenommen.

Zur Durchführung dieser Methode wurden BEAS-2B-Zellen bis zu einer Konfluenz von 50% in Zellkulturschalen kultiviert. Die zu verwendende siRNA wurde in einem Gesamtansatz von 100 µl Keratinocyte SFM mit Atufect™ gemischt und der Ansatz 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nun wurde für 5×10^5 Zellen 1 µg siRNA/Lochschale im Verhältnis 1:2 mit Atufect™ eingesetzt.

4.2.4 *Biochemische Methoden*

4.2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-linked Immunosorbent Assay ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das eine enzymatische Farbreaktion mit einer spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper verknüpft. Dabei wird zunächst das Substrat an die vorbehandelte Oberfläche des Reaktionsgefäßes gebunden und im darauf folgenden Schritt ein dagegen gerichteter enzymgekoppelter Antikörper zugegeben. Nach Zusatz des enzymespezifischen Substrates zum Reaktionsgemisch beginnt dessen Umsetzung zu einem farblich differenzierten Produkt, dessen optische Dichte nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure bei 450 nm (λ Korrektur bei 570 nm) gemessen werden kann. Der ELISA wurde mittels Detection Kits durchgeführt. Antikörper und Enzymreagenz wurden in Carbonatpuffer, die zu untersuchenden Proben in Blockadepuffer verdünnt oder unverdünnt eingesetzt.

Nach entsprechender Vorbehandlung von BEAS-2B-Zellen mit siRNA (s. 4.2.3.3) wurde *Streptococcus pneumoniae* hinzugegeben und nach Ablauf der Infektionszeit die Überstände aufgenommen.

Die Messung von IL-8 aus den Überständen erfolgte mittels eines spezifischen ELISA von BD Biosciences und nach Protokoll des Herstellers, welches hier nicht extra aufgeführt wird.

4.2.4.2 Isolierung von Gesamt- und fraktionierten Proteinextrakten

- **Gesamtproteinextraktion**

Nach erfolgter Stimulation der BEAS-2B-Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit je 2 ml eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Es folgten Zellyse und Abschaben der Zellen auf Eis mit 100 µl Lysepuffer. Die Proben wurden 10 Minuten zentrifugiert (4 °C, 13.000 rpm), um die lösliche Proteinfraction zu gewinnen. Die Überstände wurden abgenommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

- **Fraktionierte Extraktion von zytosolischen und Kernproteinen**

Für die fraktionierte Proteinextraktion wurden die Zellen eines konfluenten Monolayers mit Phosphatproteinwaschpuffer gewaschen, pro 6-Loch-Platte in 100 µl Lysepuffer sieben Minuten auf Eis inkubiert und bei 12000 g für drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand, welcher die zytosolischen Proteine enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Das Pellet wurde mit 50 µl Gesamtproteinextraktionslysepuffer versetzt, sieben Minuten auf Eis inkubiert und drei Minuten bei 25000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält nun die Kernproteinfraction und wurde bei -80°C eingefroren.

- **Proteinextraktion aus humanen Lungengewebebeobachten**

Zur Aufarbeitung der mit dem Virus beimpften Proben wurden diese initial in flüssigen Stickstoff gegeben. Den Proben wurden leere Matrixröhrchen zugeordnet, diese auf Eis gelagert und 750 µl Westernblotlysepuffer zugegeben. Anschließend wurden die gefrorenen Gewebestücke in die Matrixröhrchen überführt, aufgetaut und mittels FastPrep®-24 im Kühlmodus 4x30 Sekunden bei 6 m/s homogenisiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 13.000 rpm über zehn Minuten. Die resultierenden Überstände wurden abgenommen und erneut mit gleichen Kennzahlen zentrifugiert. Die so erhaltenen Proteinlösungen konnten nun der Proteinbestimmung nach Bradford zugeführt werden.

4.2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Das in dem Lysat vorhandene Protein wurde durch ein BioRad Protein-Assay nach Bradford quantifiziert. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass der Farbstoff Comassie Brilliant Blue sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verlagert, wenn er basische und aromatische Aminosäuren bindet. Nach 5-minütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung in 995 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, wobei eine Küvette mit 1 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung ohne Protein zur Eichung des Spektralphotometers diente.

4.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Trenngel (7-16%) wurde zwischen zwei Glasplatten, die in eine Gelgießvorrichtung (Firma BioRad) eingespannt waren, gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation konnte das Ethanol entfernt und das Sammelgel gegossen werden, in welches Kämme zur späteren Probenbeladung eingeführt wurden. Nach vollständiger Auspolymerisation wurden die Glasplatten in eine Elektrophoresekammer eingespannt, mit Laufpuffer gefüllt und 60-200 µg Protein in die Geltaschen geladen. Die Proben wurden zuvor im Verhältnis 1:1 bzw. 1:4 mit Gelladepuffer + 5% β-Mercaptoethanol versetzt und fünf Minuten bei 95°C unter Schütteln erhitzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinmarker (Rainbow™ der Firma Amersham) aufgetragen. Der Sammelgellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm, der Trenngellauf bei 15 V/cm. Hatte der Bromphenolfarbstoff das untere Ende des Gels erreicht, wurde die Elektrophorese gestoppt. Im Anschluss wurden die separierten Proteine im Gel auf eine Membran transferiert.

4.2.4.5 Western blot

Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese aus der Elektrophoresekammer entnommen und auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran aufgelegt. Um die Gel-Membranvorrichtung wurde ein Sandwich gebildet, in dem drei in Blotpuffer getränkte Lagen 3M-Whatman-Filterpapiere je Seite und die Blotvorrichtung gemäß Herstellerangabe angewendet wurden.

Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in die Blotkammer eingesetzt und zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V und 4°C für eine Stunde geblottet.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Blockpuffer für drei Stunden unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Danach wurde sie über 2-16 Stunden bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockpuffer inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils 10-minütigem Waschen (PBS + 0,1% Tween20) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur ein gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper eingesetzt. Die sekundären Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS + 0,1% Tween20 und einmaliges Waschen mit PBS von der Blotmembran entfernt. Die am primären Antikörper gebundenen, mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem speziellen lasergestützten System (Odyssee Infrared Imaging System) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet.

4.2.4.6 Konfokalmikroskopie

Die auf Glasplättchen in 24-Loch-Zellkulturschalen ausgesäten Zellen wurden nach Ablauf der Infektionszeit mit 3%igem PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 1%igem Triton 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach 30-minütigem Blocken mit 5%igem Serum wurde *S. pneumoniae* R6x mit einem spezifischen primären Antikörper

angefärbt und dieser anschließend mit einem sekundären Antikörper detektiert. Zelluläres Aktin wurde mit Phalloidin für 30 Minuten bei Raumtemperatur angefärbt. Zwischen allen Schritten, außer nach dem Blocken, erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die so behandelten Präparate wurden auf Objektträger mit Eindeckelmedium verbracht, mit Nagellack versiegelt und bis zum Mikroskopieren bei 4°C gelagert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Zeiss LSM5 Pascal) und der dazugehörigen Software „AxioVision“.

4.2.5 Statistik

Alle dargestellten Experimente wurden mindestens dreimal erfolgreich durchgeführt. Die gewonnenen Daten wurden – falls erforderlich – mit Hilfe des Shapiro Wilk Tests auf Normalverteilung geprüft.

Die anschließend zur statistischen Analyse verwendeten Tests waren „One-way-ANOVA“ und „Newman Keuls post-Test“ für ELISA-Daten sowie „Two-way-ANOVA“ und „Bonferroni post-Test“ für das Adhäsionsassay. Im Rahmen eines statistischen Gutachtens wurde für die Abbildung 5-6 eine nicht parametrische ANOVA nach Brunner durchgeführt. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% (* $p < 0,05$); 1% (** $p < 0,01$) und 0,1% (** $p < 0,001$) als signifikant betrachtet und zeigen den Vergleich zur Kontrolle.

Zur Erstellung der Diagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzen wurde das Programm PRISM5.0 (Graph Pad Prism®) verwendet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen stammen von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Abbildungen von Western blot, PCR und Konfokalmikroskopie zeigen jeweils repräsentative Gele und Bilder von wenigstens drei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen mit gleichem Ergebnis.

5 ERGEBNISSE

Bereits seit der Zeit der Spanischen Grippe ist bekannt, dass Pneumokokkenpneumonien vermehrt nach viraler Infektion, z.B. durch Influenza auftreten (Muir and Wilson, 1919). Fast ein Jahrhundert später muss McCullers festhalten, dass “die Rezeptoren, die Pneumokokkus nutzt um zu adhären und die Lunge zu besiedeln, gegenwärtig unbekannt sind” (McCullers, 2006). Die einzige Ausnahme stellt bislang der platelet-activating factor receptor (PAFr) dar, dessen tatsächliche Rolle bei der Genese der Pneumonie, zumal der postviralen Pneumonie, jedoch umstritten ist (Cundell et al., 1995, McCullers et al., 2008, van der Sluijs et al., 2006). Ausgehend von der Hypothese des lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) als weiteren Adhäsionsrezeptor für *Streptococcus pneumoniae* sollte dessen Rolle bei der Pathogenese der postviralen Pneumokokkenpneumonie untersucht werden.

5.1 BEAS-2B-Zellen exprimieren LOX-1

Die pulmonale Expression von LOX-1 ist bislang kaum untersucht. Lediglich eine Veröffentlichung beschreibt die Expression von LOX-1 auf immortalisierten (16 HBE) und primären (HBEC) bronchialen Epithel- sowie auf BEAS-2B-Zellen (Dieudonne et al., 2012). Auf der alveolaren Epithelzelllinie A549 hingegen wird LOX-1 nicht exprimiert (Yamanaka et al., 1998). Entsprechend sollte in einem initialen Experiment überprüft werden, ob an BEAS-2B-Zellen der Nachweis von LOX-1 möglich ist. Die LOX-1 Expression wurde dabei sowohl an nicht stimulierten als auch – in einem Zeitreihen-Infektionsversuch – an mit *S. pneumoniae* R6x infizierten Zellen mittels Western blot überprüft. Wie aus Abbildung 5-1 ersichtlich, exprimieren BEAS-2B-Zellen bereits in unstimuliertem Zustand LOX-1. Darüber hinaus kann nach einer Infektionszeit von 120 und 240 Minuten ein deutlicher Anstieg des Proteins beobachtet werden. In diesem Versuch wurde gezeigt, dass BEAS-2B-Zellen LOX-1 exprimieren und die Expression durch Infektion mit *S. pneumoniae* R6x zunimmt.

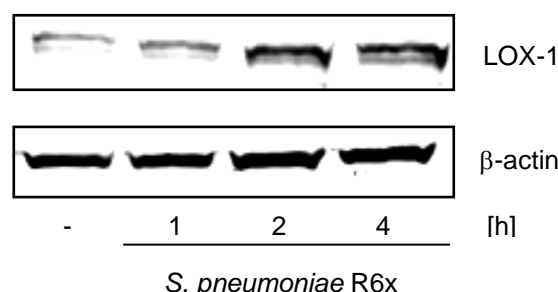


Abbildung 5-1: *S. pneumoniae* induziert LOX-1 auf BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B-Zellen wurden über eine, zwei und vier Stunden mit *S. pneumoniae* R6x infiziert. Die dadurch induzierten Veränderungen auf die LOX-1 Expression wurden mittels Western blot Verfahren analysiert. Der Nachweis erfolgte aus dem Gesamtproteinlysate über spezifische Antikörper für LOX-1. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde im Western blot das konstant exprimierte β-Aktin detektiert. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur mit BEAS-2B Medium versetzt.

5.2 Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Toll-like Rezeptor 3 und 7 Agonisten steigert die Expression von LOX-1

Die LOX-1 Expression auf Neutrophilen ist zum Teil abhängig von der Aktivierung der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (Wu et al., 2011). Die für eine Pneumokokkenpneumonie prädisponierenden Viren hingegen werden von bronchialem Epithel unter anderem durch die Toll-like Rezeptoren (TLR) 3 und 7 erkannt (Pang and Iwasaki, 2011, Alexopoulou et al., 2001). Ob dies einen Einfluss auf die LOX-1 Expression hat, ist bislang nur unvollständig untersucht: Auf dem Zelltypus 16 HBE hatte eine Konzentration an Poly I:C von 10µg/ml keine Auswirkungen auf die LOX-1 Expression (Dieudonne et al., 2012). Deshalb sollte durch den Einsatz unterschiedlicher Konzentrationen der Agonisten Poly I:C für TLR3 und Resiquimod für TLR7 untersucht werden, ob die Aktivierung dieser TLRs die Expression von LOX-1 auf bronchialen Epithelzellen beeinflusst.

Dazu wurden BEAS-2B-Zellen über vier Stunden mit Poly I:C und Resiquimod in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und die Auswirkungen der Stimulation auf die LOX-1 Expression mittels Western blot Verfahren untersucht.

BEAS-2B-Zellen, die mit einer Poly I:C Konzentration von 100 µg/ml versetzt wurden, zeigten einen Anstieg des Proteingehalts an LOX-1. Resiquimod wirkte unabhängig von der eingesetzten Konzentration als starker Induktor von LOX-1 (s. Abbildung 5-2).

In diesem Versuch konnte gezeigt werden, dass die LOX-1 Expression auf BEAS-2B-Zellen durch Aktivierung der Toll-like Rezeptoren 3 und 7 verstärkt wird.

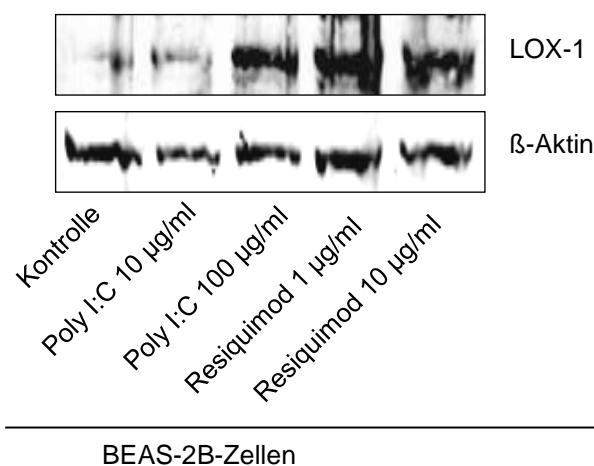


Abbildung 5-2: Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Agonisten der Toll-like Rezeptoren 3 und 7 steigert die Expression von LOX-1

BEAS-2B-Zellen wurden vier Stunden mit Poly I:C und Resiquimod in zwei verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Die dadurch induzierten Veränderungen auf die LOX-1 Expression wurden mittels Western blot Verfahren analysiert. Der Nachweis erfolgte aus dem Gesamtproteinlysate über spezifische Antikörper für LOX-1. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung wurde im Western blot das konstant exprimierte β-Aktin detektiert. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur mit BEAS-2B Medium versetzt.

5.3 LOX-1 dient *S. pneumoniae* R6x an BEAS-2B-Zellen als Adhäsionsrezeptor

Die molekulare Mimikry von oxLDL und *S. pneumoniae* (s. Abbildung 3-7) deutet auf eine mögliche Rolle von LOX-1 als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* hin. An aortalen Rinderendothelzellen (BAEC) konnte durch Adhäsion des grampositiven Bakteriums *Staphylococcus aureus* an LOX-1 zudem nachgewiesen werden, dass LOX-1 bakterielle Liganden prinzipiell binden kann (Shimaoka et al., 2001). Daher sollte geprüft werden, ob LOX-1 als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* an humanen Bronchialepithelzellen dient.

5.3.1 *Beas-2B-Zellen binden nach LOX-1 Knockdown weniger S. pneumoniae*

Die Expression von LOX-1 in BEAS-2B-Zellen wurde durch den Einsatz spezifischer siRNA gehemmt. Diese Zellen wurden mit *S. pneumoniae* R6x infiziert und deren Adhäsion untersucht. Zum Vergleich wurde der für Pneumokokken bereits beschriebene Adhäsionsrezeptor PAFr herangezogen.

Die Expression von LOX-1 und PAFr konnte durch den Einsatz der spezifischen siRNA deutlich reduziert werden (s. Abbildung 5-3 A, B). Im Adhäsionsassay zeigte sich, dass an Zellen mit LOX-1 Knockdown nach 30 Minuten signifikant weniger Bakterien adhärirten ($p < 0,001$) als an

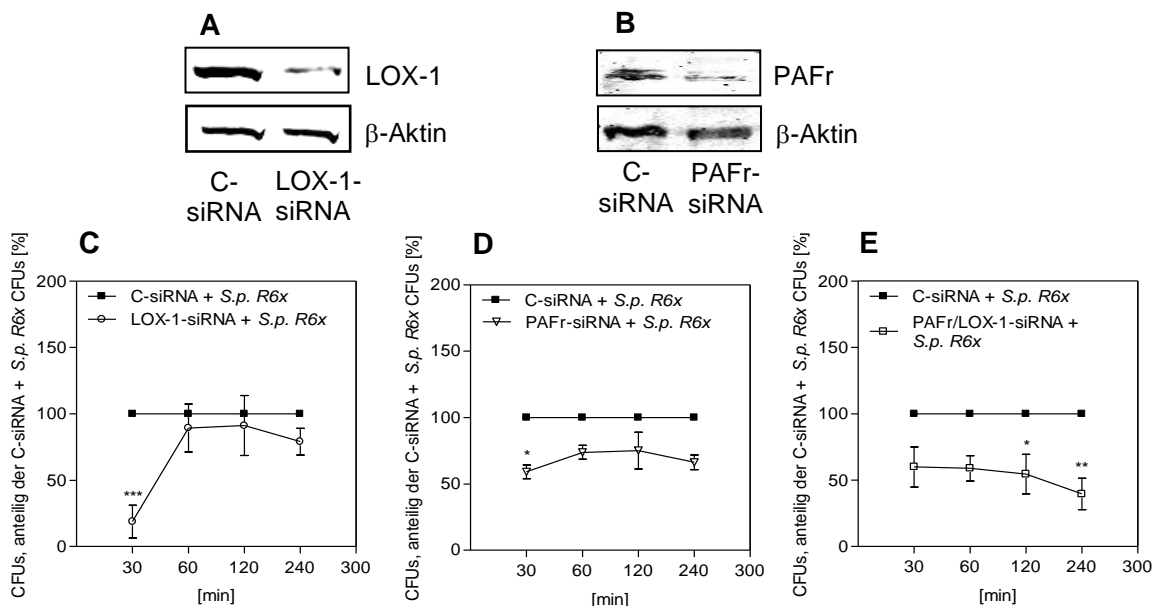


Abbildung 5-3: BEAS-2B-Zellen binden nach LOX-1 Knockdown weniger *S.p. R6x*

BEAS-2B-Zellen wurden mit spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA (C-siRNA) für 72 Stunden versetzt. Der Nachweis der transienten Transfektion erfolgte mittels Western blot (A, B). Die Beladungskontrolle wurde sowohl für LOX-1-siRNA (A) als auch für PAFr-siRNA (B) durch das konstant exprimierte β -Aktin gewährleistet. Die BEAS-2B-Zellen wurden über 30, 60, 120 oder 240 Minuten mit 1×10^7 Koloniebildenden Einheiten (CFU)/ml *Streptococcus pneumoniae* R6x (*S.p. R6x*) infiziert, anschließend gewaschen und lysiert. Das Lysat wurde auf Blutagarplatten aufgetragen, welche über Nacht bei 37°C inkubiert wurden. Identifizierbare CFUs von *S.p. R6x* wurden gezählt und zu den Zahlen der Kontrollgruppe (100%) ins Verhältnis gesetzt. Die Graphen C bis E beschreiben das Verhältnis der Koloniebildende Einheiten der mit siRNA versetzten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe, wobei in C LOX-1-siRNA, in D PAFr-siRNA und in E LOX-1-siRNA sowie PAFr-siRNA eingesetzt wurden.

Kontrollzellen. Im weiteren zeitlichen Verlauf der Pneumokokkeninfektion gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit LOX-1-siRNA behandelten Zellen und Kontrollzellen (s. Abbildung 5-3 C).

Ähnliche Ergebnisse zeigte der Knockdown des PAF-Rezeptors. Auch hier konnte nach 30 Minuten eine signifikant ($p < 0,05$) verminderte Adhäsion von *S. pneumoniae* R6x an den mit PAFr-siRNA versetzten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf erfolgte eine Annäherung beider Adhäsionskurven (s. Abbildung 5-3 D). Der kombinierte Einsatz beider spezifischen siRNAs zeigte eine signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) verminderte Adhäsion bei 120 bzw. 240 Minuten (s. Abbildung 5-3 E).

5.3.2 LOX-1 überexprimierende BEAS-2B-Zellen binden mehr *S. pneumoniae*

5.3.2.1 Adhäsionsassay

Um die in Abbildung 5-3 beobachteten Ergebnisse zu verifizieren, wurde das bakterielle Adhäsionsverhalten zusätzlich bei einer Überexpression von LOX-1 untersucht. Die BEAS-2B-Zellen wurden hierzu mit einem LOX-1 Plasmid transfiziert. Die Erfolgskontrolle erfolgte im Western blot Verfahren (s. Abbildung 5-4 A). Anschließend wurde die Adhäsion von *S. pneumoniae* an den Zellen mit LOX-1 Überexpression bzw. an Kontrollzellen untersucht.

Dabei zeigte sich bei 240 Minuten mit einem $p < 0,01$ ein signifikanter Anstieg der Adhäsion von *S. pneumoniae* an BEAS-2B-Zellen nach Überexpression von LOX-1 (s. Abbildung 5-4 B).

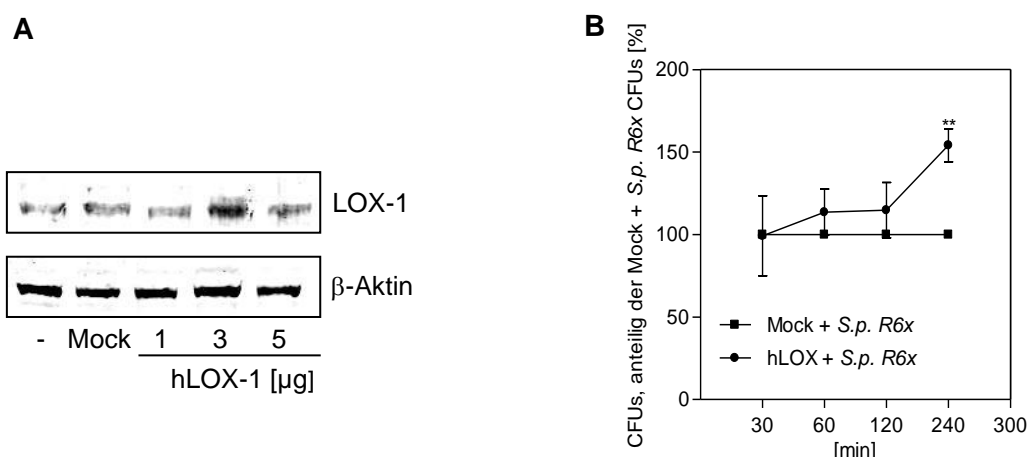


Abbildung 5-4: Nach transienter Transfektion von LOX-1 Plasmiden binden BEAS-2B-Zellen vermehrt *S. pneumoniae* R6x

Der Nachweis der transienten Transfektion erfolgte mit Hilfe des Western blot Verfahrens unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von LOX-1 Plasmid. Zur Kontrolle gleichmäßiger Beladung wurde konstant exprimiertes β -Aktin detektiert (A). BEAS-2B-Zellen wurden über 24 Stunden mit 3 μ g LOX-1 Plasmid versetzt und anschließend mit *S. pneumoniae* R6x (*S.p. R6x*) infiziert. Jeweils nach 30, 60, 120 und 240 Minuten wurden die Zellen gewaschen, lysiert und auf Blutagarplatten aufgetragen, welche über Nacht inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Zählung der Kolonie-bildenden Einheiten (CFUs) von *S.p. R6x* als Korrelat der ursprünglich an BEAS-2B-Zellen gebundenen oder endozytierten Pneumokokken. Die Anzahl der gezählten CFUs nach transienter Transfektion von LOX-1 Plasmid sind im Graphen prozentual zu der Anzahl der CFUs der Kontrollgruppe aufgetragen (B).

5.3.2.2 Konfokalmikroskopie

Um ein optisches Korrelat der oben aufgeführten Ergebnisse zu erhalten wurden diese mittels Konfokalmikroskopie erneut geprüft. Nach erfolgreicher Transfektion von LOX-1 Plasmid und Ende der vierstündigen Infektion mit *S. pneumoniae* wurden die BEAS-2B-Zellen gewaschen und anschließend für die Immunfluoreszenzmikroskopie weiterbehandelt. Mit Hilfe eines speziellen Antikörpers gegen *S. pneumoniae* konnten die Pneumokokken auf der Zelloberfläche visualisiert und gezählt werden.

An BEAS-2B-Zellen mit gesteigerter LOX-1 Expression adhärten im Mittel 57% mehr Pneumokokken an der Zelloberfläche als an Kontrollzellen.

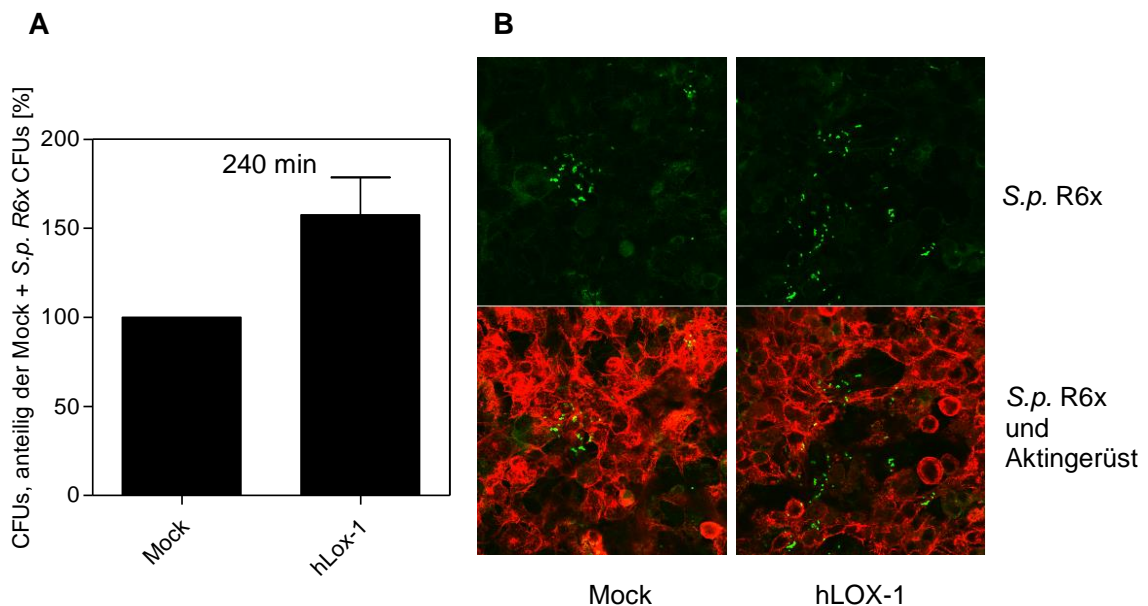


Abbildung 5-5: Mit LOX-1 Plasmid transfizierte BEAS-2B-Zellen binden vermehrt S.p. R6x

BEAS-2B-Zellen wurden mittels transients Transfektion eines LOX-1 Plasmids auf eine vermehrte Expression desselben programmiert (hLOX-1). Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit 1×10^7 CFU/ml *S.pneumoniae* R6x (*S.p. R6x*) und nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen gewaschen, fixiert sowie mit Antikörpern versetzt um anschließend unter dem Konfokalmikroskop auf den Besatz an *S.p. R6x* überprüft zu werden. A beschreibt das prozentuale Verhältnis der gebundenen Kokken der hLOX-1 Gruppe zur unbehandelten Kontrollgruppe. Repräsentative Bilder sind unter B aufgeführt.

Zusammenfassend zeigen die Knockdown- und Überexpressionsversuche von LOX-1 an BEAS-2B-Zellen, dass LOX-1 als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* fungiert.

5.4 Poly I:C und Resiquimod haben keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion von *S. pneumoniae* an BEAS-2B-Zellen

Nachdem jeweils isoliert gezeigt werden konnte, dass 1) TLR3 und TLR7 Agonisten die LOX-1 Expression verstärken (Abbildung 5-2) und 2), LOX-1 ein Adhäsionsrezeptor für *Streptococcus pneumoniae* R6x an BEAS-2B-Zellen darstellt (Abbildung 5-3 bis 5-5), sollte nachfolgend direkt geprüft werden, ob es nach Aktivierung von TLR3 und TLR7 zu einer verstärkten Adhäsion von *S. pneumoniae* an humanen Bronchialepithelzellen kommt.

Dazu wurden bronchiale Epithelzellen mit den TLR3 bzw. TLR7 Agonisten Poly I:C und Resiquimod vorstimuliert. Anschließend erfolgte die Infektion dieser Zellen mit *S. pneumoniae* und die Quantifizierung der resultierenden koloniebildenden Einheiten (CFUs) im Adhäsionsassay.

Es zeigte sich, dass die Adhäsion von *S. pneumoniae* an BEAS-2B-Zellen durch eine vierstündige Vorinkubation mit dem TLR3 Agonisten Poly I:C nicht signifikant gesteigert werden konnte (Abbildung 5-6 A).

Im analogen Versuch mit dem TLR7 Agonisten Resiquimod konnte ebenfalls ein Trend zu vermehrter Adhäsion ohne Nachweis von Signifikanz gemessen werden (Abbildung 5-6 B).

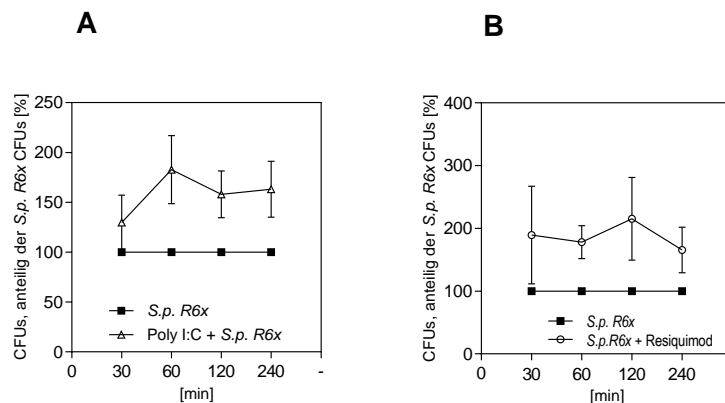


Abbildung 5-6: Einfluss von Toll-like Rezeptor 3 und 7 Agonisten auf die Adhäsion von *S.p. R6x* an BEAS-2B-Zellen

BEAS-2B-Zellen wurden vier Stunden mit den TLR Agonisten Poly I:C, 100 µg/ml (A), oder Resiquimod, 10 µg/ml (B), versetzt, anschließend mit 1×10^7 CFU/ml *Streptococcus pneumoniae* R6x (*S.p. R6x*) infiziert und nach 30, 60, 120 oder 240 Minuten gewaschen und lysiert. Ein Teil des Lysats wurde auf eine Blutagarplatte aufgetragen. Nach Inkubation über Nacht wurden die Platten auf die Anzahl *S.p. R6x* Kolonie-bildender Einheiten (CFUs) untersucht und zur Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten, mit *S.p. R6x* infizierten BEAS-2B-Zellen und wurde als Referenz (100%) herangezogen.

5.5 Die IL-8 Regulation bei Infektion mit *S. pneumoniae* ist abhängig von LOX-1

Der platelet-activating factor receptor wurde als erster Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* beschrieben. Obwohl *S. pneumoniae* diesen G-Protein gekoppelten Rezeptor zur Adhäsion und Translokation nutzt, wird dabei keine PAFr-vermittelte Signaltransduktion in Gang gesetzt (Cabellos et al., 1992, Cundell et al., 1995, Fillon et al., 2006).

LOX-1 hingegen ist ein Transmembranrezeptor und vermittelt über verschiedene Signalkaskaden die Aktivierung von NF- κ B und folglich u.a. die Sekretion inflammatorischer Zytokine (Dunn et al., 2008). Ob LOX-1 an bronchialem Epithel neben seiner Funktion als Adhäsionsrezeptor auch die Inflamationsvermittlung einer *S. pneumoniae* Infektion beeinflusst, sollte anhand eines IL-8 Assays mit BEAS-2B-Zellen nach LOX-1 Knockdown untersucht werden.

Dazu wurden bronchiale Epithelzellen mit spezifischer LOX-1-siRNA transfiziert und nach Infektion mit *S. pneumoniae* die IL-8 Konzentrationen der Überstände mittels ELISA analysiert. Die Konzentrationen an Interleukin zeigten sich hierbei von der LOX-1 Expression abhängig: Mit LOX-1-siRNA versetzte Zellen hatten nach Pneumokokkeninfektion statistisch hochsignifikant weniger IL-8 sezerniert als die Kontrollzellen (Abbildung 5-7; $p < 0,001$).

Im Gegensatz zum PAF-Rezeptor dient LOX-1 nicht nur als Adhäsionsrezeptor, sondern beeinflusst zusätzlich die inflammatorische Reaktion bronchialer Epithelzellen auf eine *S. pneumoniae* Infektion.

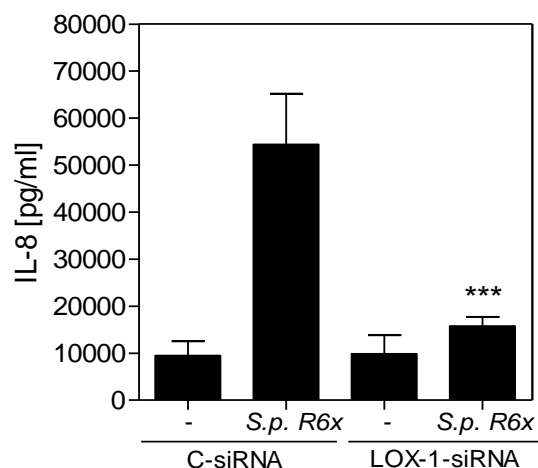


Abbildung 5-7: LOX-1 ist an der Inflamationsvermittlung beteiligt

BEAS-2B-Zellen wurden über 72 Stunden entweder mit Kontroll-siRNA (C-siRNA) oder mit spezifischer LOX-1-siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte eine vierstündige Infektion der Zellen mit 1×10^7 CFU/ml *S. pneumoniae* R6x (*S.p.* R6x). Mittels ELISA wurde die IL-8 Antwort der Überstände gemessen. Die mit (-) markierten Säulen bezeichnen die mit jeweiliger siRNA behandelten, nicht infizierten Leerwerte.

5.6 LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch *ex vivo* Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert

Für LOX-1 sind an Rinderendothelzellen (BAEC) sowie ECV-304 verschiedene Faktoren als Induktoren beschrieben worden, darunter TNF α , Scherkräfte sowie das Herpes-simplex-Virus 1 (Kume et al., 1998, Murase et al., 1998, Chirathaworn et al., 2004). Über die Auswirkungen echter viraler Infektionen auf die Expression von LOX-1 in humanem Lungengewebe gibt es bislang jedoch keine Erkenntnisse.

Daher sollte zunächst untersucht werden, ob eine Influenzainfektion humanen Lungengewebes einen Einfluss auf die Expression von LOX-1 ausübt. Zum Vergleich wurde die Expression des PAF-Rezeptors (PAFr) nach einer Infektion herangezogen.

Hierzu wurde humanes Lungengewebe durch Biopsien gewonnen und mit einem Influenza A/Panamá H3N2 Stamm infiziert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung und Lyse der humanen Proben. Mit Hilfe spezieller Antikörper wurden LOX-1- sowie PAFr- Protein im Western blot detektiert. Dabei zeigte sich, dass die Infektion der humanen Lungengewebeproben mit Influenza zu einem deutlichen Anstieg an LOX-1 Protein führte (Abbildung 5-8 A). Die Influenzainfektion zeigte im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf die Expression des PAF-Rezeptors (Abbildung 5-8 B).

In diesem Versuch konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression von LOX-1 in humanem Lungengewebe durch Infektion mit einem Influenzavirus induziert werden kann.

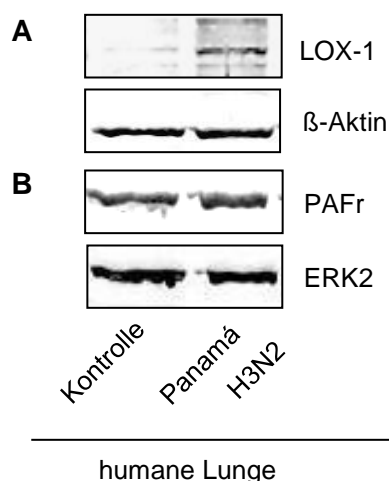


Abbildung 5-8: LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch *ex vivo* Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert

Humane Lungenbioptate von im Mittel 110mg Gewicht wurden mit einem Influenza A/Panamá/2007/1999 (H3N2) Stamm über eine Stunde infiziert (8×10^5 Plaque Forming Units pro ml) und 24h inkubiert, anschließend mittels FastPrep Verfahren lysiert und im Western blot mit spezifischen Antikörpern auf die Expression von LOX-1 (A) bzw. PAFr (B) untersucht. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch die konstant exprimierten Proteine β -Aktin (A) bzw. Extracellular-signal Regulated Kinase 2 (ERK2, B) kontrolliert. Die unstimulierte Kontrolle wurde nur mit RPMI Kulturmedium versehen.

Zusammenfassend konnte für humane bronchiale Epithelzellen gezeigt werden, dass LOX-1 an BEAS-2B-Zellen exprimiert und die Expression dieses Transmembranrezeptors durch die Aktivierung der Toll-like Rezeptoren 3 und 7 gesteigert wird. LOX-1 wirkt zudem als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae*. Nach Aktivierung von TLR3 bzw. TLR7 konnte hingegen keine vermehrte Adhäsion an BEAS-2B-Zellen gemessen werden. Interessanterweise besitzt LOX-1 als Stimulator der IL-8 Sekretion gegenüber einer *S. pneumoniae* Infektion zudem immunmodulatorische Kapazität. Abschließend zeigte die Infektion von humanen Lungenbiopsaten einen Anstieg des LOX-1 Signals.

6 DISKUSSION

Die postvirale Pneumokokkenpneumonie ist eine häufige Komplikation respiratorischer Virusinfektionen und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher. Obwohl verschiedene Hypothesen zum Synergismus von viraler Infektion und konsekutiver Superinfektion mit *S. pneumoniae* aufgestellt wurden, konnte bislang kein Rezeptor eindeutig identifiziert werden, der Pneumokokken die Adhäsion und Invasion des Wirtes nach einer viralen Infektion erleichtert (McCullers, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten an humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) wichtige Erkenntnisse gesammelt werden, die den lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) als weiteren Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* in den Fokus rücken. Die Expression von LOX-1 konnte durch Stimulation mit synthetischen Agonisten der Toll-like Rezeptoren (TLR) 3 und 7 gesteigert werden. Überraschenderweise führte diese Stimulation jedoch nicht zu einer vermehrten Adhäsion der Pneumokokken. Im Gegensatz zum eingangs dargestellten platelet-activating factor receptor (PAFr) hat LOX-1 aufgrund seines Einflusses auf die Sekretion von IL-8 zudem eine immunmodulatorische Funktion. Abschließend konnte gezeigt werden, dass die Expression von LOX-1 in humanem Lungengewebe durch eine *ex vivo* Infektion mit einem Influenza A Virus ansteigt.

6.1 BEAS-2B-Zellen exprimieren LOX-1

In einem initialen Experiment konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die als Modell dienenden BEAS-2B-Zellen tatsächlich LOX-1 exprimieren und die Expression nach Infektion mit *S. pneumoniae* R6x ansteigt. Dieses Ergebnis wird gestützt von der Arbeit von (Dieudonne et al., 2012), in welcher der Nachweis von LOX-1 auf immortalisierten (16 HBE) und primären (HBEC) bronchialen Epithelzellen sowie auf BEAS-2B-Zellen ebenfalls gelang.

Eine mögliche Erklärung für die im Zeitreihen-Infektionsversuch beobachtete Induktion der LOX-1 Expression nach 120 und 240 Minuten Inkubation mit *S. pneumoniae* R6x liegt in der Freisetzung von TNF- α . Bereits in mehreren Veröffentlichungen wurde eine Zunahme der LOX-1 Expression durch TNF- α beschrieben (s. Kapitel 3.4.2.2). *S. pneumoniae* wird über TLR2 (Lipoproteine) und TLR4 (Pneumolysin) erkannt, darüber hinaus kann *S. pneumoniae* DNA mit CpG Motiv von endosomalen TLR9 detektiert werden. Die Signalwege aller drei TLRs führen über das Adapterprotein MyD88 zur Aktivierung von NF- κ B und Freisetzung von TNF α (Koppe et al., 2011). Dass dies nicht nur beim Wildtypen sondern auch beim hier verwendeten Pneumokokkenstamm *S. pneumoniae* R6x der Fall ist, wurde ebenfalls bereits gezeigt (Koppe et al., 2011). Die gesteigerte Expression von LOX-1 könnte also durch eine *S. pneumoniae* vermittelte TNF α Freisetzung erfolgen.

6.2 Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit Toll-like Rezeptor Agonisten 3 und 7 steigert die Expression von LOX-1

Der Idee von LOX-1 als Adhäsionsrezeptor folgend, welcher nach viraler Infektion hochreguliert werden müsste, wurden als nächstes die Auswirkungen von TLR3 und TLR7 Agonisten auf die LOX-1 Expression untersucht. Aus Abbildung 5-2 dieser Arbeit ist nun ersichtlich, dass die LOX-1 Expression auf BEAS-2B-Zellen durch eine vierstündige Stimulation mit 100µg/ml Poly I:C und 1 bzw. 10µg/ml Resiquimod gesteigert wird.

Bislang ist nur wenig über die Auswirkung viraler Infektionen bzw. von TLR3 oder TLR7 Agonisten auf die Expression von LOX-1 bekannt. Die wenigen Studien stützen das beschriebene Ergebnis jedoch. So konnte an einer endothelialen Zelllinie (vgl. Tabelle 3-4) durch eine Herpes simplex Virus 1 Infektion bereits nach 120 Minuten eine Induktion von LOX-1 mRNA beobachtet werden (Chirathaworn et al., 2004). Des Weiteren wurde an bronchialen Epithelzellen keine nennenswerte Steigerung der LOX-1 Expression nach Stimulation mit Poly I:C in einer Konzentration von 10 µg/ml beobachtet (Dieudonne et al., 2012). Dies entspricht den Resultaten in der vorliegenden Arbeit. Ein messbarer Effekt trat erst bei 100µg/ml Poly I:C auf (Abbildung 5-2).

Poly I:C führt als Agonist von TLR3 an bronchialen Epithelzellen über die Aktivierung von NF-κB und IRF3 u.a. zu einer erhöhten Sekretion von IL-6 und IL-8 (Ritter et al., 2005). In mehreren Studien reichte die Stimulation von bronchialen Epithelzellen mit niedrigen Konzentrationen an Poly I:C bereits aus, um ein signifikant erhöhtes Inflammationssignal messen zu können (s. Tabelle 6-1). Zur Induktion von LOX-1 via TLR3 ist also eine wesentlich stärkere Ligandenkonzentration erforderlich als zur Vermittlung eines inflammatorischen Effektes. Zu beachten ist ebenfalls, dass synthetisches Poly I:C einen stärkeren Aktivator von TLR3 darstellt als virale dsRNA (Lai et al., 2011). Daher sollte zur Bestätigung der Ergebnisse der Versuch mit Viren bzw. einem *in vivo* Setting wiederholt werden.

Tabelle 6-1: Poly I:C Stimulation mit konsekutiv signifikant erhöhtem Inflammationssignal

Poly I:C Konzentration	Zelltyp	Interleukin ↑	Referenz
0,5µg/ml	BEAS-2B	IL-6	(Lai et al., 2011)
1,0 µg/ml	BEAS-2B	IL-8	(Koarai et al., 2010)
10 µg/ml	SAEC	IL-8	(Ritter et al., 2005)

Die Auswirkungen einer Virusinfektion auf die LOX-1 Expression *in vivo* ist bislang nicht adressiert worden. Werden Mäuse intraperitoneal jedoch mit LPS inkubiert, ist bereits nach 30 Minuten ein deutlich gesteigertes LOX-1 Signal in der Mäuselunge messbar (Zhang et al., 2009). Die mit der Erkennung von LPS verbundene Aktivierung von TLR4 mündet dabei in der Induktion von NF-κB (Medzhitov and Janeway, 2000). Eine Infektion von BEAS-2B-Zellen mit einem Influenza A Virus führt TLR3-abhängig ebenfalls über die Aktivierung von NF-κB zur

Sekretion inflammatorischer Zytokine (Le Goffic et al., 2007). Daher besteht die Möglichkeit, dass verschiedene TLRs über verwandte Signalwege in der Lage sind, LOX-1 zu induzieren. Dafür spricht zudem, dass in einem weiteren *in vivo* Modell neben TLR4 auch die Aktivierung von TLR2 auf Neutrophilen mit der LOX-1 Expression in Verbindung gebracht wurde (Wu et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass auch die virale dsRNA sowie ssRNA erkennenden Toll-like Rezeptoren 3 und 7 nach Aktivierung zu einer Induktion von LOX-1 auf BEAS-2B-Zellen führen.

6.3 LOX-1 dient *S. pneumoniae* R6x an BEAS-2B-Zellen als Adhäsionsrezeptor

Die Adhäsion von *S. pneumoniae* an die Wirtszellen ist eine entscheidende Voraussetzung bei der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie (van der Poll and Opal, 2009). Mit PAFr wurde bereits ein Rezeptor identifiziert, der *S. pneumoniae* bindet, dessen Rolle bei der Pathogenese postviraler Pneumokokkenpneumonien sich jedoch widersprüchlich darstellt (vgl. Kapitel 3.5.3). In der vorliegenden Arbeit konnte LOX-1 als weiterer Adhäsionsrezeptor bestimmt werden.

6.3.1 Knockdown mittels siRNA

Nach Knockdown von LOX-1 wurde nach 30 Minuten eine verminderte Adhäsion von *S. pneumoniae* an BEAS-2B-Zellen nachgewiesen.

Der mittels Western blot aufgezeigte Effekt der transienten Transfektion (Abbildung 5-4 A) macht deutlich, dass durch den Knockdown keine vollständige Abschaltung des LOX-1 Gens erreicht wurde. Kishimoto und Kollegen konnten jedoch zeigen, dass bereits eine durch siRNA erreichte Reduktion von LOX-1 mRNA um 13% ausreicht, um LOX-1 spezifische Effekte um circa 70% zu senken (Kishimoto et al., 2010).

Während in Abbildung 5-3 C (LOX-1) und D (PAFr) nach 30 Minuten Infektionszeit mit *S. pneumoniae* ein signifikanter Unterschied in der Adhäsion nachgewiesen wurde, stellt sich das Verhältnis adhärierter Pneumokokken an den anderen Messpunkten nicht signifikant dar. Die Möglichkeit einer nachlassenden siRNA-Funktion ist jedoch unwahrscheinlich, da die Zeitspanne, in welcher der siRNA Knockdown seine Wirkung ausübt, das Drei- bis Fünffache der durchschnittlichen Zellverdoppelungszeit beträgt (McManus and Sharp, 2002). BEAS-2B-Zellen teilen sich unter optimalen Bedingungen etwa alle drei Tage. Daher ist der siRNA-Effekt auch bei 60, 120 und 240 Minuten als wirksam zu betrachten (Reddel et al., 1988).

Eine mögliche Erklärung könnte hingegen die bekannte Induktion von PAFr durch *S. pneumoniae* sein (Radin et al., 2005, Seki et al., 2009). Mit zunehmender Infektionszeit stünden

mehr PAFr Rezeptoren zur Verfügung um Pneumokokken zu binden und so den Einfluss des ausgeschalteten LOX-1 zu reduzieren.

Bemerkenswert ist, dass die in diesem Versuch angestellten Beobachtungen durch *in vivo* Versuche prinzipiell bestärkt werden. In einem Sepsismodell wiesen LOX-1-defiziente Mäuse 24 Stunden nach Sepsisinduktion signifikant weniger bakterielle Kolonie-bildende Einheiten in ihren Lungen auf als LOX-1 kompetente Wildtypmäuse (Wu et al., 2011). Es erfolgte jedoch keine Identifikation der Bakterien welche den Kolonie-bildenden Einheiten zugrunde lagen.

Obwohl unklar bleibt, warum die signifikanten Adhäsionsunterschiede in Abbildung 5-3 C-E zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftraten, weist die Zusammenschau der Ergebnisse auf eine Adhäsionsfunktion von LOX-1 hin.

6.3.2 Überexpression mittels LOX-1 Plasmid

Diese Beobachtung unterstützend zeigte sich nach Überexpression von LOX-1 im Adhäsionsassay bei 240 Minuten eine signifikant erhöhte Adhäsion von *S. pneumoniae* gegenüber den Kontrollzellen. In der Konfokalmikroskopie konnte bei 240 Minuten optisch ebenfalls ein deutlicher Trend zu vermehrter Adhäsion bei LOX-1 überexprimierenden Zellen beobachtet werden.

Dass LOX-1 grundsätzlich in der Lage ist, Bakterien zu binden, konnte erstmals 2001 gezeigt werden (Shimaoka et al., 2001). Chinese hamster ovary-K1 (CHO-K1) Zellen, die LOX-1 konstant exprimierten, banden u.a. vermehrt *S. aureus*. Es folgte der Nachweis, dass ein Membranprotein von *Klebsiella pneumoniae* an LOX-1 bindet und schließlich wurde *Chlamydia pneumoniae* als Ligand identifiziert (Jeannin et al., 2005, Campbell et al., 2012).

In dieser Arbeit wurde nun erstmals gezeigt, dass *S. pneumoniae* von LOX-1 gebunden wird. In Kombination mit der Erkenntnis, dass LOX-1 an bronchialen Epithelzellen durch Aktivierung von TLR3 und TLR7 induziert wird, sind entscheidende Voraussetzungen für die Bestätigung der Arbeitshypothese erfüllt. Als Rezeptor für *S. pneumoniae*, welcher nach viraler Infektion vermehrt exprimiert wird, ermöglicht LOX-1 Pneumokokken eine leichtere Adhäsion und Invasion. Mit LOX-1 existiert nun eine Struktur, die die Diskussion nach den Ursachen der Suszeptibilität pulmonalen Gewebes gegenüber *S. pneumoniae* nach viraler Infektion um einen neuen Erklärungsansatz erweitert.

6.4 Poly I:C und Resiquimod haben keinen signifikanten Effekt auf die Adhäsion von *S. pneumoniae* an BEAS-2B-Zellen

In einem nächsten Schritt wurden die bislang gemachten Beobachtungen kombiniert: Mit TLR3 und TLR7 Agonisten stimulierte BEAS-2B-Zellen zeigten jedoch nur eine Tendenz zu

vermehrter Adhäsion von Pneumokokken. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe konnte keine statistische Signifikanz gezeigt werden.

Als mögliche Erklärung können systemische, biologische und statistische Faktoren erwogen werden. Zum einen beinhaltet der aus vielen manuellen Zwischenschritten bestehende Versuchsablauf (vgl. u.a. 4.2.2.2 und 4.2.2.3) trotz der angestrebten Präzision eine gewisse Anfälligkeit für Fehler, beispielsweise bei der Handhabung sehr kleiner Pipettierolumina. Zum anderen ist prinzipiell beim Umgang mit biologischem Material wie z.B. der BEAS-2B Zelllinie oder des Pneumokokkenstammes *R6x* eine Variabilität der biologischen Eigenschaften nicht auszuschließen. Die Abbildung 5-6 zugrunde liegende Versuchsanzahl ist mit $n=5$ vergleichsweise gering. Entsprechend führen ggf. abweichende Messwerte zu hohen Standardabweichungen bzw. Standardfehlern und schwächen die statistische Aussagekraft der Versuchsreihe. Diesbezüglich ist eine hohe Anzahl an durchgeführten Versuchen wünschenswert.

Unabhängig davon bestätigen Tierversuche, dass TLR3 und TLR7 einen teils entscheidenden Einfluss auf die bakterielle Ausbreitung in der Lunge nach viraler Infektion haben. Im Mausmodell verglichen Tian et al. (2012) die Anzahl von *S. pneumoniae* Kolonie-bildenden Einheiten in der Lunge von Tieren, die entweder intranasal 50 µg Poly I:C oder lediglich sterile NaCl-Lösung erhalten hatten und anschließend intratracheal mit Pneumokokken infiziert worden waren. Die Poly I:C Gruppe zeigte signifikant erhöhte pulmonale Bakterienzahlen. Bei identischem Versuchsaufbau wurde auch im Falle von *S. aureus* in der Poly I:C Gruppe eine erhöhte bakterielle Belastung der Lungen nachgewiesen. Dass LOX-1 *S. aureus* ebenfalls bindet, wurde einleitend bereits erwähnt (Shimaoka et al., 2001).

Im Falle von TLR7 Agonisten konnten (Stegemann-Koniszewski et al., 2013) zeigen, dass TLR7 Knockoutmäuse nach kombinierter Infektion mit Influenza A und *S. pneumoniae* im Vergleich zu Wildtypmäusen eine 55fach verminderte Bakterienzahl in den Lungen aufwiesen, ohne dabei jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

In den zitierten Tierversuchsstudien konnte das schlechtere Abschneiden von Wildtypmäusen gegenüber TLR3- oder TLR7-defizienten Tieren zum Teil durch eine Interferonabhängige Inhibition der bakteriellen Abwehr erklärt werden (vgl. Kapitel 3.5.2). Eine eventuelle Rolle von LOX-1 wurde in den zitierten Studien nicht überprüft. Interessant ist, dass dendritische Zellen eine vermehrte LOX-1 Expression nach Stimulation mit IFN- α aufweisen (Parlato et al., 2010). Daher könnten erhöhte Interferonlevel nach Aktivierung viraler PRRs zur Induktion von LOX-1 beitragen.

6.5 Die IL-8 Regulation bei Infektion von BEAS-2B-Zellen mit *S. pneumoniae* ist abhängig von LOX-1

In Abbildung 5-7 konnte aufgezeigt werden, dass die Freisetzung von IL-8 aus BEAS-2B-Zellen nach einer *S. pneumoniae* Infektion von LOX-1 abhängt. Mit LOX-1-siRNA behandelte Zellen sezernierten nach Infektion hochsignifikant weniger IL-8 als Kontrollzellen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten betonen das immunmodulatorische Potential von LOX-1.

Interleukin 8 ist entscheidend für die Einwanderung von Neutrophilen in entzündetes Gewebe und die von ihnen ausgeübte Pathogenabwehr (Mukaida, 2003). Neben protektiven Effekten wird IL-8 allerdings auch als ein Trigger sekundärer pulmonaler Pathologien wie des ARDS angesehen, für das speziell Patienten mit postviraler Pneumokokkenpneumonien ein erhöhtes Risiko tragen (Viasus et al., 2011). Dieses Krankheitsbild mit einer Letalität von über 50% zeichnet sich u.a. durch eine überbordende Migration von Neutrophilen in die Lunge und konsekutiver Schädigung des pulmonalen Parenchyms aus. IL-8 wird als Chemokin der Neutrophilen bei der Pathogenese eine entscheidende Rolle zugeschrieben. So korrelieren zum einen bei Patienten mit pulmonaler Schädigung hohe IL-8 Konzentrationen in der BAL mit dem Risiko, ein ARDS tatsächlich zu entwickeln. Zum anderen sind die IL-8 Levels in den BALs von ARDS-Erkrankten signifikant erhöht (Donnelly et al., 1993, Mukaida, 2003, Aggarwal et al., 2000).

Die Rolle von LOX-1 als Rezeptor mit immunmodulatorischem Potential wird von (Dieudonne et al., 2012) gestützt. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass BEAS-2B-Zellen nach Behandlung mit LOX-1-siRNA und Stimulation mit Poly I:C u.a. deutlich weniger IL-8 freisetzen als lediglich mit Kontroll-siRNA behandelte Zellen.

Bezüglich *in vivo* Daten liegen bislang erst 2 Publikationen vor, welche sich mit LOX-1 und Pneumonie auseinandergesetzt haben, und weisen hierzu bislang Widersprüche auf (vgl. Tabelle 6-2). Zwar konnte in einer Studie durch einen LOX-1 Antikörper die Menge an Neutrophilen in der Mäuselunge nach Endotoxininfektion signifikant gesenkt werden (Zhang et al., 2009). LOX-1-defiziente Tiere zeigen in einem anderen Experiment jedoch nach Sepsisinduktion eine vermehrte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten verglichen mit den Kontrolltieren (Wu et al., 2011).

Unabhängig von der neutrophilen Migration in das pulmonale Gewebe fällt auf, dass Tiere mit LOX-1 Antikörper bzw. LOX-1 Defizienz geringere Konzentrationen an Inflammationsmarkern aufweisen. So hat eine LOX-1 Antikörpergabe ein niedrigeres pulmonales Signal an NF- κ B und eine niedrigere Aktivierung apoptotischer Signalproteine wie Caspase-3 zur Folge (Zhang et al., 2009). LOX-1 defiziente Mäuse fallen durch verminderte IL-6- und TNF α -Konzentrationen sowie eine erhöhten Überlebensrate auf (Wu et al., 2011).

Tabelle 6-2: Übersicht relevanter LOX-1 *in vivo* Studien

Studie	Zhang et al., 2009	Wu et al., 2011
Tiere	Maus	Maus
Inflamationsreiz	LPS, intraperitoneal	LPS, zäkale Ligatur und Punktion
LOX-1 Inhibition	Antikörper	LOX-1 Knockout Mäuse
Pulmonale bakterielle CFUs*	k.A.	↓
Pulmonale LOX-1 Induktion*	↓	k.A.
Zahl pulmonaler Neutrophilen*	↓	↑
Pulmonale Zytokinlevel*	↓	↓
Überlebensrate*	k.A.	↑

* im Vergleich zur Kontrollgruppe, ** in der Kontrollgruppe, k.A. keine Angabe

Um die Rolle von LOX-1 in der postviralen Pneumokokkenpneumonie weiter aufzuklären, sind *in vivo* Versuche mit pulmonaler Bestimmung von u.a. IL-8 Konzentration und Zahl der Neutrophilen in LOX-1 defizienten Tieren und Wildtypen nach postviraler Pneumokokkeninfektion wünschenswert.

Mit dem platelet-activating factor receptor (PAFr) ist bereits ein Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* beschrieben worden. Eine Besonderheit ist dabei, dass Ligandenbindung nicht zur Aktivierung der rezeptoreigenen Signaltransduktion über die Phospholipase C führt (Cundell et al., 1995). PAFr-defiziente Mäuselungen weisen nach *S. pneumoniae* Infektion zwar weniger Pneumokokken CFUs auf als die Lungen des Wildtyps. Die Anzahl an neutrophilen Granulozyten in der BAL und das Niveau verschiedener Zytokine aus Lungenhomogenisaten 42 Stunden nach Infektion verhalten sich bei PAFr-defizienten Mäusen gegenüber Wildtypmäusen jedoch identisch (Rijneveld et al., 2004). Dies stellt einen entscheidenden Unterschied zwischen den Adhäsionsrezeptoren LOX-1 und PAFr dar.

LOX-1 wirkt entsprechend über seine Rolle als Adhäsionsrezeptor für *S. pneumoniae* hinaus auch immunmodulatorisch über eine vermehrte Bereitstellung von IL-8 und unterscheidet sich darin elementar im Vergleich zu PAFr. Dies macht LOX-1 als Ziel therapeutischer Optionen interessant. Durch Blockade von LOX-1 bestünde die Option, das Risiko sekundär-bakterieller Infektionen zu mindern und/oder eine überbordende Immunreaktion mit entsprechendem Gewebeschaden der Lunge zu minimieren.

6.6 LOX-1 wird auf humanem Lungengewebe durch *ex vivo* Infektion mit einem Influenza A Virus vermehrt exprimiert

Abbildung 5-8 beschreibt erstmals eine Expressionssteigerung von LOX-1 nach Infektion humaner Lungenbiopate mit Influenza A H3N2 *ex vivo*. Die Datenlage zur Induktion von LOX-1 auf bronchialem Epithel wurde bereits beschrieben (vgl. Tabelle 3-4, Kapitel 5.2, Kapitel 6.2). Die in dieser Arbeit erhaltenen *ex vivo* Daten unterstützen die Ergebnisse der *in vitro* Versuche und weisen darauf hin, dass die erhobenen Daten auf den Menschen übertragbar sein könnten.

Es ist jedoch zu beachten, dass die Zunahme an LOX-1 Protein in Abbildung 5-8 unspezifisch ist und nicht auf einen Zelltypus zurückgeführt werden kann. Um zu unterscheiden, welche Zelltypen der humanen Lungenproben für den Anstieg an LOX-1 Protein verantwortlich sind, bietet sich eine Wiederholung der Infektion humaner Bioplate mit Influenza A und anschließender immunhistochemischer Aufarbeitung zur Detektion von LOX-1 Protein an. Dieses müsste sich an epithelialen Geweben induziert zeigen, um aspirierte *S. pneumoniae* vermehrt zu binden.

In Kapitel 3.1 wurde bereits der Zusammenhang von Influenzainfektionen mit H3N2 bzw. H1N1 und einem erhöhten Risiko einer sekundären bakteriellen Pneumonie beschrieben. Wie aus Abbildung 6-1 ersichtlich, zeigen H3N2 und H1N1 ähnliche Adhäsionsmuster bei der Infektion der humanen Lunge und lagern sich primär an Trachea, Bronchus und Alveoli an. Der aviäre Influenzastamm H5N1 hingegen invadiert primär alveolare und angrenzende bronchiale Zellen, die räumlich unzugänglicher sind und so die Übertragung erschweren (Shinya et al., 2006).

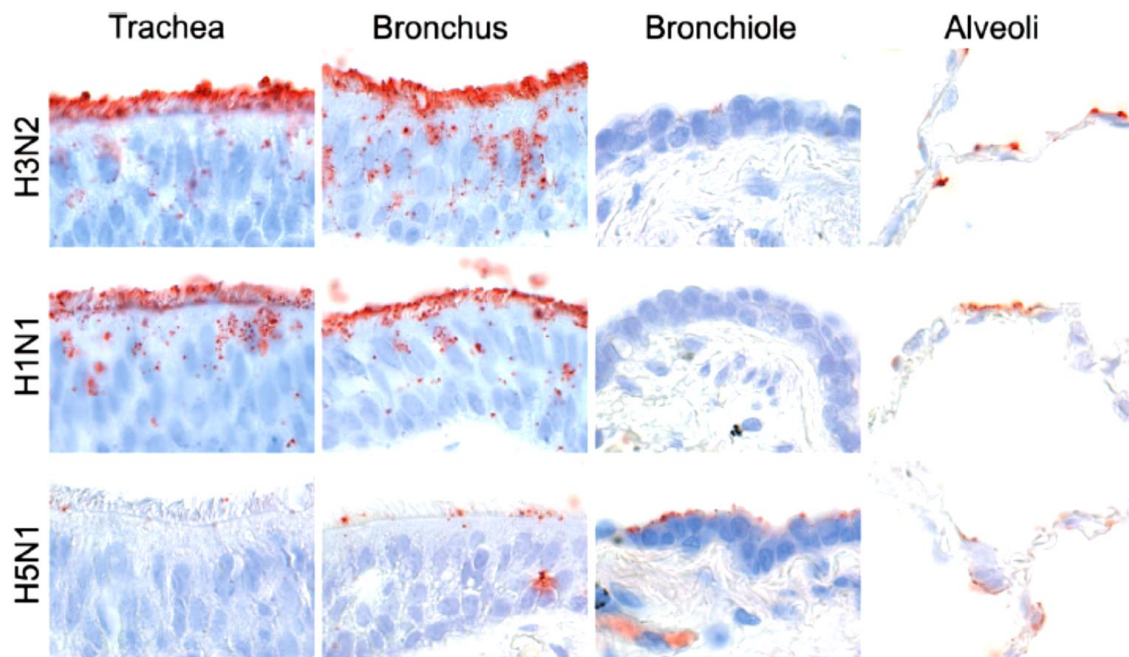


Abbildung 6-1: Anlagerung verschiedener Influenza Stämme (rot) an Trachea, Bronchus, Bronchiole und Alveoli des Menschen.
Aus: (van Riel et al., 2007)

Interessant ist, dass die bisherige – wenn auch spärliche – Datenlage zu H5N1 keine Tendenz zu bakterieller Sekundärinfektion aufzeigt (Beigel et al., 2005, Soepandi et al., 2010). Eine mögliche Erklärung wäre an dieser Stelle eine nach viraler Infektion lokal begrenzte LOX-1 Induktion. Im Falle von H5N1 würde dies bedeuten, dass ein vermehrter Adhäsionsrezeptorbesatz nur in terminalen Bronchien und Alveolen besteht und so die Wahrscheinlichkeit einer *S. pneumoniae* Infektion durch Aspiration gering ist.

Zur Bestätigung der hier beschriebenen Beobachtung sind weitere Versuche mit Fokus auf die LOX-1 Expression nach viraler Infektion nötig.

6.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass LOX-1 als ein potentieller Faktor in der Pathogenese postviraler Pneumokokkenpneumonien angesehen werden kann. Es bedarf jedoch weiterer Forschung, um offene Fragen zu klären.

So ist weiterhin nicht geklärt, welche Schlüsselfaktoren im Zuge eines Inflammationsprozesses aktiviert werden müssen, um die Expression von LOX-1 auf bronchialen Epithelzellen zu steigern. Eine systematische Inhibition TLR-eigener Adapterproteine und Signalmoleküle mit anschließender Analyse ihrer Auswirkung auf die LOX-1 Expression bzw. Adhäsion von *S. pneumoniae* wäre wünschenswert.

Des Weiteren ließe sich durch Anwendung immunhistochemischer Verfahren feststellen, welchen Zelltypen die in Kapitel 5.6 ermittelte Erhöhung der LOX-1 Expression zuzuordnen ist. Dieses *ex vivo* Infektionsmodell könnte mit einer Reihe respiratorischer Viren wiederholt werden um deren individuellen Einfluss auf die Expression von LOX-1 zu ermitteln.

Es sind jedoch insbesondere Infektionsmodelle LOX-1-defizienter Tiere mit respiratorischen Viren und anschließender Instillation von *S. pneumoniae* gefragt, um die Rolle von LOX-1 in der postviralen Pneumokokkenpneumonie genauer zu eruieren. Dabei interessieren besonders bakterielle Besiedlung der Lunge, Zytokinlevel und Neutrophilenzahl aus BAL und Lunge sowie die Überlebensrate der verschiedenen Tierkohorten.

Über welche molekularen Strukturen LOX-1 seine Funktion als Pneumokokkenrezeptor ausübt und welche Rolle Phosphorylcholin dabei spielt ist nicht bekannt. Um dies zu prüfen eignete sich u.a. die Verwendung eines Phosphorylcholin-defizienten Stammes von *S. pneumoniae*. Mit dieser Variante ließen sich Versuch 5.3 oder 5.4 wiederholen und daraus Rückschluss auf die Bedeutung des Phosphorylcholins ziehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abramson, J. S., Mills, E. L., Giebink, G. S. and Quie, P. G. (1982) 'Depression of monocyte and polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and bactericidal capacity by influenza A virus', *Infect Immun*, 35(1), pp. 350-5.
- Adamou, J. E., Wizemann, T. M., Barren, P. and Langermann, S. (1998) 'Adherence of Streptococcus pneumoniae to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B)', *Infect Immun*, 66(2), pp. 820-2.
- Aggarwal, A., Baker, C. S., Evans, T. W. and Haslam, P. L. (2000) 'G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome', *Eur Respir J*, 15(5), pp. 895-901.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. (2006) 'Pathogen recognition and innate immunity', *Cell*, 124(4), pp. 783-801.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001) 'Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.', *Nature*, 413(6857), pp. 732-8.
- Alsharifi, M., Mullbacher, A. and Regner, M. (2008) 'Interferon type I responses in primary and secondary infections', *Immunol Cell Biol*, 86(3), pp. 239-45.
- Anderton, J. M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A. P., Carlone, G. M., Sampson, J. S. and Ades, E. W. (2007) 'E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of Streptococcus pneumoniae', *Microb Pathog*, 42(5-6), pp. 225-36.
- Aoyama, T., Fujiwara, H., Masaki, T. and Sawamura, T. (1999) 'Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells.', *J Mol Cell Cardiol*, 31(12), pp. 2101-14.
- Areschoug, T. and Gordon, S. (2009) 'Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis', *Cell Microbiol*, 11(8), pp. 1160-9.
- ATS, A. T. S. (2005) 'Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia', *Am J Respir Crit Care Med*, 171(4), pp. 388-416.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. and Di Guilmi, A. M. (2008) 'The interaction of Streptococcus pneumoniae with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage', *Infect Immun*, 76(11), pp. 5350-6.
- Bauer, T. T., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., Welte, T. and Group, C. S. (2006) 'CRB-65 predicts death from community-acquired pneumonia.', *J Intern Med*, 260(1), pp. 93-101.
- Beigel, J. H. (2008) 'Influenza.', *Crit Care Med*, 36(9), pp. 2660-6.
- Beigel, J. H., Farrar, J., Han, A. M., Hayden, F. G., Hyer, R., de Jong, M. D., Lochindarat, S., Nguyen, T. K., Nguyen, T. H., Tran, T. H., Nicoll, A., Touch, S. and Yuen, K. Y. (2005) 'Avian influenza A (H5N1) infection in humans', *N Engl J Med*, 353(13), pp. 1374-85.
- Bergmann, S. and Hammerschmidt, S. (2006) 'Versatility of pneumococcal surface proteins.', *Microbiology*, 152(Pt 2), pp. 295-303.
- Bernatoniene, J., Zhang, Q., Dogan, S., Mitchell, T. J., Paton, J. C. and Finn, A. (2008) 'Induction of CC and CXC chemokines in human antigen-presenting dendritic cells by the pneumococcal proteins pneumolysin and CbpA, and the role played by toll-like receptor 4, NF-kappaB, and mitogen-activated protein kinases', *J Infect Dis*, 198(12), pp. 1823-33.
- Binder, C. J., Chang, M. K., Shaw, P. X., Miller, Y. I., Hartvigsen, K., Dewan, A. and Witztum, J. L. (2002) 'Innate and acquired immunity in atherogenesis', *Nat Med*, 8(11), pp. 1218-26.
- Binder, C. J., Hörkö, S., Dewan, A., Chang, M. K., Kieu, E. P., Goodyear, C. S., Shaw, P. X., Palinski, W., Witztum, J. L. and Silverman, G. J. (2003) 'Pneumococcal vaccination decreases atherosclerotic lesion formation: molecular mimicry between Streptococcus pneumoniae and oxidized LDL.', *Nat Med*, 9(6), pp. 736-43.
- Bogaert, D., De Groot, R. and Hermans, P. W. (2004) 'Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease.', *Lancet Infect Dis*, 4(3), pp. 144-54.
- Bonten, M. J., Huijts, S. M., Bolkenbaas, M. and Coauthors, C. (2015) 'Vaccine against Pneumococcal Pneumonia in Adults', *N Engl J Med*, 373(1), pp. 93.
- Buda S., Köpke K., M., L., Prahm K., Schweiger B., Wedde M., Duwe S., Buchholz U., Heiden M. and Haas W. (2012) 'Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2011/12, Robert Koch-Institut, Berlin 2012'.
- Buda S., Köpke K., M., L., Schweiger B., Biere B., Duwe S., Fiebig L., Buchholz U., Heiden M. and Haas W. (2010) 'RKI Arbeitsgemeinschaft Influenza, Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2009/10'.

- Buda S., Schweiger B., Buchholz U., Köpke K., Prahm K. and W., H. (2013) 'Arbeitsgemeinschaft Influenza, Robert Koch Institut, Influenza Monatsbericht, Kalenderwoche 24 bis 27', pp. 1 - 4.
- Cabellos, C., MacIntyre, D. E., Forrest, M., Burroughs, M., Prasad, S. and Tuomanen, E. (1992) 'Differing roles for platelet-activating factor during inflammation of the lung and subarachnoid space. The special case of *Streptococcus pneumoniae*.', *J Clin Invest*, 90(2), pp. 612-8.
- Caligiuri, G., Khallou-Laschet, J., Vandaele, M., Gaston, A. T., Delignat, S., Mandet, C., Kohler, H. V., Kaveri, S. V. and Nicoletti, A. (2007) 'Phosphorylcholine-targeting immunization reduces atherosclerosis', *J Am Coll Cardiol*, 50(6), pp. 540-6.
- Campbell, L. A., Puolakkainen, M., Lee, A., Rosenfeld, M. E., Garrigues, H. J. and Kuo, C. C. (2012) 'Chlamydia pneumoniae binds to the lectin-like oxidized LDL receptor for infection of endothelial cells', *Microbes Infect*, 14(1), pp. 43-9.
- CDC (2008) 'Invasive pneumococcal disease in children 5 years after conjugate vaccine introduction--eight states, 1998-2005', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 57(6), pp. 144-8.
- CDC (2009) 'Bacterial coinfections in lung tissue specimens from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) - United States, May-August 2009', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 58(38), pp. 1071-4.
- Chang, M. K., Binder, C. J., Torzewski, M. and Witztum, J. L. (2002) 'C-reactive protein binds to both oxidized LDL and apoptotic cells through recognition of a common ligand: Phosphorylcholine of oxidized phospholipids', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), pp. 13043-8.
- Chen, C. J., Lin, P. Y., Tsai, M. H., Huang, C. G., Tsao, K. C., Wong, K. S., Chang, L. Y., Chiu, C. H., Lin, T. Y. and Huang, Y. C. (2012) 'Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children in northern Taiwan', *Pediatr Infect Dis J*, 31(11), pp. e196-201.
- Chen, G. and Goeddel, D. V. (2002) 'TNF-R1 signaling: a beautiful pathway', *Science*, 296(5573), pp. 1634-5.
- Chirathaworn, C., Pongpanich, A. and Poovorawan, Y. (2004) 'Herpes simplex virus 1 induced LOX-1 expression in an endothelial cell line, ECV 304.', *Viral Immunol*, 17(2), pp. 308-14.
- Clementi, N., Criscuolo, E., Castelli, M., Mancini, N., Clementi, M. and Burioni, R. (2012) 'Influenza B-cells protective epitope characterization: a passkey for the rational design of new broad-range anti-influenza vaccines', *Viruses*, 4(11), pp. 3090-108.
- Coonrod, J. D. (1989) 'Pneumococcal pneumonia', *Semin Respir Infect*, 4(1), pp. 4-11.
- Cruveilhier, L. (1919) 'Action du sérum antipneumococcique au cours de la pneumonie et dans les complications de la grippe', *Annales de l'Institut Pasteur*, 33, pp. 448-61.
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I. and Tuomanen, E. I. (1995) 'Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor.', *Nature*, 377(6548), pp. 435-8.
- Dalhoff, A. (2012) 'Resistance surveillance studies: a multifaceted problem--the fluoroquinolone example', *Infection*, 40(3), pp. 239-62.
- Dieudonne, A., Torres, D., Blanchard, S., Taront, S., Jeannin, P., Delneste, Y., Pichavant, M., Trottein, F. and Gosset, P. (2012) 'Scavenger receptors in human airway epithelial cells: role in response to double-stranded RNA', *PLoS One*, 7(8), pp. e41952.
- Dobson, J., Whitley, R. J., Pocock, S. and Monto, A. S. (2015) 'Oseltamivir treatment for influenza in adults: a meta-analysis of randomised controlled trials', *Lancet*, 385(9979), pp. 1729-37.
- Dockrell, D. H., Whyte, M. K. and Mitchell, T. J. (2012) 'Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution', *Chest*, 142(2), pp. 482-91.
- Donnelly, S. C., Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Walz, A., Robertson, C. R., Carter, D. C., Grant, I. S., Pollok, A. J. and Haslett, C. (1993) 'Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups', *Lancet*, 341(8846), pp. 643-7.
- Dunn, S., Vohra, R. S., Murphy, J. E., Homer-Vanniasinkam, S., Walker, J. H. and Ponnambalam, S. (2008) 'The lectin-like oxidized low-density-lipoprotein receptor: a pro-inflammatory factor in vascular disease.', *Biochem J*, 409(2), pp. 349-55.
- Ewig, S., Welte, T., Chastre, J. and Torres, A. (2010) 'Rethinking the concepts of community-acquired and health-care-associated pneumonia.', *Lancet Infect Dis*, 10(4), pp. 279-87.
- Fillon, S., Soulis, K., Rajasekaran, S., Benedict-Hamilton, H., Radin, J. N., Orihuela, C. J., El Kasmi, K. C., Murti, G., Kaushal, D., Gaber, M. W., Weber, J. R., Murray, P. J. and Tuomanen, E. I. (2006) 'Platelet-activating factor receptor and innate immunity: uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology.', *J Immunol*, 177(9), pp. 6182-91.
- Flaumenhaft, E. and Flaumenhaft, C. (1993) 'Evolution of America's pioneer bacteriologist: George M. Sternberg's formative years', *Mil Med*, 158(7), pp. 448-57.
- Garcia, C. C., Russo, R. C., Guabiraba, R., Fagundes, C. T., Polidoro, R. B., Tavares, L. P., Salgado, A. P., Cassali, G. D., Sousa, L. P., Machado, A. V. and Teixeira, M. M. (2010) 'Platelet-activating

- factor receptor plays a role in lung injury and death caused by Influenza A in mice', *PLoS Pathog*, 6(11), pp. e1001171.
- Groskreutz, D. J., Monick, M. M., Powers, L. S., Yarovinsky, T. O., Look, D. C. and Hunninghake, G. W. (2006) 'Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells', *J Immunol*, 176(3), pp. 1733-40.
- Grossman, R. F., Rotschafer, J. C. and Tan, J. S. (2005) 'Antimicrobial treatment of lower respiratory tract infections in the hospital setting.', *Am J Med*, 118 Suppl 7A, pp. 29S-38S.
- Hakansson, A., Kidd, A., Wadell, G., Sabharwal, H. and Svanborg, C. (1994) 'Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 62(7), pp. 2707-14.
- Hall, C. B. (2001) 'Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus', *N Engl J Med*, 344(25), pp. 1917-28.
- Hament, J. M., Kimpen, J. L., Flier, A. and Wolfs, T. F. (1999) 'Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 26(3-4), pp. 189-95.
- Harford, C. G. and Hara, M. (1950) 'Pulmonary Edema in Influenzal Pneumonia of the Mouse and the Relation of Fluid in the Lung to the Inception of Pneumococcal Pneumonia', *J Exp Med*, 91(3), pp. 245-60.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. and Akira, S. (2002) 'Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway', *Nat Immunol*, 3(2), pp. 196-200.
- Hicks, L. A., Harrison, L. H., Flannery, B., Hadler, J. L., Schaffner, W., Craig, A. S., Jackson, D., Thomas, A., Beall, B., Lynfield, R., Reingold, A., Farley, M. M. and Whitney, C. G. (2007) 'Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004', *J Infect Dis*, 196(9), pp. 1346-54.
- Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B. and Suttrop, N. (2006) 'Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction', *Respir Res*, 7, pp. 97.
- Horkko, S., Bird, D. A., Miller, E., Itabe, H., Leitinger, N., Subbanagounder, G., Berliner, J. A., Friedman, P., Dennis, E. A., Curtiss, L. K., Palinski, W. and Witztum, J. L. (1999) 'Monoclonal autoantibodies specific for oxidized phospholipids or oxidized phospholipid-protein adducts inhibit macrophage uptake of oxidized low-density lipoproteins', *J Clin Invest*, 103(1), pp. 117-28.
- Huang, S. S., Platt, R., Rifas-Shiman, S. L., Pelton, S. I., Goldmann, D. and Finkelstein, J. A. (2005) 'Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004', *Pediatrics*, 116(3), pp. e408-13.
- Huss, A., Scott, P., Stuck, A. E., Trotter, C. and Egger, M. (2009) 'Efficacy of pneumococcal vaccination in adults: a meta-analysis', *CMAJ*, 180(1), pp. 48-58.
- Höffken, G., Lorenz, J., Kern, W., Welte, T., Bauer, T., Dalhoff, K., Dietrich, E., Ewig, S., Gastmeier, P., Grabein, B., Halle, E., Kolditz, M., Marre, R., Sitter, H., Chemotherapy, P.-E.-S. o., Society, G. R. D., Society, G. I. D. and Pneumonia, C. N. C. f. t. M. o. L. R. T. I. a. C.-a. (2010) 'Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society of Chemotherapy, the German Respiratory Diseases Society, the German Infectious Diseases Society and of the Competence Network CAPNETZ for the Management of Lower Respiratory Tract Infections and Community-acquired Pneumonia.', *Pneumologie*, 64(3), pp. 149-54.
- Ishizuka, S., Yamaya, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Ida, S., Sasaki, T., Inoue, D., Sekizawa, K., Nishimura, H. and Sasaki, H. (2003) 'Effects of rhinovirus infection on the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells', *J Infect Dis*, 188(12), pp. 1928-39.
- Jacobs, B. L. and Langland, J. O. (1996) 'When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA', *Virology*, 219(2), pp. 339-49.
- Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) 'Innate immune recognition', *Annu Rev Immunol*, 20, pp. 197-216.
- Jeannin, P., Bottazzi, B., Sironi, M., Doni, A., Rusnati, M., Presta, M., Maina, V., Magistrelli, G., Haeuw, J. F., Hoeffel, G., Thieblemont, N., Corvaia, N., Garlanda, C., Delneste, Y. and Mantovani, A. (2005) 'Complexity and complementarity of outer membrane protein A recognition by cellular and humoral innate immunity receptors', *Immunity*, 22(5), pp. 551-60.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G. and Bauer, S. (2002) 'Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848', *Nat Immunol*, 3(6), pp. 499.

- Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. and Andrew, P. W. (2008) 'The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease', *Nat Rev Microbiol*, 6(4), pp. 288-301.
- Kawabata, M. and Kurono, Y. (2011) 'Polyinosine-polycytidylic acid enhances cellular adherence of *Streptococcus pneumoniae*', *Laryngoscope*, 121(11), pp. 2443-8.
- Kawai, T. and Akira, S. (2010) 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors', *Nat Immunol*, 11(5), pp. 373-84.
- Kawai, T. and Akira, S. (2011) 'Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity', *Immunity*, 34(5), pp. 637-50.
- Kayser, B. u. Z. (2010) *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme.
- Kishimoto, H., Akagi, M., Zushi, S., Teramura, T., Onodera, Y., Sawamura, T. and Hamanishi, C. (2010) 'Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress', *Osteoarthritis Cartilage*, 18(10), pp. 1284-90.
- Koarai, A., Sugiura, H., Yanagisawa, S., Ichikawa, T., Minakata, Y., Matsunaga, K., Hirano, T., Akamatsu, K. and Ichinose, M. (2010) 'Oxidative stress enhances toll-like receptor 3 response to double-stranded RNA in airway epithelial cells', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42(6), pp. 651-60.
- Koppe, U., Suttrop, N. and Opitz, B. (2011) 'Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system', *Cell Microbiol*.
- Kuiken, T., Riteau, B., Fouchier, R. A. and Rimmelzwaan, G. F. (2012) 'Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly', *Curr Opin Virol*, 2(3), pp. 276-86.
- Kume, N., Murase, T., Moriwaki, H., Aoyama, T., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T. (1998) 'Inducible expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.', *Circ Res*, 83(3), pp. 322-7.
- Lacy, P. and Stow, J. L. (2011) 'Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways', *Blood*, 118(1), pp. 9-18.
- Lagacé-Wiens, P. R., Rubinstein, E. and Gumel, A. (2010) 'Influenza epidemiology--past, present, and future.', *Crit Care Med*, 38(4 Suppl), pp. e1-9.
- Lai, Y., Yi, G., Chen, A., Bhardwaj, K., Tragesser, B. J., Rodrigo, A. V., Zlotnick, A., Mukhopadhyay, S., Ranjith-Kumar, C. T. and Kao, C. C. (2011) 'Viral double-strand RNA-binding proteins can enhance innate immune signaling by toll-like Receptor 3', *PLoS One*, 6(10), pp. e25837.
- Le Goffic, R., Balloy, V., Lagranderie, M., Alexopoulou, L., Escriou, N., Flavell, R., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2006) 'Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia', *PLoS Pathog*, 2(6), pp. e53.
- Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2007) 'Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells.', *J Immunol*, 178(6), pp. 3368-72.
- Lim, W. S., van der Eerden, M. M., Laing, R., Boersma, W. G., Karalus, N., Town, G. I., Lewis, S. A. and Macfarlane, J. T. (2003) 'Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study', *Thorax*, 58(5), pp. 377-82.
- Loosli, C. G., Stinson, S. F., Ryan, D. P., Hertweck, M. S., Hardy, J. D. and Serebrin, R. (1975) 'The destruction of type 2 pneumocytes by airborne influenza PR8-A virus; its effect on surfactant and lecithin content of the pneumonic lesions of mice', *Chest*, 67(2 Suppl), pp. 7S-14S.
- Lynch, J. P., 3rd, Fishbein, M. and Echavarría, M. (2011) 'Adenovirus', *Semin Respir Crit Care Med*, 32(4), pp. 494-511.
- Lynch, J. P. and Zhané, G. G. (2010) '*Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines.', *Curr Opin Pulm Med*, 16(3), pp. 217-25.
- Madhi, S. A. and Klugman, K. P. (2004) 'A role for *Streptococcus pneumoniae* in virus-associated pneumonia', *Nat Med*, 10(8), pp. 811-3.
- Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G. and Beninati, C. (2009) 'Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells', *Nat Immunol*, 10(6), pp. 587-94.
- McCullers, J. A. (2006) 'Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus.', *Clin Microbiol Rev*, 19(3), pp. 571-82.
- McCullers, J. A., Iverson, A. R., McKeon, R. and Murray, P. J. (2008) 'The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza.', *Scand J Infect Dis*, 40(1), pp. 11-7.

- McCullers, J. A. and Rehg, J. E. (2002) 'Lethal synergism between influenza virus and Streptococcus pneumoniae: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor.', *J Infect Dis*, 186(3), pp. 341-50.
- McManus, M. T. and Sharp, P. A. (2002) 'Gene silencing in mammals by small interfering RNAs', *Nat Rev Genet*, 3(10), pp. 737-47.
- McNamee, L. A. and Harmsen, A. G. (2006) 'Both influenza-induced neutrophil dysfunction and neutrophil-independent mechanisms contribute to increased susceptibility to a secondary Streptococcus pneumoniae infection', *Infect Immun*, 74(12), pp. 6707-21.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000) 'Innate immunity', *N Engl J Med*, 343(5), pp. 338-44.
- Michelow, I. C., Olsen, K., Lozano, J., Rollins, N. K., Duffy, L. B., Ziegler, T., Kaupilla, J., Leinonen, M. and McCracken, G. H. (2004) 'Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children.', *Pediatrics*, 113(4), pp. 701-7.
- Minami, M., Kume, N., Kataoka, H., Morimoto, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T. (2000) 'Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1', *Biochem Biophys Res Commun*, 272(2), pp. 357-61.
- Mitchell, A. M. and Mitchell, T. J. (2010) 'Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation', *Clin Microbiol Infect*, 16(5), pp. 411-8.
- Mizgerd, J. P. (2008) 'Acute lower respiratory tract infection', *N Engl J Med*, 358(7), pp. 716-27.
- Monto, A. S., Gravenstein, S., Elliott, M., Colopy, M. and Schweinle, J. (2000) 'Clinical signs and symptoms predicting influenza infection', *Arch Intern Med*, 160(21), pp. 3243-7.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K. and Fauci, A. S. (2008) 'Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness.', *J Infect Dis*, 198(7), pp. 962-70.
- Muir, R. and Wilson, G. H. (1919) 'Observations ON INFLUENZA AND ITS COMPLICATIONS.', *Br Med J*, 1(3027), pp. 3-5.
- Mukaida, N. (2003) 'Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284(4), pp. L566-77.
- Murase, T., Kume, N., Korenaga, R., Ando, J., Sawamura, T., Masaki, T. and Kita, T. (1998) 'Fluid shear stress transcriptionally induces lectin-like oxidized LDL receptor-1 in vascular endothelial cells.', *Circ Res*, 83(3), pp. 328-33.
- Musher, D. M. (2006) 'Pneumococcal vaccine--direct and indirect ("herd") effects', *N Engl J Med*, 354(14), pp. 1522-4.
- Nagase, M., Abe, J., Takahashi, K., Ando, J., Hirose, S. and Fujita, T. (1998) 'Genomic organization and regulation of expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) gene', *J Biol Chem*, 273(50), pp. 33702-7.
- Nair, H., Brooks, W. A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J. A., Madhi, S. A., Simmerman, J. M., Gordon, A., Sato, M., Howie, S., Krishnan, A., Ope, M., Lindblade, K. A., Carosone-Link, P., Lucero, M., Ochieng, W., Kamimoto, L., Dueger, E., Bhat, N., Vong, S., Theodoratou, E., Chittaganpitch, M., Chimah, O., Balmaseda, A., Buchy, P., Harris, E., Evans, V., Katayose, M., Gaur, B., O'Callaghan-Gordo, C., Goswami, D., Arvelo, W., Venter, M., Briese, T., Tokarz, R., Widdowson, M. A., Mounts, A. W., Breiman, R. F., Feikin, D. R., Klugman, K. P., Olsen, S. J., Gessner, B. D., Wright, P. F., Rudan, I., Broor, S., Simoes, E. A. and Campbell, H. (2011) 'Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis', *Lancet*, 378(9807), pp. 1917-30.
- Ogura, S., Kakino, A., Sato, Y., Fujita, Y., Iwamoto, S., Otsui, K., Yoshimoto, R. and Sawamura, T. (2009) 'Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction.', *Circ J*, 73(11), pp. 1993-9.
- Oka, K., Sawamura, T., Kikuta, K., Itokawa, S., Kume, N., Kita, T. and Masaki, T. (1998) 'Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 mediates phagocytosis of aged/apoptotic cells in endothelial cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), pp. 9535-40.
- Pang, I. K. and Iwasaki, A. (2011) 'Inflammasomes as mediators of immunity against influenza virus.', *Trends Immunol*, 32(1), pp. 34-41.
- Parlato, S., Romagnoli, G., Spadaro, F., Canini, I., Sirabella, P., Borghi, P., Ramoni, C., Filesi, I., Biocca, S., Gabriele, L. and Belardelli, F. (2010) 'LOX-1 as a natural IFN-alpha-mediated signal for apoptotic cell uptake and antigen presentation in dendritic cells', *Blood*, 115(8), pp. 1554-63.
- Paul Glezen, W., Schmier, J. K., Kuehn, C. M., Ryan, K. J. and Oxford, J. (2013) 'The burden of influenza B: a structured literature review', *Am J Public Health*, 103(3), pp. e43-51.
- Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S. (2002) 'Scavenger receptors in innate immunity', *Curr Opin Immunol*, 14(1), pp. 123-8.

- Pletz, M. W., Rohde, G., Schütte, H., Bals, R., von Baum, H., Welte, T. and CAPNETZ-Studiengruppe (2011a) '[Epidemiology and Aetiology of Community-acquired Pneumonia (CAP)]', *Dtsch Med Wochenschr*, 136(15), pp. 775-80.
- Pletz, M. W., Zanger, P., Jilg, W. and Kern, W. V. (2011b) '[Vaccinations]', *Dtsch Med Wochenschr*, 136(40), pp. 2011-5.
- Radin, J. N., Orihuela, C. J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P. J. and Tuomanen, E. I. (2005) 'beta-Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*', *Infect Immun*, 73(12), pp. 7827-35.
- Reddel, R. R., Ke, Y., Gerwin, B. I., McMenamin, M. G., Lechner, J. F., Su, R. T., Brash, D. E., Park, J. B., Rhim, J. S. and Harris, C. C. (1988) 'Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes', *Cancer Res*, 48(7), pp. 1904-9.
- Reizis, B., Colonna, M., Trinchieri, G., Barrat, F. and Gilliet, M. (2011) 'Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system?', *Nat Rev Immunol*, 11(8), pp. 558-65.
- Ren, X., Zhou, H., Li, B. and Su, S. B. (2011) 'Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid enhances autoimmune disease in a retinal autoimmunity model.', *Int Immunopharmacol*, 11(6), pp. 769-73.
- Rijneveld, A. W., Weijer, S., Florquin, S., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S. and van der Poll, T. (2004) 'Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice', *J Infect Dis*, 189(4), pp. 711-6.
- Ritter, M., Mennerich, D., Weith, A. and Seither, P. (2005) 'Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response', *J Inflamm (Lond)*, 2, pp. 16.
- RKI 2006. Epidemiologisches Bulletin. Berlin: Robert Koch Institut.
- Sabat, R. (2010) 'IL-10 family of cytokines', *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(5), pp. 315-24.
- Sawamura, T., Kume, N., Aoyama, T., Moriwaki, H., Hoshikawa, H., Aiba, Y., Tanaka, T., Miwa, S., Katsura, Y., Kita, T. and Masaki, T. (1997) 'An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein.', *Nature*, 386(6620), pp. 73-7.
- Schmidt, A. C. (2004) 'Antiviral therapy for influenza : a clinical and economic comparative review', *Drugs*, 64(18), pp. 2031-46.
- Seki, M., Kosai, K., Hara, A., Imamura, Y., Nakamura, S., Kurihara, S., Izumikawa, K., Takeya, H., Yamamoto, Y., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Mukae, H., Tashiro, T. and Kohno, S. (2009) 'Expression and DNA microarray analysis of a platelet activating factor-related molecule in severe pneumonia in mice due to influenza virus and bacterial co-infection', *Jpn J Infect Dis*, 62(1), pp. 6-10.
- Sellers, T. F., Jr., Schulman, J., Bouvier, C., Mc, C. R. and Kilbourne, E. D. (1961) 'The influence of influenza virus infection on exogenous staphylococcal and endogenous murine bacterial infection of the bronchopulmonary tissues of mice', *J Exp Med*, 114, pp. 237-56.
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Sawamura, T., Kita, T. and Yonehara, S. (2001) 'LOX-1 supports adhesion of Gram-positive and Gram-negative bacteria.', *J Immunol*, 166(8), pp. 5108-14.
- Shinya, K., Ebina, M., Yamada, S., Ono, M., Kasai, N. and Kawaoka, Y. (2006) 'Avian flu: influenza virus receptors in the human airway', *Nature*, 440(7083), pp. 435-6.
- Soepandi, P. Z., Burhan, E., Mangunegoro, H., Nawas, A., Aditama, T. Y., Partakusuma, L., Isbaniah, F., Ikhsan, M., Swidarmoko, B., Sutiyoso, A., Malik, S., Benamore, R., Baird, J. K. and Taylor, W. R. (2010) 'Clinical course of avian influenza A(H5N1) in patients at the Persahabatan Hospital, Jakarta, Indonesia, 2005-2008', *Chest*, 138(3), pp. 665-73.
- Stegemann-Koniszewski, S., Gereke, M., Orrskog, S., Lienenklaus, S., Pasche, B., Bader, S. R., Gruber, A. D., Akira, S., Weiss, S., Henriques-Normark, B., Bruder, D. and Gunzer, M. (2013) 'TLR7 contributes to the rapid progression but not to the overall fatal outcome of secondary pneumococcal disease following influenza A virus infection', *J Innate Immun*, 5(1), pp. 84-96.
- Strieter, R. M., Belperio, J. A. and Keane, M. P. (2003) 'Host innate defenses in the lung: the role of cytokines', *Curr Opin Infect Dis*, 16(3), pp. 193-8.
- Sun, K. and Metzger, D. W. (2008) 'Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon-gamma during recovery from influenza infection.', *Nat Med*, 14(5), pp. 558-64.
- Szalai, A. J., Briles, D. E. and Volanakis, J. E. (1995) 'Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice', *J Immunol*, 155(5), pp. 2557-63.

- Tessmer, A., Welte, T., Schmidt-Ott, R., Eberle, S., Barten, G., Suttorp, N. and Schaberg, T. (2011) 'Influenza vaccination is associated with reduced severity of community-acquired pneumonia', *Eur Respir J*, 38(1), pp. 147-53.
- Tian, X., Xu, F., Lung, W. Y., Meyerson, C., Ghaffari, A. A., Cheng, G. and Deng, J. C. (2012) 'Poly I:C enhances susceptibility to secondary pulmonary infections by gram-positive bacteria', *PLoS One*, 7(9), pp. e41879.
- Tiraby, J. G. and Fox, M. S. (1973) 'Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(12), pp. 3541-5.
- van der Poll, T. and Opal, S. M. (2009) 'Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia.', *Lancet*, 374(9700), pp. 1543-56.
- van der Sluijs, K. F., van Elden, L. J., Nijhuis, M., Schuurman, R., Florquin, S., Shimizu, T., Ishii, S., Jansen, H. M., Lutter, R. and van der Poll, T. (2006) 'Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against Streptococcus pneumoniae during postinfluenza pneumonia.', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 290(1), pp. L194-9.
- van der Sluijs, K. F., van Elden, L. J., Nijhuis, M., Schuurman, R., Pater, J. M., Florquin, S., Goldman, M., Jansen, H. M., Lutter, R. and van der Poll, T. (2004) 'IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection', *J Immunol*, 172(12), pp. 7603-9.
- van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. and Kuiken, T. (2007) 'Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals', *Am J Pathol*, 171(4), pp. 1215-23.
- Vercammen, E., Staal, J. and Beyaert, R. (2008) 'Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3', *Clin Microbiol Rev*, 21(1), pp. 13-25.
- Viasus, D., Pano-Pardo, J. R., Pachon, J., Riera, M., Lopez-Medrano, F., Payeras, A., Farinas, M. C., Moreno, A., Rodriguez-Bano, J., Oteo, J. A., Martinez-Montauti, J., Torre-Cisneros, J., Segura, F., Gudiol, F. and Carratala, J. (2011) 'Pneumonia complicating pandemic (H1N1) 2009: risk factors, clinical features, and outcomes', *Medicine (Baltimore)*, 90(5), pp. 328-36.
- von Baum, H., Schweiger, B., Welte, T., Marre, R., Suttorp, N., Pletz, M. W., Ewig, S. and Group, C. S. (2011) 'How deadly is seasonal influenza-associated pneumonia? The German Competence Network for Community-Acquired Pneumonia.', *Eur Respir J*, 37(5), pp. 1151-7.
- Welte, T. (2010) '[Pneumonia -- historical development, current status, future prospects].', *Pneumologie*, 64(9), pp. 560-6.
- Welte, T. and Köhnlein, T. (2009) 'Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network.', *Semin Respir Crit Care Med*, 30(2), pp. 127-35.
- Weyand, C. M., Younge, B. R. and Goronzy, J. J. (2011) 'IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis', *Curr Opin Rheumatol*, 23(1), pp. 43-9.
- WHO 2008. The Global Burden of Disease: 2004 update. Genf: WHO.
- Woodhead, M. (2002) 'Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns', *Eur Respir J Suppl*, 36, pp. 20s-27s.
- Wu, Z., Sawamura, T., Kurdowska, A. K., Ji, H. L., Idell, S. and Fu, J. (2011) 'LOX-1 deletion improves neutrophil responses, enhances bacterial clearance and reduces lung injury in a murine polymicrobial sepsis model.', *Infect Immun*.
- Yamanaka, S., Zhang, X. Y., Miura, K., Kim, S. and Iwao, H. (1998) 'The human gene encoding the lectin-type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile.', *Genomics*, 54(2), pp. 191-9.
- Yap, V., Datta, D. and Metersky, M. L. (2013) 'Is the present definition of health care-associated pneumonia the best way to define risk of infection with antibiotic-resistant pathogens?', *Infect Dis Clin North Am*, 27(1), pp. 1-18.
- Zhang, J. R., Mostov, K. E., Lamm, M. E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M. and Tuomanen, E. (2000) 'The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells', *Cell*, 102(6), pp. 827-37.
- Zhang, P., Liu, M. C., Cheng, L., Liang, M., Ji, H. L. and Fu, J. (2009) 'Blockade of LOX-1 prevents endotoxin-induced acute lung inflammation and injury in mice.', *J Innate Immun*, 1(4), pp. 358-65.

ANHANG

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Peric, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Rolle des lectin-like oxidized lipoprotein receptor-1 in der postviralen Pneumokokkenpneumonie* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Tabellarischer Lebenslauf

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

Kongressbeiträge und Auszeichnungen

- *S. pneumoniae* adheres to human bronchial epithelial cells via the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). Peric A., Becher A., Hippenstiel S., N'Guessan P. European Student's Conference 2011, Berlin
- 2. Platz in der Kategorie "*Oral Presentation*", European Student's Conference 2011, Berlin

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. N. Suttorp dafür danken, dass ich meine Dissertation an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie realisieren konnte.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Philippe Dje N'Guessan für die Vergabe dieses aktuellen und faszinierenden Themas sowie für die gute Betreuung. Die Zusammenarbeit und die vielen interessanten Gespräche haben mir einen lehrreichen Einblick in die Welt der universitären Forschung erlaubt.

Von entscheidender Bedeutung für das Gelingen dieser Doktorarbeit waren die tägliche Analyse und Diskussion mit Frau Dr. rer. nat. Stefanie Scharf. Für ihre Kritik, Unterstützung und Korrektur der ersten Rohfassung möchte ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank der Arbeitsgruppe um Herrn Professor S. Hippenstiel, insbesondere Anne Becher, für die Überlassung der humanen Lungenbioptate.

Dem gesamten Team des Forschungslabors und vor allem den technischen Assistentinnen danke ich für die geduldige Einarbeitung, die angenehme Atmosphäre und das kollegiale Miteinander während dieser intensiven Zeit.

Die kritische Korrektur der Endfassung durch Frau Dr. med. Maren Claus hat dieser Arbeit den Feinschliff verliehen und letzte Unaufmerksamkeiten beseitigt. Vielen Dank dafür.

Ich danke meiner Familie für die mannigfaltige Unterstützung und ihren motivierenden Beistand. Schließlich möchte ich meiner Partnerin Frau Dr. med. Katharina Kopetschke für Ihre Hilfe und Geduld von ganzem Herzen danken.