

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

DISSERTATION

Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale
Entzündungsreaktion in verschiedenen Pneumoniemodellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Müller-Plathe

aus Zürich

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Kurzzusammenfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung	5
3.1 Ambulant erworbene Pneumonie	5
3.2 Streptococcus pneumoniae	7
3.3 Influenzavirus	9
3.4 Immunabwehr der Lunge	11
3.4.1 Angeborenes Immunsystem.....	12
3.4.2 Zytokine	13
3.5 Resolution der Inflammation	15
3.6 Resolvin E1	17
3.6.1 Resolvin-Rezeptoren	19
3.6.2 Effekte von RvE1 auf entzündliche Prozesse <i>in-vitro</i> und <i>in-vivo</i>	20
3.6.2.1 Anti-inflammatorische Effekte von RvE1	20
3.6.2.2 Resolutionsfördernde Effekte von Resolvin E1	23
3.6.3 Effekte von RvE1 bei pulmonalen Erkrankungen	24
3.7 Fragestellung der Arbeit	25
4 Material und Methoden	28
4.1 Material	28
4.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen	28
4.1.2 Medien	30
4.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	30
4.1.4 Geräte und Apparaturen	31
4.1.5 Antikörper	33
4.1.6 PCR-Primer	34
4.2 Methoden	34
4.2.1 Humanes Lungengewebe.....	34
4.2.2 Immunhistologische Färbung von BLT-1 und ChemR23 in humanem Lungengewebe	34
4.2.3 Ex-vivo Stimulation von humanem Lungengewebe mit LPS und MALP-2	35
4.2.3.1 Stimulation von humanen Lungengewebeproben mit LPS.....	36
4.2.3.2 Stimulation von humanen Lungengewebeproben mit synthetischem MALP-2.....	38
4.2.4 Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Überständen des humanen Lungengewebes	39
4.2.5 Quantifizierung der BLT-1- und ChemR23-Rezeptorexpression in humanem Lungengewebe	39
4.2.5.1 RNA Isolation aus humanem Lungengewebe	39
4.2.5.2 Durchführung der reversen Transkription	40
4.2.5.3 Durchführung der quantitativen real time PCR.....	41

4.2.6	Versuchsaufbau der tierexperimentellen Untersuchungen.....	43
4.2.7	Versuchsablauf der tierexperimentellen Untersuchungen.....	44
4.2.8	Versuchstiere.....	46
4.2.8.1	Tierhaltung.....	46
4.2.9	Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	46
4.2.9.1	Vorbereitung.....	46
4.2.9.2	Bakterien.....	47
4.2.9.3	Anzucht.....	47
4.2.9.4	Infektion der Tiere.....	48
4.2.10	Infektion mit Influenzavirus.....	48
4.2.11	Verabreichung der eingesetzten Therapeutika.....	48
4.2.11.1	Resolvin E1 Applikation.....	48
4.2.11.2	18R-HEPE Applikation.....	49
4.2.11.3	Antibiotikaapplikation.....	49
4.2.12	Klinische Überwachung der infizierten Tiere.....	49
4.2.13	Präparation der Tiere und Probenentnahme.....	51
4.2.13.1	Präparation der Mäuse.....	51
4.2.13.2	Durchführung der Blutentnahme.....	52
4.2.13.3	Durchführung der bronchoalveolären Lavage.....	52
4.2.13.4	Entnahme der Lunge.....	53
4.2.14	Bestimmung der Bakterienlast in BALF, Lungengewebe und Blut.....	53
4.2.14.1	Bakterienlast der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	53
4.2.14.2	Bakterienlast der Lunge.....	53
4.2.14.3	Bakterienlast des Blutes.....	54
4.2.15	Bestimmung der Viruslast im Lungengewebe.....	54
4.2.16	Leukozytendifferenzierung in BALF und Lungengewebe.....	55
4.2.16.1	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	55
4.2.16.2	Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung im Lungengewebe.....	58
4.2.17	Leukozytendifferenzierung im Blut.....	58
4.2.18	Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	60
4.2.19	Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität.....	61
4.2.20	Statistische Datenanalyse.....	62
5	Ergebnisse.....	63
5.1	Lokalisation von BLT-1 und ChemR23 in der humanen Lunge.....	63
5.2	Effekt von RvE1 im ex-vivo Modell der humanen Lungengewebskultur.....	64
5.2.1	LPS-Stimulationsmodell im primären humanen Lungengewebe.....	64
5.2.1.1	RvE1 hat keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im humanen Lungengewebe.....	65
5.2.1.2	RvE1 verändert die Expression von BLT-1 und ChemR23 in LPS-stimuliertem humanen Lungengewebe nicht.....	66
5.2.2	MALP-2-Stimulationsmodell im primären humanen Lungengewebe.....	67
5.2.2.1	RvE1 beeinflusst nicht die MALP-2-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im humanen Lungengewebe.....	68
5.2.2.2	RvE1 verändert nicht die Expression von BLT-1 und ChemR23 im MALP-2-stimulierten humanen Lungengewebe.....	69
5.3	RvE1 im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie: Einfluss auf die akute Phase der Immunabwehr.....	69

5.3.1	RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der akuten Pneumokokkenpneumonie	70
5.3.2	RvE1 hat keinen Einfluss auf die Erregerlast in der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie	71
5.3.3	RvE1 bewirkt keine Veränderung der pulmonalen Barrierestörung in der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie	72
5.3.4	RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die akute Entzündungsreaktion in der Lunge nach Pneumokokkeninfektion	74
5.3.4.1	Entzündungszellen in der BALF	74
5.3.4.2	Zytokine in der BALF	75
5.3.5	RvE1 führt nicht zur Veränderung der systemischen Entzündungsreaktion im Blut bei akuter Pneumokokkenpneumonie	77
5.4	RvE1 im murinen Modell der Influenzaviruspneumonie: Einfluss auf die frühe viral-bedingte Entzündungsreaktion	78
5.4.1	RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Erregerabwehr in der Lunge nach Influenzavirusinfektion	80
5.4.2	RvE1 hat keinen Einfluss auf die akute Entzündungsreaktion in der Lunge nach Influenzavirusinfektion	81
5.4.2.1	Entzündungszellen im Lungengewebe	81
5.4.2.2	Entzündungszellen in der BALF	83
5.4.2.3	Zytokine in der BALF	86
5.4.3	RvE1 und 18R-HEPE haben keinen Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion im Blut nach Influenzavirusinfektion	88
5.5	RvE1 im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikatherapie: Einfluss auf die Resolution der Entzündung	89
5.5.1	RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie unter Antibiotikatherapie	90
5.5.2	RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entzündungsreaktion in der Lunge nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie	91
5.5.2.1	Entzündungszellen in der BALF	91
5.5.2.2	Zytokine in der BALF	94
5.5.3	RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion im Blut nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie	96
5.5.4	RvE1 bewirkt keine Veränderung der pulmonalen Barrierestörung nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie	97
6	Diskussion	99
6.1	Nachweis der BLT-1 und ChemR23 Expression in humanem Lungengewebe	99
6.2	Exogene Applikation von RvE1 hat keinen Einfluss auf sterile Stimulationsmodelle in humanem Lungengewebe	101
6.3	Limitationen des verwendeten ex-vivo Modells	103
6.4	RvE1 und 18R-HEPE entfalten keine Wirkung in akuten Inflammationsmodellen	104
6.4.1	Lokale Entzündungsreaktion	105
6.4.2	Systemische Entzündungsreaktion	109
6.4.3	Barrierestörung	111
6.5	RvE1 hat keinen Einfluss auf die Resolution der Pneumokokkenpneumonie nach Antibiotikabehandlung	112

6.6	Limitationen der murinen Infektionsmodelle und der Studie	116
6.7	Ausblick.....	118
7	Literaturverzeichnis	121
8	Anhang.....	132
8.1	Eidesstattliche Versicherung	132
8.2	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	133
8.3	Lebenslauf.....	134
8.4	Publikationsliste	135
8.5	Danksagung	136

Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BLT1	Leukotrien B4-Rezeptor-1
BSA	Bovines Serum Albumin
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie (<i>community acquired pneumonia</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
ChemR23	Chemerinrezeptor 23
COX2	Cyclooxygenase-2
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleic Acid
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EOR	Eicosanoid-Oxireduktase
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAM	Floureszierender Donorfarbstoff
FCS	Fetales Kälberserum

fMLP	<i>N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine</i>
FRET	Floureszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptor
H	Hamäglutinin
HEPE	18R-hydroxy-Eicosapentaensäure <i>18R-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-EPA</i>
i.v.	Intravenös
IAV	Influenza-A-Viren
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IL	Interleukin
INF	<i>Interferon</i>
LOX-5	Lipoxygenase-5
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotrien
LytA	Autolysine
MALP-2	<i>Macrophage-Activating Lipopeptide Of 2kDa</i>
MCP	<i>Monocyte Chemotactic Protein, CCL2</i>
MDCK-II	<i>Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells</i>
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein, CCL3</i>
MSA	Murines Serum Albumin
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Neuramidase
NF-kB	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Sickstoffmonoxyd
OD	Optische Dichte
p.i.	<i>post infectionem</i>
PAMPs	<i>Pathogene Associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming Units</i>
PG	Prostaglandin
Ply	Pneumolysin
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PsaA	<i>Pneumococcal Surface Antigen</i>
PspA	<i>Pneumococcal Surface Protein A</i>
PspC	<i>Pneumococcal Surface Protein C</i>
PUFA	<i>Poly Unsaturated Fatty Acids</i>
qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RQ	Relative Quantifizierung
Rv	Resolvin
RvE1	Resolvin E1, <i>5S, 12R, 18R-Trihydroxy-6Z, 8E, 10E, 14Z, 16E-EPA</i>
<i>S. pneumoniae</i> , S.pn.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
s.c.	Subkutan

sCAP	Schwere ambulant erworbene Pneumonie <i>(severe community acquired pneumonia)</i>
SP-A, SP-D	Sufactantprotein-A/D
SPM	<i>Specialized Pro-Resolution Mediators</i>
THY	Todd-Hewitt-Bouillon
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
TMB	Tetramethylbenzidine Liquid Substrate
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

Abbildungsverzeichnis

	Titel	Seite
Abbildung 1	Aufbau und Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	8
Abbildung 2	Aufbau und Virulenzfaktoren des Influenza-A-virus.	10
Abbildung 3	Transzelluläre Synthese von RvE1 durch Endothelzellen und neutrophile Granulozyten (PMN).	18
Abbildung 4	Zelluläre anti-inflammatorische und resolutions-fördernde Effekte von RvE1.	21
Abbildung 5	Versuchsablauf LPS-Stimulation von humanem Lungengewebe.	36
Abbildung 6	Versuchsablauf MALP-2 Stimulation von humanem Lungengewebe.	38
Abbildung 7	Versuchsablauf im murinen Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie (Versuchsteil 5.3.).	44
Abbildung 8	Versuchsablauf im murinen Modell der frühen Influenzaviruspneumonie (Versuchsteil 5.4.).	45
Abbildung 9	Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikbehandlung (Versuchsteil 5.5.).	45
Abbildung 10	Immunhistologische Färbung von BLT-1 und ChemR23 in humanem Lungengewebe.	64
Abbildung 11	Zytokinproduktion im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit RvE1.	66
Abbildung 12	Genexpression von BLT-1 und ChemR23 im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit RvE1.	67
Abbildung 13	Zytokinproduktion im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit MALP-2 und Behandlung mit RvE1.	68
Abbildung 14	Genexpression von BLT-1 und ChemR23 im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit MALP-2 und Behandlung mit RvE1.	69
Abbildung 15	Klinische Parameter im Verlauf der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie.	71
Abbildung 16	Bakterienlast 48 h nach Pneumokokkeninfektion.	72
Abbildung 17	Pulmonale Schrankenstörung 48 h nach Pneumokokkeninfektion.	73
Abbildung 18	Leukozytensubpopulationen in der BALF 48 h nach Pneumokokkeninfektion.	75
Abbildung 19	Zytokine in der BALF 48 h nach Pneumokokkeninfektion.	76
Abbildung 20	Leukozytenpopulationen im Blut 48 h nach Pneumokokkeninfektion.	78
Abbildung 21	Klinische Parameter und Viruslast in der Lunge 96 h nach Influenzavirusinfektion.	81
Abbildung 22	Leukozytenpopulationen im Lungengewebe 96 h nach Influenzavirusinfektion.	83

Abbildung 23	Leukozytenpopulationen in der BALF 96 h nach Influenzavirusinfektion.	85
Abbildung 24	Zytokine in der BALF 96 h nach Influenzavirusinfektion.	87
Abbildung 25	Leukozytenpopulationen im Blut 96 h nach Influenzavirusinfektion.	89
Abbildung 26	Klinische Parameter nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.	91
Abbildung 27	Leukozytenpopulationen in der BALF 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.	93
Abbildung 28	Zytokinproduktion in der BALF 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.	95
Abbildung 29	Leukozytenpopulationen im Blut 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.	97
Abbildung 30	Pulmonale Schrankenstörung 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.	98

Tabellenverzeichnis

	Titel	Seite
Tabelle 1	Versuchsgruppen LPS-Stimulation von humanem Lungengewebe	36
Tabelle 2	Versuchsgruppen MALP-2 Stimulation von humanem Lungengewebe	38
Tabelle 3	Master-Mix für die reverse Transkription der RNA in cDNA	41
Tabelle 4	Zusammensetzung Master Mix für die <i>real time</i> PCR	43
Tabelle 5	Versuchsaufbau Akute Pneumokokkenpneumonie (Versuchsteil 5.3.)	43
Tabelle 6	Versuchsaufbau Influenzaviruspneumonie (Versuchsteil 5.4.)	43
Tabelle 7	Versuchsaufbau Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikatherapie (Versuchsteil 5.5.)	44
Tabelle 8	Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung	51
Tabelle 9	Antikörper-Master-Mix zur Färbung von Leukozyten in BALF und Lungengewebe	57
Tabelle 10	Antikörper-Master-Mix zur Färbung von Leukozyten im Blut	60

1 Kurzzusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community acquired pneumonia*, CAP) steht an vierter Stelle der 10 häufigsten Todesursachen weltweit. In Schwellenländern ist sie die häufigste Todesursache. Trotz spezifischer anti-mikrobieller Therapie, dem Einsatz von Vakzinen und der stetigen Weiterentwicklung der Intensivmedizin liegt die Sterblichkeitsrate stationär behandelter Pneumoniepatienten zwischen 10 und 20 %. Die unkontrollierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielt bei schwerer Pneumonie (sCAP) eine große Rolle und begünstigt die Entstehung eines akuten Lungenversagens mit Sepsis und Multiorganversagen. Daher sind neue Wirkstoffe zur gezielten Limitierung überschießender Entzündungsreaktionen notwendig, um den Verlauf der CAP positiv zu beeinflussen.

Resolvine sind Teil einer Lipidmediator-Familie, welche sowohl anti-inflammatorische als auch resolutions-fördernde Wirkungen entfalten. Resolvin E1 (RvE1) fördert in murinen Modellen peritonealer, intestinaler oder anderer lokaler Entzündungen den programmierten Zelltod (Apoptose) von neutrophilen Granulozyten, sowie die Beseitigung von apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen mittels Efferozytose. Beide Prozesse stellen zentrale Mechanismen der zellulären Resolutionsphysiologie dar. Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte von RvE1 sowie des Vorläufermoleküls 18R-hydroxy-Eicosapentaensäure (18R-HEPE) auf die pulmonale Entzündungsreaktion in verschiedenen Pneumoniemodellen zu eruieren, um das therapeutische Potential für die Behandlung der schweren Pneumonie und Sepsis des Menschen zu ermitteln.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gelang der Nachweis der RvE1-Zielrezeptoren auf strukturenbildenden Zellen, sowie auf ortsständigen Zielzellen in humanen Lungenexplantaten. Zur Evaluation anti-inflammatorischer Effekte von RvE1 *ex-vivo* erfolgte die Stimulation von explantiertem humanem Lungengewebe mit Lipopolysaccharid (LPS) oder *Macrophage-activating Lipopeptide-2* (MALP-2). Die Expression der Zielrezeptoren sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren blieben jedoch von der Behandlung mit RvE1 unbeeinflusst.

Anhand von drei murinen Pneumoniemodellen gelang die Abbildung verschiedener Stadien der pulmonalen Entzündungsreaktion *in-vivo* unter therapeutischer Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE nach Pathogeninfektion. Dabei wurden die Effekte der RvE1 bzw. 18R-HEPE Behandlung auf die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion, die Erregerelimination, die pulmonalvaskuläre Schrankenstörung sowie die klinische Ausprägung der Infektion untersucht. In den

untersuchten Modellen der akuten Pneumokokkenpneumonie, der frühen pulmonalen Influenzavirusinfektion und der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung zeigten sich jedoch keine Hinweise auf anti-inflammatorische oder resolutionsfördernde Effekte durch eine Behandlung mit RvE1.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine Behandlung allein mit RvE1 oder seiner Vorstufe 18R-HEPE keinen ausreichenden Effekt auf klinisch relevante bakterielle oder virale Lungeninfektionen wie die Pneumokokkenpneumonie oder die Influenzaviruspneumonie des Menschen ausübt.

Somit besteht weiterhin ein Bedarf an alternativen Wirkstoffen für eine adjunktive Therapie der schweren Pneumonie und Sepsis des Menschen. In diesem Zusammenhang könnte die Entwicklung stabiler Lipidmediator-Analoga, die Verwendung strukturverwandter *specialized pro-resolution mediators* (SPM) und die Kombination verschiedener potentiell wirksamer SPM vielversprechend sein.

2 Abstract

Community-acquired pneumonia (CAP) is a major cause of morbidity and mortality ranked fourth in the list of leading causes of death worldwide. Despite specific anti-microbial therapies, implementation of pneumococcal vaccines and constant improvements in intensive care, mortality among hospitalized patients presenting with CAP still ranks between 10 - 20 %. In cases of severe CAP (sCAP), inadequate or excessive activation of pulmonary innate immune system may contribute to the development of acute lung injury leading to sepsis and multi-organ failure. With the emergence of multi-drug resistant pathogens, the development of novel adjuvant therapy-regimes selectively promoting CAP resolution by limiting excessive inflammation appears promising.

Resolution is initiated by specialized pro-resolving mediators, such as the mediator Resolvin, which has dual anti-inflammatory and pro-resolving properties. In various murine models of peritoneal, intestinal or other local inflammations, Resolvin E1 (RvE1) limits the influx of neutrophils by promoting apoptosis and the removal of apoptotic neutrophils (efferocytosis) by macrophages. The aim of this study was to elucidate the effects of RvE1 and its precursor molecule 18R-hydroxy-eicosapentaenoic acid (18R-HEPE) on pulmonary inflammation in different models of pneumonia and evaluate their potential as an adjunctive therapy of severe pneumonia and sepsis in humans.

First, using immunohistochemistry RvE1 target receptors were detected on scaffolding cells and on local target cells of pulmonary innate immunity in human lung explants. Next, to evaluate the anti-inflammatory effects of RvE1 *ex-vivo*, human lung explants were stimulated with lipopolysaccharid (LPS) or macrophage-activating lipopeptide-2 (MALP-2). However, expression of the target receptors and the release of pro-inflammatory mediators remained unaffected by RvE1 treatment.

Second, the therapeutic effects of RvE1 or 18R-HEPE were investigated *in-vivo* at different stages of pulmonary inflammation in three different models of murine pneumonia regarding local and systemic inflammation, pathogen elimination, lung permeability and clinical outcome. However, no anti-inflammatory effects of RvE1 or 18R-HEPE were detected, neither in the model of acute pneumococcal pneumonia, nor in the model of mild influenza virus infection. Furthermore, RvE1 did not promote resolution of pneumococcal pneumonia after antibiotic therapy.

Conclusively, the results of this study suggest, that treatment with RvE1 or its precursor molecule 18R-HEPE alone, is not sufficient to ameliorate bacterial or viral pneumonia. Thus, there is still an urgent need for alternative adjunctive agents for the therapy of severe pneumonia and sepsis in humans. Here, the development of stable lipid mediator analogs and the use of structurally related specialized pro-resolution mediators (SPM) appears promising.

3 Einleitung

3.1 Ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (*community acquired pneumonia*, CAP) ist weltweit die am häufigsten diagnostizierte Infektionskrankheit (1). Dabei fallen unter den Begriff der CAP alle im privaten oder beruflichen Umfeld erworbenen Pneumonien immunkompetenter Patienten, welche innerhalb der ersten 48 Stunden eines Krankenhausaufenthalts erstmals erfasst wurden. Die CAP steht an vierter Stelle der 10 häufigsten Todesursachen weltweit und stellt in Schwellenländern sogar die häufigste Todesursache dar (2). In Deutschland wird die Inzidenz auf 3-10 pro 1000 Einwohner pro Jahr geschätzt (3, 4). Besonders häufig sind ältere Menschen über 65 oder Kinder unter fünf Jahren von einer Pneumonie betroffen. Jährlich versterben über 1 Millionen Kinder an den Folgen einer Pneumonie, welche somit für ca. 16% der Kindersterblichkeit unter 5 Jahren verantwortlich ist (5, 6).

Neben Alter und männlichem Geschlecht begünstigen weitere Risikofaktoren wie Rauchen, chronisch-obstruktive Atemwegserkrankungen, kongestive Herz- und Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus, sowie kürzlich zurückliegende virale und bakterielle Atemwegsinfektionen die Entstehung einer ambulant erworbenen Pneumonie (7, 8).

Pathophysiologisch wird die CAP als akute Infektion des Alveolarraums und/oder des interstitiellen Lungenparenchyms, sowie der angrenzenden Organe definiert (9, 10). Das klinische Bild einer „klassischen“ Pneumonie ist gekennzeichnet durch ein plötzliches Krankheitsgefühl mit febrilen Temperaturen, vermehrtem produktivem Husten, purulentem Sputum und Kurzatmigkeit (11). Als relevante Begleitsymptome können Bewusstseinsstörungen und Verwirrtheit auftreten (3, 6). Schwere Verlaufsformen (*severe CAP*, *sCAP*) führen mitunter zum respiratorischen Versagen, mit konsekutivem septischem Schock und Multiorganversagen mit potentiell tödlichem Ausgang (6, 11). In der körperlichen Untersuchung imponieren ein hyposonorer Klopfschall oder ein verstärkter Stimmfermitus als klinische Korrelate des umschriebenen pneumonischen Infiltrates. Auskultatorisch treten feinblasig klingende Rasselgeräusche in Erscheinung (11). Ferner kann in der Röntgenthoraxaufnahme das Infiltrat als Teilverschattung nachgewiesen werden (3, 6). Unter Einbeziehung einfacher klinischer Parameter kann mit Hilfe des CRB-65-Index der Schweregrad einer CAP eingeschätzt werden. Vor allem aber bildet er die Entscheidungsgrundlage, ob eine ambulant erworbene Pneumonie ambulant, stationär oder intensivmedizinisch behandelt werden muss (12).

Die CAP wird am häufigsten durch Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, *S. pn*) ausgelöst (10), gefolgt von *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Viren (Influenza-A- und -B-, Parainfluenza-, Adenoviren und Respiratory Syncytial Virus), *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella spp.*, *Moraxella catarrhalis* und *Staphylococcus aureus* (13, 14).

Zur Induktion einer spezifischen Immunität und Reduktion der Inzidenz und Morbidität invasiver Pneumokokkenerkrankungen, stehen derzeit zwei Pneumokokkenimpfstoffe zur Verfügung, deren Wirksamkeit jedoch begrenzt bleibt (14, 15). Der auf Kapselpolysacchariden basierende Impfstoff PNEUMOVAX 23® (MSD Sharp & Dohme GmbH) ist lediglich für Erwachsene und Kinder älter als zwei Jahre, welche eine Prädisposition für invasive Pneumokokkeninfektionen aufweisen, empfohlen und deckt die 23 wichtigsten Serotypen ab ((15, 16), RKI-STIKO-Empfehlungen). Zur Induktion einer suffizienten Immunreaktion von Kindern im Alter von 2 bis 24 Monaten steht der Konjugatwirkstoff Prevenar 13® (Pfizer) zur Verfügung, welcher sich gegen die Kapselantigene der 13 häufigsten Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* in dieser Altersgruppe richtet (11, 14, 17). In Folge des breiten Einsatzes von Pneumokokkenvakzinen konnte die Anzahl schwerverlaufender Infektionen bei Kleinkindern und Patienten über 65 Jahren signifikant reduziert werden (18, 19).

Vergleichbar hierzu stehen auch zur Prävention von Influenzavirus-induzierten Pneumonien Impfstoffe zur Verfügung. Hierzu erfolgt die Genotypisierung von aktuell zirkulierenden Influenza-A-Virusstämmen (IAV) in Referenzlaboren, wie dem Robert-Koch-Institut in Deutschland. Global betrachtet ist hierfür die WHO zuständig. Auf Grundlage der erhobenen Daten erfolgt zu Beginn des Jahres die Entwicklung eines Impfstoffes für die kommende Influenzasaison (20). Im Falle einer Pandemie kommt es zusätzlich zur schnellstmöglichen Entwicklung eines passenden Impfstoffs gegen neue IAV-Stämme (21). Neben der saisonalen Impfstoffentwicklung stehen leider nur wenige antivirale Medikamente zur Prophylaxe oder Therapie von IAV-Infektionen zur Verfügung. M2-Ionenkanalhemmer wie Amantadin oder Rimantadin hemmen beispielsweise die Freisetzung des Virusgenoms in der Wirtszelle und unterbinden somit den Replikationszyklus (21). Eine weitere antivirale Wirkstoffklasse stellen die Neuraminidasehemmer wie Oseltamivir und Zanamivir dar, welche die Liberation von IAV aus der zuvor infizierten Wirtszelle unterbinden (22). Nur durch einen möglichst frühen Therapiebeginn mit den beschriebenen Wirkstoffgruppen kommt es zur Abmilderung und bestenfalls suffizienter Eindämmung einer IAV-Infektion. So werden trotz vorhandener Impfstoffe und Medikamente jährlich global drei bis fünf Millionen schwere IAV-Infektionen gemeldet, von welchen allein in den USA 29.000 bis 65.000 tödlich enden (23).

Unter Einbeziehung der lokalen Resistenzlage kommen vor allem β -Laktame, Fluorochinolone, Makrolide und Tetracykline zur antimikrobiellen Therapie bakteriell bedingter Pneumonien zur Anwendung (11). Obwohl der spezifische Erregernachweis in Blutkulturen oder Sputum nur bei 30 - 60 % der Patienten mit CAP gelingt, sollte dieser aufgrund der zunehmenden Resistenzentwicklung unbedingt vor Beginn der kalkulierten Antibiotikabehandlung erfolgen. Dabei richtet sich die Resistenz von *S. pneumoniae* und anderer Erreger vornehmlich gegen β -Laktam-Antibiotika, Makrolide und Fluorchinolone (14). Zeigen sich Pneumokokken resistent gegenüber mehr als drei verschiedenen Antibiotikaklassen, spricht man von multiresistenten Erregerstämmen. Dies trifft derzeit weltweit auf 20-30% der Isolate von *S. pneumoniae* zu (24). Die Resistenzlage ist hierbei regional unterschiedlich. In Anbetracht der steigenden internationalen Mobilität und Verbreitung multiresistenter Erreger ist weltweit mit einer zunehmenden Resistenzentwicklung von *S. pneumoniae* zu rechnen. Zudem hat sich trotz Weiterentwicklung der supportiven medizinischen Intensivtherapie sowie des Einsatzes von Vakzinen die durch CAP induzierte Sterblichkeitsrate seit Einführung der Antibiotikatherapie in den 1930er Jahren nicht reduziert. Weiterhin versterben circa 10-20% der stationär aufgenommenen Patienten mit Pneumonie (3, 25, 26). Daher sind weitere Forschungsbemühungen zum Verständnis der Pathophysiologie der CAP notwendig. Insbesondere der Entwicklung adjunktiver Therapiestrategien kommt hierbei große Bedeutung zu.

3.2 Streptococcus pneumoniae

Pneumokokken sind circa 1 μm lange, Gram-positive, ovale bis lanzettförmige Bakterien, die sich meist paarig (Diplokokken) anordnen (Abb. 1A). Sie gehören zur Gruppe der α -hämolyisierenden Katalase-negativen Streptokokken und zeichnen sich unter anderem durch ihre Gallelöslichkeit und Optochinempfindlichkeit aus. Die Unterscheidung der rund 90 verschiedenen Pneumokokkenserotypen erfolgt anhand ihrer unterschiedlichen Kapselpolysaccharide. 80% der invasiven Pneumokokkeninfektionen werden durch circa 20 der 90 Serotypen verursacht (24, 27, 28). Dabei verfügt *Streptococcus pneumoniae* über verschiedene Pathogenitätsfaktoren, welche die Ausbildung einer Pneumonie begünstigen (Abb. 1).

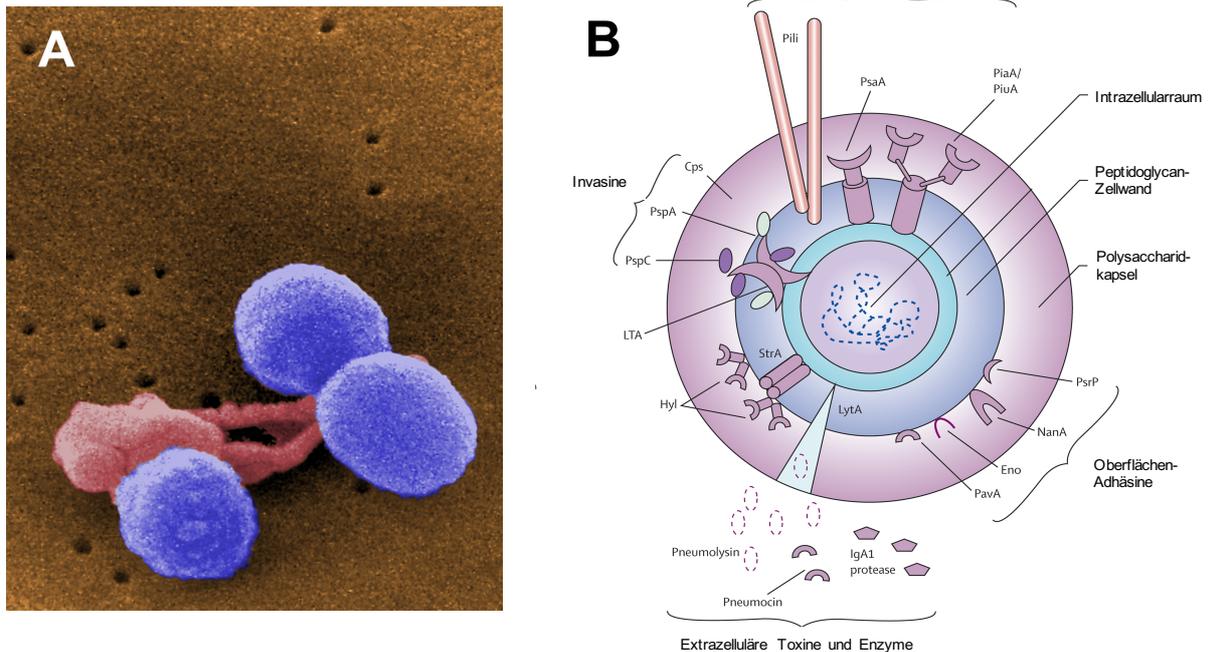


Abb. 1: Aufbau und Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. pneumoniae* in paariger Anordnung (<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=9996>, ID #: 9996 [Stand: 14.05.2019]). **(B)** *S. pneumoniae* verfügt über spezielle Virulenzfaktoren. So wirkt die Polysaccharidkapsel antiphagozytotisch und schützt vor mukosaler Clearance. PspA (*pneumococcal surface protein A*) verhindert durch elektronegative Eigenschaften die Komplement-vermittelte Opsonierung des Erregers, während Invasine wie PspC (*pneumococcal surface protein C*) die Aufnahme in Zellen durch Bindung an humane Immunglobulinrezeptoren erleichtern. Durch Spaltung von zellulären Wirts-Oberflächenmolekülen (wie Glykopeptiden, Lipoproteinen und Oligosacchariden) demaskieren Neuraminidasen (NanA) potentielle Adhäsionsstellen für *S. pneumoniae*. Metall-bindende Transporter wie PsaA (*pneumococcal surface antigen*) schützen *S. pneumoniae* durch Aufnahme von Metallionen (Zink und Magnesium) vor oxidativem Stress. Autolysine (LytA) setzen intrazelluläre Produkte wie Pneumolysin (Ply) frei, welches den Zilienschlag von Bronchialepithelzellen verhindert, die endo-epitheliale Schranke durch Zerstörung der tight-Junctions schädigt und die Freisetzung pro-inflammatorischer Entzündungsmediatoren fördert (Modifiziert nach van der Poll (6), mit Zustimmung des Autors).

Pneumokokken besiedeln physiologisch die nasopharyngeale Schleimhaut bereits in den ersten Lebensjahren. So kolonisiert *S. pneumoniae* den Nasopharynx bei über 50% der dreijährigen Kinder, während verschiedene Serotypen bei 8% der Erwachsenen nachgewiesen werden konnten (29). Dabei ist die Besiedelung des Nasopharynx durch Pneumokokken nicht zwingend mit einer invasiven Infektion verbunden. Bei engem Kontakt ist eine Transmission des Erregers durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch möglich. Zu einer Pneumonie kommt es, wenn Erreger durch Mikroaspiration oder direkte Invasion, begünstigt durch Störungen

der lokalen oder systemischen Abwehr, in den normalerweise sterilen unteren Respirationstrakt gelangen (6, 27, 30).

3.3 Influenzavirus

Influenzaviren gehören zur Gruppe der Orthomyxoviren (Abb. 2A) und lassen sich in die Typen A, B, C und D unterteilen. Als Hauptursache viral-bedingter respiratorischer Erkrankungen hospitalisierter Patienten über 16 Jahre kommt vor allem Influenzaviren des Typs A und B eine besondere klinische Relevanz zu (23). Anhand von Unterschieden in den Oberflächenproteinen Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) können Influenza-A-Viren (IAV) in weitere Subtypen unterteilt werden. Aktuell sind 18 verschiedene Hämagglutinin- (H1-H18) und 11 Neuraminidase-Subformen (N1-N11) des Influenza-A-Virus beschrieben, von welchen die saisonal zirkulierenden Subtypen H1, H2, H3, N1 und N2 als besonders humanpathogen gelten (23).

Wild- und Seevögel bilden den Hauptanteil des natürlichen Reservoirs für Influenzaviren. Die Virulenz der IAV ist vor allem auf die Variabilität des viralen Genoms zurückzuführen. Bei Infektionen außerhalb des natürlichen Reservoirs wirkt ein anderer Selektionsdruck auf das Virus ein, der neue Mutationen begünstigt. Hauptverantwortlich hierfür ist die fehleranfällige virale RNA-abhängige RNA-Polymerase, die bei der Replikation aufgrund fehlender Reparaturmechanismen (*proofreading*) etwa einen Fehler pro 10^4 synthetisierter Basen einführt (31-33). Durch die so entstandenen Punktmutationen (*Antigendrift*) kommt es vor allem zur Veränderung der Oberflächenproteine H und N, welche aufgrund des ständigen Kontakts mit Wirtsantikörpern einem besonders hohen Selektionsdruck ausgesetzt sind (33). Diese natürliche Evolution des IAV kann zur Entstehung neuer Stämme beitragen, welche trotz Impfung neue Epidemien auslösen können (34, 35).

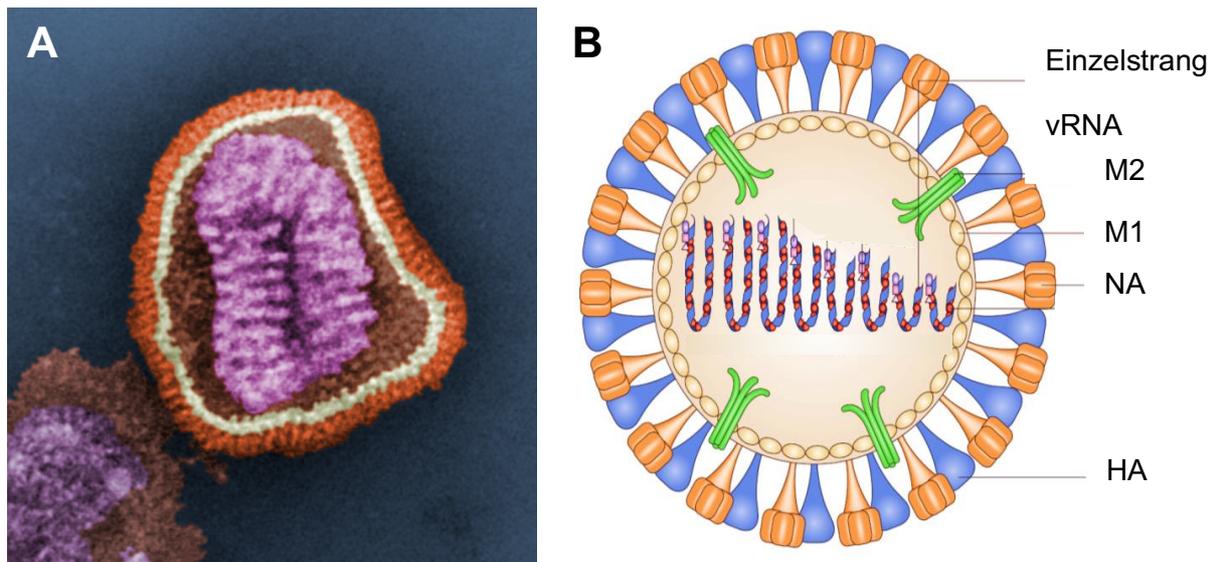


Abb. 2: Aufbau und Virulenzfaktoren des Influenza-A-Virus.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von H1N1 (<https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=10073>, ID #: 10073 [Stand: 14.05.2019]). (B) Die Virulenzfaktoren von H1N1 begünstigen die virale Replikation. So kommt es durch die Anheftung von Hämagglutinin (HA) an Sialinsäuren der Wirtszelle zur rezeptorvermittelten Endozytose des Virus. Über den M2-Kanal (M2) gelangen Protonen in das Virusinnere, was zur verminderten Interaktion zwischen viraler RNA und M1-Protein führt. Dadurch wird vRNA in das Zytoplasma freigesetzt. Nach Replikation des viralen Genoms kommt es zur Abknospung von neuen Viruspartikeln an der Wirtszellmembran. Nach Abtrennung der Sialinsäuren durch Neuraminidasen (NA) erfolgt die Freisetzung der Virionen (Modifiziert nach: Nelson and Holmes (36), mit Zustimmung des Autors).

Eine weitere Möglichkeit der Veränderung der viralen Antigenität bietet der sogenannte *Antigen shift*. Aufgrund der Segmentierung des viralen Genoms kann es in Folge einer gleichzeitigen Infektion einer Wirtszelle mit mehreren IAV Subtypen zum *Reassortment* einzelner oder mehrerer Gensegmente kommen (33, 34, 37). Sind H- und/oder N-Segmente von diesen Reassortierungen betroffen, kommt es zur Entstehung neuer Subtypen. Besteht gegen die neuartigen Antigenstrukturen keine oder eine nicht ausreichende Wirtsimmunität kann dies zum Ausbruch von schweren Pandemien führen (35). Neben der Variabilität des Virusgenoms besitzt IAV auch andere Pathogenitätsfaktoren (Abb. 2B), welche die Virulenz des Erregers maßgeblich bestimmen (38, 39).

Influenza-A-Viren sind hochgradig ansteckend, da sie durch Aerosol- und Tröpfcheninfektion (Aerogentransmission), Kontakttransmission oder Schmierinfektion übertragen werden können. Durch Adhäsion des HA-Proteins an Sialinsäuren der Wirtszelle und anschließender Fusion mit der Wirtszellmembran infizieren IAV zumeist Epithelzellen des oberen Respirationstrakts (Nasopharynx). Von dort breiten sich die Erreger, je nach Virustyp, in den unteren Respirationstrakt aus und verursachen eine

primär virale, interstitielle, seltener auch eine partiell hämorrhagische Pneumonie (34, 36).

3.4 Immunabwehr der Lunge

Die menschliche Lunge ist als Ergebnis ihrer täglichen Inhalation von circa 10.000 Litern Luft pro Tag einer Vielzahl von Krankheitserregern und Schadstoffen ausgesetzt (40). Daher besitzt sie neben Zilienschlag und Schleimproduktion, zur mechanischen Abwehr, ein breites Spektrum von zellulären und humoralen Abwehrmechanismen, sowie ein komplexes Erkennungssystem zur Detektion eindringender Pathogene (40-42).

Die Schleimhaut des luftleitenden Systems besteht aus einem respiratorischen Epithel, welches aus Basalzellen, Flimmerepithelzellen und Intermediärzellen besteht und von endokrinen Zellen, Becherzellen und Club-Zellen durchsetzt ist. Das Bronchialepithel fungiert als wichtige Schnittstelle zwischen Umwelt und Wirt und besitzt vielfältige Eigenschaften zur initialen Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Zu den Hauptabwehrkomponenten des Bronchialepithels gehört beispielsweise die mukoziliäre Clearance, welche den zielgerichteten Abtransport von mit Mukus behafteten Partikeln aus den unteren Atemwegen in den Rachen ermöglicht (43). Der Mukus enthält verschiedene antimikrobielle Peptide und wird von Becherzellen sowie intraepithelialen Drüsen gebildet und freigesetzt. Anschließend wird er mit Hilfe synchroner wellenförmiger Zilienbewegungen des mehrreihigen hochprismatischen Flimmerepithels abtransportiert (11).

Die kleinste funktionelle Untereinheit der gasaustauschenden Abschnitte des Respirationstrakts bilden die traubenförmig angeordneten Alveolen, welche durch Septen voneinander getrennt sind. Die Alveolarsepten bestehen aus einem Bindegewebsgerüst aus Fibroblasten, Kollagenen und elastischen Fasern und sind von einem dichten Netz an Kapillaren durchzogen. Die Alveolen selbst sind von einer einreihigen Schicht aus Alveolarepithelzellen ausgekleidet. Circa 95% der Alveolarwand werden von flachen Alveolarepithelzellen Typ I (Deckzellen) gebildet, welche für den Gasaustausch verantwortlich sind. Zwischen ihnen finden sich einzelne, größere Alveolarepithelzellen Typ II (Nischenzellen) (44), welche Surfactant produzieren (45). Dieser Phospholipidfilm überzieht die gesamte Alveolarwand, verringert in erheblichem Maße die Oberflächenspannung und wirkt somit dem Kollabieren der Lungenbläschen entgegen (46, 47). Alveolarepithelzellen, Blutkapillaren und Basalmembran bilden zusammen die Blut-Luft-Schranke, welche durch ihre geringe Dicke (0,5 µm) und ihre große Kontaktfläche (50-120 m²) einen

ausreichenden Gasaustausch von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid ermöglicht (44, 48).

Können Mikroorganismen mit einem aerodynamischen Durchmesser von $<5 \mu\text{m}$ trotz mechanischer Abwehrmechanismen bis in den Alveolarraum vordringen, werden sie durch ortsständige Makrophagen der Lunge erkannt. Diese Alveolarmakrophagen sind Teil des angeborenen Immunsystems und besitzen eine hohe Phagozytosefähigkeit, sodass sie im Zusammenspiel mit Sufactantproteinen (SP-A, SP-D) und Komplement kleinere Pathogenmengen direkt eliminieren können (49). Neben Makrophagen gehören auch Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen, natürliche Killerzellen, aber auch Epithelzellen zum angeborenen Immunsystem (50). Darüber hinaus werden molekulare Komponenten wie Akute-Phase-Proteine, Komplement, Zytokine und antimikrobielle Produkte (u.a. Defensine, Lactoferrine, Lysozyme) freigesetzt. Das erworbene Immunsystem ist eng mit dem angeborenen Immunsystem vernetzt und besteht aus B- und T-Lymphozyten. Die Erkennung von Antigenen und die Sekretion von Zytokinen durch antigenpräsentierende Zellen induziert die Freisetzung von Zytokinen (51). Die Hauptaufgabe von B-Lymphozyten, welche sich zu Plasmazellen differenziert haben, besteht in der Produktion antigen-spezifischer Antikörper. T-Lymphozyten lassen sich in zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und regulatorische T-Zellen unterteilen (52). T-Helferzellen fungieren als wichtiges Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem und können durch die Produktion verschiedener Zytokine (z. B. IL-2) sowohl die zelluläre, als auch die Antikörpervermittelte Immunantwort (durch Stimulation von Plasmazellen) beeinflussen. Zytotoxische T-Zellen erkennen hingegen vorrangig virusinfizierte Zellen, welche sie durch induzierte Apoptose direkt abtöten. Nach Antikörperkontakt kommt es sowohl bei B- als auch bei T-Lymphozyten zur Bildung sogenannter Gedächtniszellen, welche bei wiederholtem Antigenkontakt eine sofortige spezifische Immunantwort ermöglichen (21).

3.4.1 Angeborenes Immunsystem

Eine wichtige Aufgabe des angeborenen Immunsystems liegt in der Erkennung verschiedener Mikroorganismen durch Pathogen-Erkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR). Die PRRs werden von verschiedenen Zellen, darunter auch von Makrophagen, dendritischen Zellen, Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert. Diesen Rezeptoren ist gemein, dass sie hochkonservierte Antigenstrukturen der Pathogene, so genannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), wie z. B. Lipopolysaccharide (LPS), Glykopeptide (u. a. MALP-2),

Lipoteichonsäure oder Lipoproteine, detektieren und daraufhin hochspezifische, zelluläre Signalkaskaden initiieren. Zu den PRRs gehört insbesondere die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLR). Sie bildet die wichtigste Gruppe von Transmembranrezeptoren, die der Erkennung vieler unterschiedlicher Mikroorganismen dienen. Zu den weiteren PRRs zählen die zytosolischen *NOD-like* Rezeptoren, die *RIG-like* Rezeptoren sowie weitere zytosolische DNA-Sensoren (21, 53).

PAMPs werden in der Lunge von ortsständigen Alveolarmakrophagen erkannt. Daraufhin erfolgt der intrazelluläre Abbau, der phagozytierten Erregerbestandteile, durch reaktive Sauerstoffverbindungen, antimikrobielle Proteine und Lysozyme. Sezernierte Collectine und Komplementproteine wirken in kleinen Mengen als physiologische Abwehrmoleküle, da sie die Phagozytose durch Opsonierung begünstigen. Wird die Phagozytosekapazität der Makrophagen überschritten kommt es zur Ausbildung einer Entzündungsreaktion. Die Aktivierung von Epithelzellen kann sowohl direkt durch Pathogene, als auch indirekt durch Zytokine, welche von inflammatorischen Makrophagen sezerniert werden, erfolgen. Hierdurch kommt es zur vermehrten Produktion antimikrobieller Stoffe und Entzündungsmediatoren, welche den Übertritt von neutrophilen Granulozyten aus dem kapillären Gefäßbett in die Lunge begünstigen. Diese tragen durch Phagozytose, mit Hilfe reaktiver Sauerstoffspezies, antimikrobieller Proteine und degradierender Enzyme zum Abtöten der pathogenen Mikroorganismen bei. Zudem erfolgt die Rekrutierung von weiteren Monozyten aus dem Blut, die sich anschließend im Lungengewebe zu Phagozytose-aktiven Makrophagen differenzieren. Ferner kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, welches Fremdpartikel opsoniert und Entzündungsvorgänge reguliert. Neben den oben beschriebenen Mechanismen kommt es darüber hinaus durch aktivierte Epithelzellen und Makrophagen zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und weiteren Immunzellen entlang von Zytokin- und Chemokingradienten in das Lungengewebe (53).

3.4.2 Zytokine

Zytokine sind meist lösliche, seltener membrangebundene Glykoproteine, die Signaltransduktionswege über extrazelluläre Rezeptoren nutzen und aktivierend oder hemmend auf ihre jeweiligen Zielzellen wirken können (54). Zytokine können ihre Funktion autokrin (auf sich selbst), parakrin (auf benachbarte Zellen) oder endokrin (auf weiter entfernte Zellen) vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine Interleukin (IL)-1 β , IL-18, Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-6, IL-10, IL-12p40,

Interferon (INF)- γ , IFN- α , IL-8, und *Monocyte Chemotactic Protein* (MCP)-1 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF), im Lungengewebe, sowie in Überständen humaner Lungengewebskulturen bestimmt, weshalb ihre jeweiligen Eigenschaften und Funktionen hier kurz erläutert werden.

IL-1 β zählt zu den wichtigsten Zytokinen der frühen pulmonalen Abwehrreaktion nach Infektion mit *S. pneumoniae* und wird hauptsächlich von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen und Endothelzellen produziert. Dabei ist IL-1 β an zahlreichen pro-inflammatorischen Prozessen beteiligt. Durch die Bindung an den IL-1-Rezeptor induziert es die Produktion und Freisetzung der Zytokine IL-6, INF- γ und TNF- α in Makrophagen und anderen Zellen (55). TNF- α wird hauptsächlich von mononukleären Phagozyten gebildet. Ähnlich wie IL-1 β stimuliert TNF- α die Synthese weiterer Zytokine in unterschiedlichen Zellen der angeborenen Immunität. Beide Mediatoren fördern zudem die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und sind somit an der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut beteiligt (56). IL-6 wird von T-Zellen, Makrophagen und Endothelzellen produziert und ist für die Differenzierung von Makrophagen verantwortlich. Zudem regt es die Bildung von Akute-Phase-Proteinen (wie C-reaktives Protein (CRP)) in der Leber (50) an und stimuliert daneben die Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark (57). Hierzu konträr besitzt das Zytokin IL-10 immunmodulatorische und immunsuppressive Wirkungen. Es unterdrückt die Freisetzung von Zytokinen und limitiert darüber hinaus die zytotoxische und Antigen-präsentierende Wirkung von Monozyten und die Liberation pro-inflammatorischer Zytokine. Die Bildung von IL-12 und IFN- γ erfolgt beispielsweise von Lymphozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen. Beide Mediatoren fördern die Differenzierung und Proliferation lymphatischer Zellen. IFN- α unterdrückt die Bildung von Chemokinen und wirkt sich somit negativ auf die pulmonale Immunantwort aus, indem es die Anfälligkeit für bakterielle Superinfektionen nach einer Influenza-A-Virusinfektion erhöht (58). Darüber hinaus fördert es die Proliferation von NK-Zellen und deren Zytotoxizität (59). Chemokine sind kleine Proteine (von ca. 75–125 Aminosäuren) und stellen eine Untergruppe der Zytokine dar. Sie wirken chemotaktisch und veranlassen Zellen (welche entsprechende Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimieren) dazu, sich dem chemischen Gradienten folgend dem Ort der höchsten Chemokinkonzentration zu nähern. Ferner stimulieren Chemokine die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Hierdurch wird die endotheliale-leukozytäre Adhäsion stimuliert und anschließend die Emigration der Leukozyten aus dem Blut in das entzündete Gewebe in Gang gesetzt (60). MCP-1 und IL-8 werden von unterschiedlichen Zelltypen wie Lymphozyten, Monozyten oder Fibroblasten produziert. Während MCP-1

chemotaktisch auf Zellen wie Monozyten, Lymphozyten sowie basophile und eosinophile Granulozyten wirkt, veranlasst IL-8 hauptsächlich die Migration neutrophiler Granulozyten aus dem Blut in benachbarte Zellverbände (61).

Die Ausbildung einer physiologischen, pulmonalen Entzündungsreaktion ist entscheidend für die effektive Erregerabwehr. Andererseits können überschießende Inflamationsprozesse zu einer Lungengewebschädigung beitragen und somit die Pathophysiologie einer Pneumonie entscheidend beeinflussen. Prognostisch spielt neben der Pathogenität der ursächlichen Erregers, daher auch der Ausprägungsgrad der pulmonalen Inflamationsreaktion eine wichtige Rolle (49). Ferner trägt die pulmonale Hyperinflammation entscheidend zur Ausprägung einer pulmonalen Schrankenstörung im Rahmen eines akuten Lungengewebschadens bei (49). Speziell während Infektionen mit dem pandemischen Influenzavirus A/H1N1 wurden sogenannte Zytokinstürme (*cytokine storms*) bei Patienten mit schweren Krankheitsverläufen beobachtet, welche mutmaßlich den letalen Ausgang der Infektion bedingten (62, 63). Bei dieser potentiell tödlichen Überreaktion des Immunsystems kommt es zu einer massiven proinflammatorischen, nicht mehr eindämmbaren Immunantwort. Schließlich resultiert der Übertritt von Zytokinen und Chemokinen in den Blutkreislauf in Multiorganversagen (64).

In Anbetracht dessen scheint die Ergänzung des bestehenden Therapiekonzepts der Erregerelimination durch Antibiotikatherapie um adjunktive Therapeutika aussichtsreich, um eine schädliche, exzessive Inflamationsreaktion zu limitieren und ein positives Outcome der CAP zu begünstigen (65, 66).

3.5 Resolution der Inflammation

Die akute Entzündungsantwort lässt sich allgemein in die Initiationsphase sowie die Resolutionsphase unterteilen, von denen letztere ursprünglich als rein passiver Dilutionseffekt angesehen wurde. Nach der Entdeckung von Lipidmediatoren (wie zum Beispiel Resolvinen, Lipoxinen, Protektinen oder Maresinen) mit resolutionsfördernden Fähigkeiten, welche aus essentiellen *omega-3* Fettsäuren (n-3 *polyunsaturated fatty acids*, n-3 PUFAs) synthetisiert werden, wurde diese These weitestgehend verworfen. Resolution wird inzwischen nicht länger als Zustand der langsam abklingenden Inflammation verstanden, sondern stellt einen aktiv regulierten Prozess dar, bei dem eine neue Klasse von Mediatoren freigesetzt wird. Diese Mediatoren haben einen aktiven Einfluss auf den Resolutionsprozess, da sie nicht nur pro-inflammatorische Stoffe antagonisieren, sondern gleichzeitig die Auflösung der Inflammation und die Wiederherstellung der Homöostase fördern (67-69). Die

schnellstmögliche Wiederherstellung der Integrität des Lungenparenchyms ist bei einer Lungenentzündung zwingend erforderlich, um den lebenswichtigen Gasaustausch in der Lunge zu ermöglichen.

Initial wichtig zu Beginn einer Infektion ist die aktive Bekämpfung der Pathogene. Während der ersten Phase der Entzündung werden dafür Leukozyten durch chemoaktive Stoffe, wie zum Beispiel pro-inflammatorische Lipidmediatoren, aber auch Chemokine und Zytokine, an den Ort der Entzündung gelockt (8, 70, 71). Neutrophile Granulozyten fungieren als Frontlinie der angeborenen Immunabwehr (*first line defenders*) und migrieren als Erste aus dem Blut in das infizierte Gewebe. Im Laufe der anhaltenden pro-inflammatorischen Immunantwort folgen ihnen Monozyten, die anschließend zu Makrophagen differenzieren. Ihre Aufgabe liegt hauptsächlich in der Beseitigung apoptotischer Zellen. Anhand von zellulären Oberflächenrezeptoren wie $\alpha\beta3$ -Integrinen, *cluster of differentiation 36* (CD36) und Phosphatidylserinrezeptoren erkennen Makrophagen apoptotische neutrophile Granulozyten und phagozytieren diese. Dieser Prozess wird Efferozytose genannt und stellt den wichtigsten Mechanismus der zellulären Resolution dar (72, 73).

Die in der Initialphase gebildeten pro-inflammatorischen Lipidmediatoren, wie Leukotriene (LT) und Prostaglandine (PG), werden über Cyclooxygenase-, Lipoxigenase- und Cytochrom P450-abhängige Metabolisierungsstufen aus Arachidonsäure, dem Hauptvertreter der omega-6 PUFAs gebildet und in erhöhten Konzentrationen freigesetzt. Ist eine mikrobielle Infektion wirksam bekämpft worden, wird die Auflösungsphase (Resolution) aktiv eingeleitet. Durch den Einfluss von PG_{E2} und PG_{D2} wird ein Klassenwechsel der exprimierten Lipidmediatoren induziert. Hierdurch verschiebt sich das pro-inflammatorische Lipidmediatorprofil hin zu einer verstärkten Produktion resolutionsfördernder Mediatoren (*specialized pro-resolution mediators*, SPM) wie zum Beispiel Resolvinen und Protectinen, welche aus omega-3 PUFAs gebildet werden. Diese SPM-Lipidmediatoren unterbinden nun die weitere Rekrutierung von Entzündungszellen und initiieren die Auflösung der Entzündungsreaktion (74).

So konnten Mayer et al. bereits in mehreren experimentellen und klinischen Studien zeigen, dass die parenterale Gabe von essentiellen omega-3 PUFAs durch die Verschiebung des Lipidmediatorgleichgewichts im Blut von omega-6 hin zu omega-3 Metaboliten einen positiven Effekt auf die Entzündungsreaktion und den Verlauf des akuten Lungenversagens (ALI) hat (75-78). Wurde die Biosynthese von omega-3 Lipidmediatoren durch eine genetische Veränderung oder pharmakologische Intervention gestört, hatte dies negative Auswirkungen auf die Resolution und verzögerte die Wiederherstellung der Gewebshomöostase (79-81).

3.6 Resolvin E1

Der Begriff Resolvine, ursprünglich abgeleitet von *resolution phase interaktion products*, bezeichnet eine Gruppe von Lipidmediatoren, die kürzlich als Produkte von omega-3 PUFA-Vorläufermolekülen identifiziert werden konnten. Resolvine der E-Serie werden alle aus der essentiellen omega-3 Fettsäure Eicosapentaensäure (EPA) gebildet und wurden ursprünglich *in-vivo* aus murinen sich-selbstlimitierenden Exsudaten isoliert (82). Bisher wurden neben Resolvin E1 (RvE1), auf welches in dieser Arbeit näher eingegangen wird, auch Resolvin E2 und Resolvin E3 beschrieben.

Die Biosynthese von RvE1 (Abb. 3) erfolgt entweder durch die Aspirin-induzierbare Cyclooxygenase (COX) 2 oder durch mikrobielle Cytochrom P450 Enzyme. So wird in diesem ersten Schritt der transzellulären Synthese EPA durch COX-2, die vor allem von Endothelzellen exprimiert wird, durch Konversion des C²⁰-Kohlenstoffatoms (C_{20:5}) in 18R-Hydroxyeicosapentaensäure (18R-HEPE)) umgewandelt. Hierbei acetyliert Aspirin die COX-2, welche nun keine PG mehr generieren kann, jedoch 18R-HEPE produziert (69, 83). Ebenso können mikrobielle p450 Cytochrome EPA in 18R-HEPE umwandeln (82, 84, 85). Im sich anschließenden Schritt entsteht aus dem freigesetzten 18R-HEPE durch die Lipoxygenase-5 (LOX-5) benachbarter neutrophiler Granulozyten ein 5(6)-Epoxid-enthaltendes Intermediärmolekül, welches anschließend hydrolytisch in bioaktives RvE1 umgewandelt wird (84, 85). Unter Verwendung einer Kombination von Gaschromatographie-Massenspektroskopie- und Flüssigkeits-Tandem-Massenspektroskopie-basierter Lipidomics Analyse wurde RvE1 als *5S,12R,18R-Trihydroxy-6Z,8E,10E,14Z,16E-EPA* charakterisiert und die stereochemische Grundstruktur dieser Verbindung anschließend mittels organischer Synthese bestätigt (82, 86).

Die Expression der für die Biosynthese von RvE1 verantwortlichen Enzyme COX-2 und LOX-5 unterscheidet sich im normalen und entzündeten Gewebe. So ist COX-2 in normalem Gewebe fast nicht nachweisbar. Am Ort der Entzündung kommt es jedoch zu einer schnellen Induktion der Genexpression (87). 5-LOX ist in ruhenden Zellen inaktiv. Die enzymatische Aktivität von 5-LOX wird jedoch in entzündeten Geweben induziert, wobei mechanistisch ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration oder eine Phosphorylierung von 5-LOX eine wichtige Rolle spielt (88, 89).

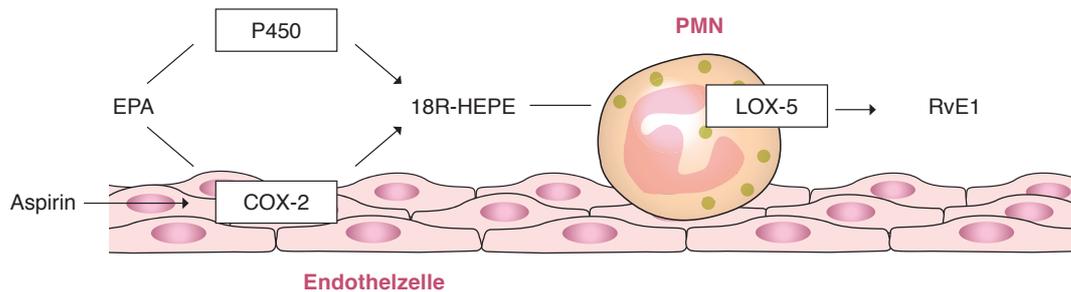


Abb. 3: Transzelluläre Synthese von RvE1 durch Endothelzellen und neutrophile Granulozyten (PMN).

Die Konversion von Eicosapentaensäure (EPA) zu 18R-Hydroxyeicosapentaensäure (18R-HEPE) erfolgt entweder durch die Aspirin-acetylierte Cyclooxygenase (COX) 2 oder durch mikrobielle Cytochrom P450 Enzyme. Aus dem nun freigesetzten 18R-HEPE entsteht im nächsten Schritt durch die Lipoxigenase-5 (LOX-5) benachbarter neutrophiler Granulozyten ein 5(6)-Epoxid-enthaltendes Intermediärmolekül, welches anschließend hydrolytisch in bioaktives RvE1 umgewandelt wird.

Eine pharmakologische Inhibition oder genetische Deletion von COX-2 oder LOX-5 verlängert den Resolutionsprozess oder blockiert die Beseitigung neutrophiler Granulozyten (87, 90). Als Abkömmling der omega-3 PUFA wird EPA nicht im menschlichen Körper produziert, kann aber durch die Nahrung aufgenommen oder durch systemische Administration zugeführt werden. Dies induziert die vermehrte Produktion von RvE1 (85).

Nach bisherigen Erkenntnissen erfolgt die Inaktivierung von RvE1 über mindestens vier verschiedene zell-spezifische Abbaumechanismen. So stellten Arita et. al die Hypothese auf, RvE1 werde im murinen Lungengewebe hauptsächlich durch eine regionale, spezifische NAD⁺-abhängige Dehydrierung am C¹⁸-Kohlenstoffatom, wie sie zum Beispiel durch die Eicosanoid-Oxireduktase (EOR) 15-Dehydroxy-Prostaglandindehydrogenase erfolgt, zu inaktivem 18-oxo-RvE1 metabolisiert. Hong et al. hingegen beschreiben im Lungengewebe eine erhöhte Bildung von 20-Hydroxy- und 19-Hydroxy-RvE1 durch ω -Oxidation, wogegen 18-oxo-RvE1 nur zu geringerem Prozentanteil gebildet wird. Es ist bekannt, dass spezifische Cytochrom P450-Enzyme Arachidonsäure, Leukotrien B4 (LTB4) und Prostaglandine zu ihren entsprechenden ω -Hydroxy- oder ω -1-Hydroxy-Metaboliten umsetzen. Dies zugrunde legend stellen 20-Hydroxy- und 19-Hydroxy-RvE1 wahrscheinlich ebenfalls Produkte der pulmonalen Cytochrom P450-Aktivität dar (91). Neben dem Abbau im Lungengewebe wird RvE1 auch im peripheren Blut über verschiedene unspezifische Enzyme metabolisiert. Dies geschieht beispielsweise auch durch neutrophile Granulozyten, welche RvE1

hauptsächlich zu 20-Hydroxy-RvE1 umsetzen (91, 92). Dabei existieren jedoch unterschiedliche Angaben hinsichtlich der Bioaktivität von 20-Hydroxy-RvE1 in vergleichbaren murinen Peritonitis-Modellen. Hong et al. verzeichneten eine vergleichbare Aktivität von RvE1 und 20-Hydroxy-RvE1 hinsichtlich der Erhöhung der Phagozytose von neutrophilen Granulozyten durch Makrophagen und Monozyten, Arita et al. zeigten eine verminderte Aktivität von 20-Hydroxy-RvE1 im Vergleich zu RvE1 auf die Hemmung der transepithelialen Migration von neutrophilen Granulozyten (91, 92).

Daneben konnten auch andere RvE1-Stoffwechselprodukte wie 10,11-Dihydro-RvE1 oder 20-Carboxyl-RvE1 identifiziert werden, welche durch ω -1-Hydroxylierung oder durch Reduktion konjugierter Doppelbindungen entstanden (91).

3.6.1 Resolvin-Rezeptoren

Die biologischen Wirkungen von RvE1 werden durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled receptors*, GPCRs) vermittelt. Hierbei spielen der *chemokine receptor-like 1* (auch Chemerinrezeptor 23, ChemR23) und der Leukotrien B₄ (LTB₄)-Rezeptor (BLT-1) eine wichtige Rolle.

ChemR23 ist ein GPCR, der auch als Rezeptor für das chemotaktische Protein Chemerin dient, das vom CMKLR1-Gen in Mensch und Maus kodiert wird (93). ChemR23 wird in Menschen und bei Mäusen von Zellen des angeborenen Immunsystems, vor allem antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC), aber auch auf NK-Zellen exprimiert. Auch von murinen und humanen Endothelzellen wird ChemR23 in hohen Maßen exprimiert, wohingegen CD4-positive T-Helferzellen nur eine geringe Expression aufweisen. Die Interaktion von Chemerin mit ChemR23 fördert die Chemotaxis von APC und unreifen DCs *in-vitro* (94). Im Gegensatz hierzu wird durch die Bindung von RvE1 an ChemR23 die Migration von DCs und die Produktion von IL-12 *in-vivo* (85) unterdrückt und die Phagozytoseaktivität von Makrophagen sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* signifikant gesteigert (90).

Darüber hinaus interagiert RvE1 selektiv mit dem LTB₄-Rezeptor BLT-1. LTB₄, ein von der Arachnoidonsäure (AA) abstammender pro-inflammatorischer Mediator, wird hauptsächlich von aktivierten neutrophilen Granulozyten gebildet. LTB₄ wirkt chemotaktisch auf neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Makrophagen und aktiviert ferner die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und antibakteriellen Granula aus neutrophilen Granulozyten (95-97). Da LTB₄ darüber hinaus auch T-Lymphozyten zur Chemotaxis anregt, schafft es eine funktionelle Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort (98). Die

hohe Affinität gegenüber LTB₄ bewirkt, dass der BLT-1, welcher vorrangig von neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, als Übermittler pro-inflammatorischer Effekte wirkt (90, 99). RvE1 konkurriert jedoch mit LTB₄ um die Bindung an BLT-1 und dämpft durch kompetitive Hemmung die Effekte des LTB₄–BLT-1 Signalwegs (100, 101).

Zusammenfassend vermittelt RvE1 durch selektive Bindung an seine Zielrezeptoren ChemR23 und BLT-1 zugleich anti-inflammatorische und resolutionsfördernde Effekte.

3.6.2 Effekte von RvE1 auf entzündliche Prozesse *in-vitro* und *in-vivo*

3.6.2.1 Anti-inflammatorische Effekte von RvE1

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle in der Erregerabwehr bakterieller und viraler Infektionen. Trotzdem kann eine unkontrollierte Aktivierung oder ein verzögerter Abtransport dieser Granulozyten vom Entzündungsgeschehen zu zusätzlichem Gewebeschaden führen und die Ausbildung entzündlicher Erkrankungen der Lunge begünstigen (83, 102-105). Die Limitierung der unkontrollierten Aktivierung und Akkumulation von neutrophilen Granulozyten ist ein wichtiger Schritt der Resolutionsphysiologie. Es gibt eine Reihe von Studien, die RvE1 eine prominente Rolle in der Regulation von neutrophilen Granulozyten zuschreiben (69, 82, 85, 86, 90, 91, 106, 107). Dabei konnte gezeigt werden, dass RvE1 den oxidativen Burst blockiert (108) und die pro-inflammatorischen Chemokin-Signalkaskaden durch Regulierung von Scheinrezeptoren (decoy receptors) terminiert (109). Zudem erhöht RvE1 die Apoptoserate in neutrophilen Granulozyten (85) durch Blockade von NF-κB-Signalwegen und ist durch die Beeinflussung der Signaltransduktion intrazellulärer Kinasen an der Terminierung der akuten Inflammation beteiligt (110).

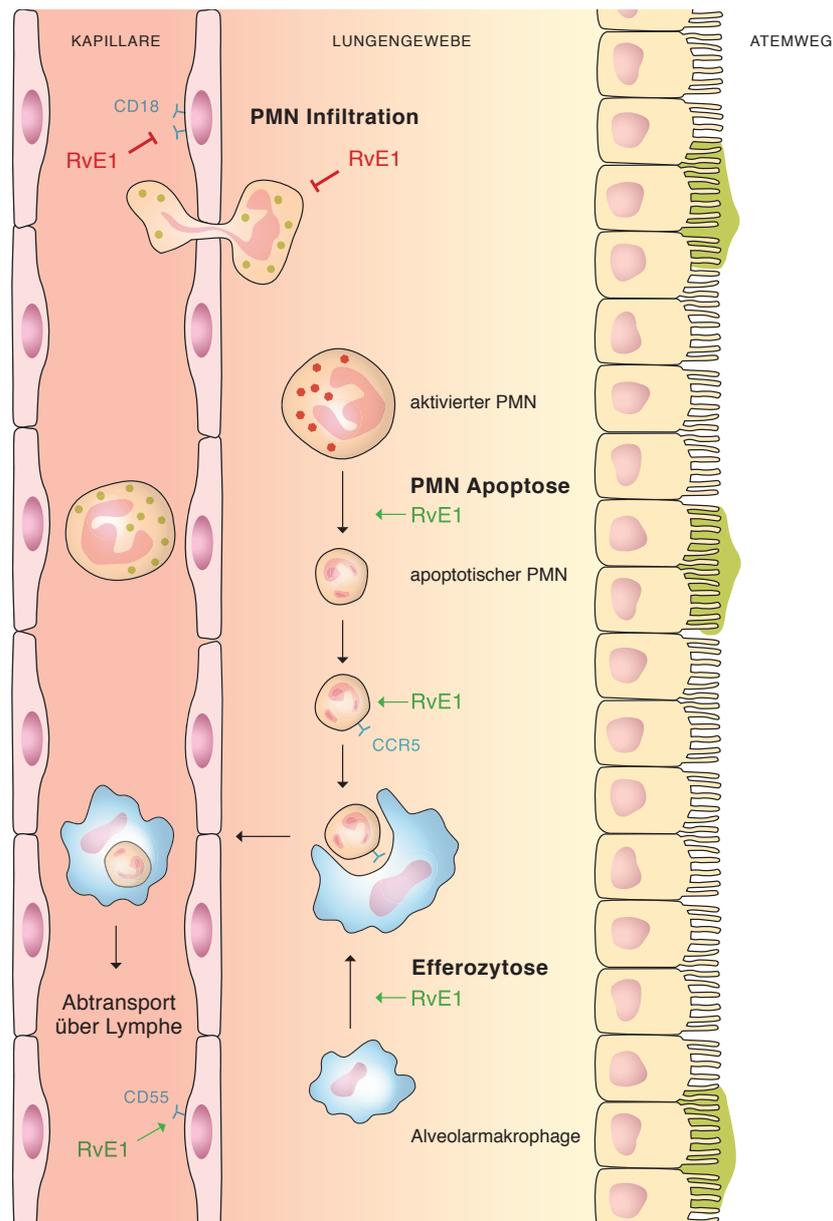


Abb. 4: Zelluläre anti-inflammatorische und resolutions-fördernde Effekte von RvE1.

RvE1 inhibiert die Expression von neutrophilen Adhäsionsmolekülen wie CD18 und vermindert die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten (PMN) an den Entzündungsort. Durch Blockierung von Überlebenssignalkaskaden aktivierter PMN steigert RvE1 die Apoptoserate entzündungserhaltender Zellen. Auf apoptotischen PMN fördert RvE1 die Expression von CCR-5, was zu einem starken Rückgang der Freisetzung proinflammatorischer Chemokine führt. Gleichzeitig fördert RvE1 die Efferozytoseaktivität ortsständiger Alveolarmakrophagen, welche apoptotische PMN verstärkt phagozytieren und gerichtet über das lymphatische System abtransportieren. Dieser Prozess wird durch die vermehrte Expression von apikalen anti-Adhäsionsmolekülen wie CD55 durch RvE1 unterstützt.

Innerhalb der anti-inflammatorischen Effekte im Rahmen der Resolutionsprozesse kommt der Wirkung von Resolvin auf neutrophile Granulozyten eine zentrale Rolle zu. Bereits in nanomolarer Konzentration reduziert RvE1 *in-vitro* die endotheliale und epitheliale Transmigration von neutrophilen Granulozyten, sowie die zelluläre Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12 (69, 86, 111). Eine niedrigere (Trans-)migrationsrate von Zellen kann dabei beispielsweise durch die Regulation von Adhäsionsmolekülen erreicht werden. An der Zelloberfläche exprimierte Adhäsionsmoleküle sind für die Extravasation von Leukozyten (Leukodiapedese) essentiell und können durch RvE1 reguliert werden. So ist das Adhäsionsmolekül L-Selektin beispielsweise an den initialen Schritten der inflammatorischen Leukozytenrekrutierung beteiligt und bewirkt eine labile Adhäsion der Leukozyten am Endothel, die durch Leukozyten-*Rolling* gekennzeichnet ist. In einer nächsten Phase werden die Leukozyten am Endothel aktiviert, was eine stabile Adhäsion an das Endothel induziert und die anschließende Transmigration der Leukozyten ermöglicht. Auf molekularer Ebene spielen hierbei auf den Leukozyten exprimierte CD18-Integrine (Mac-1 und LFA-1) eine wichtige Rolle. Sie binden an die Familie der endothelialen interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM) und induzieren Adhäsions- und Transmigrationsprozesse. In humanen neutrophilen Granulozyten und Monozyten induzierte RvE1 den Abbau von L-Selektin und führte zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von CD18 (112). Zudem reduzierte RvE1 die fMET-Leu-Phe (fMLP)-induzierte transepitheliale sowie endotheliale Migration *in-vitro* (69, 86, 111, 113). Das Oligopeptid fMLP gehört zur Familie der Chemokine und wirkt stark chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. Dabei bindet es an GPCRs (*formyl peptid receptors*), welche auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten exprimiert werden, und dirigiert diese zum Ort der Entzündung. RvE1 wirkt darüber hinaus auf weitere Chemokin-vermittelte Transmigrationsprozesse. So wirkt es dämpfend auf die IL-8-induzierte Transmigration von neutrophilen Granulozyten (114) und reduziert die PGE₂-vermittelte Störung der endothelialen Barriere durch stereoselektive Bindung an BLT-1 und damit Inhibierung des LTB₄-BLT-1 Signalwegs (82).

Beide zellulären Mechanismen tragen voraussichtlich dazu bei, dass RvE1 die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten an den Ort der akuten Entzündung verringert und somit eine schädliche, exzessive Inflammation verhindert (vgl. Abb. 4).

Neben der Limitierung der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten wirkt RvE1 auch direkt auf die intrazellulären Signalkaskaden bereits eingedrungener, aktivierter Granulozyten. Dabei hat sich die Beeinflussung von NF-κB-Signalwegen als potenzielle therapeutische Strategie zur Bekämpfung entzündlicher Stimuli

herausgestellt. Neben der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF-alpha, IL-6, IL-1 β , IL-18, und Chemokinen (z. B. IL-8), induziert NF- κ B auch die Bildung von nicht-acetylierter COX-2, welche für die Produktion von pro-inflammatorischen Lipidmediatoren wie PGE₂ verantwortlich ist. Zudem inhibiert NF- κ B sowohl die extrinsische, über Todesrezeptoren (wie z. B. CD95) vermittelte, als auch die intrinsische, Mitochondrien-vermittelte, Apoptose. Mehrere Studienergebnisse legen nahe, dass RvE1 pro-inflammatorische Effekte durch die Modulation des NF- κ B-Signalwegs hemmt. Beispielsweise hemmt die Vorbehandlung mit RvE1 die induzierte NF- κ B-Aktivität in Zellen, in denen die ChemR23- (85, 115) oder BLT-1-Expression durch Transfektion eingebracht wurde (100). Darüber hinaus dämpft RvE1 die NF- κ B-Aktivität in humanen Epithelzellen (116). In mehreren murinen Pneumonie- oder Kolitismodellen milderte RvE1 die Inflammationsreaktion, da es die Aktivierung von NF- κ B in entzündetem Gewebe unterdrückte (113, 115, 117).

RvE1 steigert jedoch nicht nur über die Beeinflussung des NF- κ B Signalwegs die Apoptoserate entzündungserhaltender Zellen, sondern ist auch in die Signaltransduktion von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinasen) und MAP-Kinasen im Verlauf der akuten Inflammation involviert (118). In murinen *in-vivo* Modellen des akuten Lungenversagens (ALI) erhöht RvE1 die Apoptoserate neutrophiler Granulozyten durch Inhibition der Proteinkinase B (AKT) und/ oder erhöhter Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) (119). Außerdem reduziert RvE1 die Aktivität der AKT- und ERK-Signalwege und verhindert somit die Proliferation von murinen Fibroblasten (120). Die Aktivierung der PI3K wird durch die Interaktion von RvE1 mit ChemR23 initiiert, die über mTOR-Signalwege zu einer Phosphorylierung von AKT und eines ribosomalen S6-Proteins führen (110).

3.6.2.2 Resolutionsfördernde Effekte von Resolvin E1

Makrophagen erfüllen wichtige, vor allem resolutionsfördernde Funktionen in der Wiederherstellung der Gewebsarchitektur. Dabei stellt die effiziente phagozytische Entfernung von apoptotischen neutrophilen Granulozyten eine Schlüsselstelle in der Resolutionsphysiologie von entzündlichen Prozessen dar. RvE1 steigert die Efferozytose von apoptotischen neutrophilen Granulozyten durch isolierte Makrophagen *in-vitro* (86, 110, 121, 122). Dieser Prozess wird über den ChemR23 Rezeptor vermittelt (90) und durch bereits beschriebene Phosphorylierungssignalwege noch einmal potenziert (110). Darüber hinaus begünstigt die Anwesenheit resolutionsfördernder Mediatoren eine funktionelle Veränderung in Makrophagen. Sie konvertieren vom pro-inflammatorischen CD11^{high} Phänotyp zum resolutionsfördernden (*pro-resolving*) CD11^{low} Phänotyp. Diese

resolutionsfördernden Makrophagen exprimieren zwar ähnliche Zellmarker (zum Beispiel COX-2 oder Stickoxid-Synthasen (NO-Synthasen)) wie klassisch aktivierte Makrophagen, verhalten sich aber indifferent gegenüber mikrobiellen TLR-Liganden und schütten damit keine pro-inflammatorischen Mediatoren mehr aus. Gleichzeitig weist diese Makrophagenpopulation eine höhere Aktivität der 12/15-Lipoxygenase zur Bildung resolutionsfördernder Lipidmediatoren auf, verliert ihre Fähigkeit zur Phagozytose (*efferocytotic saturation*) und leistet somit insgesamt zur Termination der Entzündungsreaktion einen wichtigen Beitrag (90, 123-125).

Neben der erhöhten nicht-entzündlichen Phagozytose von neutrophilen Granulozyten fördert RvE1 auch den Makrophagen-induzierten Abtransport von apoptotischen Granulozyten und Gewebetrümmern vom Entzündungsort zu den lymphatischen Organen (90). Dieses entscheidende histologische Merkmal der Resolution wird durch eine RvE1-mitigierte Expression von apikalen anti-Adhäsionsmolekülen wie CD55 unterstützt und erfolgt in ChemR23-abhängiger Weise (111). So stellen Makrophagen wichtige Zielzellen für resolutionsfördernde Wirkungen von RvE1 dar und können durch die beschriebenen Eigenschaften die Dynamik von Entzündungsprozessen beeinflussen und demnach die Entzündungsauflösung beschleunigen.

3.6.3 Effekte von RvE1 bei pulmonalen Erkrankungen

Weitere Veröffentlichungen belegen, dass sich eine systemische RvE1-Applikation ebenso günstig bei Erkrankungen der Lunge auswirkt (117, 126-128). Beispielsweise zeigte RvE1 protektive Wirkungen in präklinischen Modellen der allergisch-bedingten Atemwegsinflammation. So erleichterte die exogene Zufuhr von RvE1 die Resolution einer Ovalbumin-induzierten Entzündung und reduzierte die Hyperreaktivität der Atemwegsmuskulatur im Mausmodell. Zudem reduzierte dies die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und die Produktion von Typ-2 Zytokinen (126, 129). Des Weiteren förderte RvE1 in murinen Asthmodellen durch Interaktion mit dem ChemR23 Rezeptor die NK-Zellmigration und Toxizität. Durch Depletion der NK-Zellpopulation wurden darüber hinaus die resolutionsfördernden Effekte der RvE1-Behandlung teilweise aufgehoben (130). Patienten mit zystischer Fibrose, die in den Atemwegen nachweisbare Mengen von RvE1 aufwiesen, zeigten eine verbesserte Lungenfunktion im Vergleich zu Patienten ohne RvE1 (131).

In Bezug auf infektionsbedingte Lungenerkrankungen ist jedoch zu RvE1 noch sehr wenig bekannt. In einem murinen Modell der Aspirationspneumonie mit Induktion eines akuten Lungenversagens (ALI) durch *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien, untersuchten Seki et al. die Effekte von präventiv, systemisch verabreichtem RvE1. Dabei reduzierte RvE1, unabhängig von der Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren wie IL-10,

die Konzentration pro-inflammatorische Zytokine in Lungengewebehomogenaten sowie den Einstrom neutrophiler Granulozyten in das infizierte Gewebe. Insgesamt verbesserte RvE1 deutlich die Erregerelimination und wirkte sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus (113). Auch bei bereits ausgeprägter pulmonaler Inflammation führte die therapeutische Applikation von RvE1 in tierexperimentellen Untersuchungen der *E. coli*-Pneumonie sowie der *E. coli*-Peritonitis mit assoziiertem akuten Lungenversagen zu milderem entzündlichen Veränderungen (119). So konnte in beiden Modellen eine verringerte Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF) nachgewiesen werden. Des Weiteren reduzierte die Behandlung mit RvE1 die Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine und führte zu histologisch schwächer ausgeprägten Entzündungsreaktionen. RvE1 erhöhte zudem die Anzahl von Monozyten und Makrophagen in der *E. coli*-infizierten Mauslunge und verbesserte das Überleben bei *E. coli*-Peritonitis mit assoziiertem ARDS (119).

Bislang existieren jedoch keine publizierten Erkenntnisse zum Effekt von RvE1 bei Pneumonien, welche durch Gram-positive Erreger wie beispielsweise *S. pneumoniae* oder Influenza-A-Viren verursacht werden. Lediglich erste Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigten eine vermehrte Expression von BLT-1 in der akuten Entzündungsreaktion im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie, wohingegen der ChemR23-Rezeptor erst vorrangig in der späten Entzündungsphase vermehrt nachweisbar war. Dagegen fanden sich jedoch keine Hinweise auf einen Einfluss eines endogen erhöhten ω -PUFA-Spiegels bei fat-1^{+/+}-Mäusen oder einer Rezeptordefizienz bei ChemR23^{-/-} oder BLT-1^{-/-} Tieren auf die klinische Ausprägung oder die Entzündungsreaktion in Lunge und Blut im Rahmen einer milden Pneumokokkenpneumonie. Auch die exogene Substitution der RvE1-Vorläuferfettsäure 18R-HEPE in der murinen Pneumokokkenpneumonie erbrachte nur punktuelle Effekte im Sinne einer reduzierten IFN- γ -Freisetzung in die unteren Atemwege *in-vivo* und erhöhten Phagozytoseaktivität von Makrophagen *in-vitro*. Insgesamt konnte jedoch bisher kein klinischer Vorteil durch die präventive oder therapeutische exogene Zufuhr der Vorläuferfettsäure 18R-HEPE in der murinen Pneumokokkenpneumonie gesehen werden (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung).

3.7 Fragestellung der Arbeit

Bisher offen blieb die Frage, ob die Zielrezeptoren des RvE1 auch im humanen Lungengewebe exprimiert werden und RvE1 demnach überhaupt rezeptorvermittelte

Wirkungen auch in der humanen Lunge entfalten kann. Diese Erkenntnisse sind jedoch Grundvoraussetzung dafür, eine klinische Anwendung von RvE1 bei humanen Patienten überhaupt in Betracht zu ziehen. Daher soll im ersten Schritt dieser Arbeit die Expression und Verteilung von BLT-1 und ChemR23 im humanen Lungengewebe eingehend untersucht werden. Darüber hinaus wird geprüft, ob RvE1 auch einen Einfluss auf die Regulation inflammatorischer Prozesse im Lungengewebe des Menschen hat.

Bereits vorliegende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen bislang nur punktuelle Effekte einer Behandlung mit der Vorläuferfettsäure 18R-HEPE in der murinen Pneumokokkenpneumonie. Welchen Effekt eine direkte Behandlung mit RvE1 bei der pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* und somit für den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie hat, ist jedoch bisher nicht bekannt und soll im aktuellen Versuchsvorhaben untersucht werden. Es wird dabei eingehend geprüft, ob die direkte Applikation des RvE1 eine adäquate Entzündungsreaktion nach Infektion mit *S. pneumoniae* begünstigt und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst.

Unter gleichen Gesichtspunkten soll zudem in einem weiteren murinen Modell der pulmonalen Influenza-A-Virus-Infektion der Effekt von RvE1 auf eine zunächst mild verlaufende, zeitlich verzögerte akute Entzündungsreaktion untersucht werden. Um zu evaluieren, ob systemisch verabreichtes RvE1 bei einer Infektion mit zunächst mild verlaufender, akuter Inflammation ein größeres therapeutisches Potenzial entfaltet als lokal am Ort der Entzündung gebildetes RvE1, wird hierbei eine zusätzliche Versuchsgruppe mitgeführt, die statt RvE1 eine systemische 18R-HEPE- (Vorläuferlipid von RvE1) Behandlung erhält und bei der sich die RvE1-Wirkung voraussichtlich nur lokal am Ort des Entzündungsgeschehens entfaltet. Darüber hinaus soll gleichzeitig abgeklärt werden, ob bzw. welche Nebeneffekte die jeweilige Behandlungsstrategie begleiten.

Des Weiteren ist bislang nicht bekannt, welchen Effekt RvE1 auf die Auflösung der Entzündungsreaktion und die Reparatur des Gewebes in der späten Phase der Pneumokokkenpneumonie ausübt. Dies wird nun im etablierten Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung detailliert untersucht. Zugleich wird geprüft, in wie weit RvE1 als adjuvante Therapiemaßnahme zu einer Antibiotikabehandlung die Resolution der Entzündungsreaktion verbessert und somit die Wiederherstellung der Lungenbarriere und die Heilung der Pneumonie begünstigt.

Die Untersuchungen der Effekte von RvE1 auf die Entzündungsreaktion in verschiedenen murinen und humanen Pneumoniemodellen sind von entscheidender Bedeutung, um die anti-inflammatorischen und resolutionsfördernden Prozessen in der Pathogenese der Pneumonie unterschiedlicher Genese besser zu verstehen.

Darüber hinaus tragen diese Untersuchungen dazu bei, möglicherweise vielversprechende innovative Wirkstoffe für eine adjuvante Therapie der schweren Pneumonie und Sepsis des Menschen zu identifizieren.

4 Material und Methoden

Die „Satzung der Charité zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis“ wurde bei der vorliegenden Studie berücksichtigt.

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Puffer und andere Substanzen

2-Propanol, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
18R-HEPE, CAY-32840-250	Caymen Pharmaceuticals (bezogen über BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH)
Ampicillin	ratiopharm GmbH (Ulm)
Aqua ad iniectabilia (10ml)	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
BD FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
BD FACS™ CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
Blutagarplatten (5% Schafblut)	BD Biosciences (Heidelberg)
Bovine Serum Albumine	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Braunol®	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
DAPI (4',6-Diamidino-6-2-phenylindol-dihydrochlorid)	Sigma (Deisenhofen)
DNase I 100 mg from bovine pancreas grade II	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
FCS (Fetales Kälberserum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Glycergel Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH (Hamburg)
Heparin 25000 I.E., 5 ml	ratiopharm GmbH (Ulm)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems (USA)
Human IL-6 ELISA # 555220	BD Bioscience (Heidelberg)

Human IL-8 ELISA # 555244	BD Bioscience (Heidelberg)
Human TNF- α ELISA # 550610	BD Bioscience (Heidelberg)
Isopropanol molecular biology grade	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
Ketavet Injektionslösung 100 mg/ml	Pfizer Deutschland GmbH (Berlin)
Kollagenase (Typ CLS II)	Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA)
LPS (#ALX-581-008-L002)	Enzo Life Sciences (Lörrach)
MALP-2 (#ALX-162-027-C050)	Enzo Life Sciences (Lörrach)
MEM-Pulver	Gibco (USA)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Mouse Albumin ELISA	Bethyl Laboratories Inc. (USA)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Natriumchloridlösung (große Flasche)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
Natriumchloridlösung, 0,9 % 10 ml	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + CO. KG (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
PBS, Dulbecco's with Ca & Mg	Biochrom AG (Berlin)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Penicillin	Boehringer (Mannheim)
Proctaplex Reaction kit	Affymetrix (Darmstadt)
Protease-Inhibitor complete TM Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Rompun Injektionslösung 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
RvE1, Cay10007848-50, Cay10007848-50-200	Caymen Pharmaceuticals (bezogen von BIOMOL GmbH)
Streptomycin	Boehringer (Mannheim)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	BD Bioscience (Heidelberg)

Thilo Tears Augengel	Alcon Pharma GmbH (Freiburg im Breisgau)
TMB soluble	Merck (Darmstadt)
TPCK-Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Tris Pufferan® ≥99,9 %	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
TRIzol Reagent	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Zellkulturflaschen T75	Nunc (Wiesbaden)

4.1.2 Medien

Avicel RC/CL	FMC Corporation (USA)
Bacto™ Technischer Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Todd Hewitt Bouillon	BD Biosciences (Heidelberg)
MEM with Earle's Salts	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (USA)
BD Falcon™ 5 ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Biopsiestanze, Standard (8 mm)	pfm medical AG (Köln)
Columbia-Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Einbettkassetten	Rotilabo, Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 µl)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

Falcon Blue Max™ (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ (26 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742 10 x 4 x 45mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Mehrzweckbecher 100 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Parafilm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Platte 12 Multiwell Falcon #353043	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Platte 96 Micro F-Form #82.1581	Platte 96 Micro F-Form #82.1581
Platte 96 Micro F-Form #82.1581	Th. Geyer Berlin GmbH (Berlin)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Röhrchen Kryo Plus steril 2ml #72.379	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)	Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45 µm)
Serologische Pipetten (2 ml / 5 ml / 10 ml / 25 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Skalpell, Einweg, steril	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd. (Osaka, Japan)
Spritzen BD Discardit™ II 2 ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipak™ 1 ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Tube, 12 ml, PP, Round Bottom, Two-Position Vent Stopper (Item-No. 184261)	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Vasco® Nitril light Untersuchungshandschuh	B.Braun Melsungen AG (Melsungen)

4.1.4 Geräte und Apparaturen

AB 7300-Real Time PCR System	Applied Biosystems (USA)
------------------------------	--------------------------

Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & CO.KG (Lauda-Königshofen)
Biometra® T1 Thermocycler	Biomedizinische Analytik (Göttingen)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
CellQuest™ Pro, Software, Version 4.0	BD Biosciences (Heidelberg)
FACS Calibur (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
FastPrep-24 Homogenisator	MP Biomedicals (Heidelberg)
Heraeus Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products (Osterode)
IKA®-Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Kühlschrank (4 °C)/Gefrierschrank (-80 °C)	Engmann Kühlsysteme GmbH (Mannheim)
Megafuge 1.0R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit AxioCam und LSM 5 Pascal)	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
Mikroskop Labolux 12 Typ: 020-435.025	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
MiniVent Beatmungspumpe Maus	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
NanoDrop 2000	Thermo Scientific (USA)
Peristaltikpumpe Ismatec® Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH IDEX Health & Science GmbH Wertheim
pH-Meter	Mettler-Toledo FiveEasy pH
Photometer Uvikon XS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Graph Pad Prism Version 8.0	GraphPad (USA)
Pulmonalkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Rektalsonde physitemp Model BAT-12	physitemp Instruments, Inc. (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Software Win-Read Anthos	Ankos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
Trachealkanüle für Mäuse	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Ultra-Turrax T 8	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Ismatec®, Peristaltikpumpe Reglo-Analog	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH

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

4.1.5 Antikörper

rat anti-mouse CD11b, PE-Cy7 conjugated (clone: M1/70)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, PE conjugated (clone: BM8)	eBioscience (Frankfurt)
rat anti-mouse Ly6G, PerCP-Cy5.5. conjugated (clone: 1A8)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse Ly6C, V450 conjugated (clone: AL-21)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD11c, Cy5 conjugated (clone: N418)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse MHCII, Alexa 700 conjugated (clone: M5/114)	eBioscience (Frankfurt)
rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated (clone: 30-F11)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD3, AlexaFluor700 conjugated (clone: 17A2)	eBioscience (Frankfurt)
rat anti-mouse CD19, PE conjugated (clone:1D3)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse Ly6G, FITC conjugated (clone: 1A8)	Biologend (USA)
rat anti-mouse Ly6C, V450 conjugated (clone: AL-21)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse CD11b, PECy7 conjugated (clone:M1/70)	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-human ChemR23 monoclonal, LS-B2537 (Lot.: 67367)	BD Biosciences (Heidelberg)

rabbit anti-human BLT-1 monoclonal	BD Biosciences (Heidelberg)
goat anti-rat F(ab')-IgG, Alexa488 conjugated, A-11006	Molec. Probes (Karlsruhe)
goat anti-rabbit F(ab')-IgG, Alexa488 conjugated, A-11070	eBioscience (Frankfurt)

4.1.6 PCR-Primer

<p>TaqMan® Gene Expression Assay</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hs01081979_s1 human ChemR23 • Hs04188552_m1 human BLT-1 • Hs99999905_m1 (human GAPDH) 	Applied Biosystems (USA)
--	--------------------------

4.2 Methoden

4.2.1 Humanes Lungengewebe

Zur Untersuchung von humanem Lungengewebe wurden von Patienten, welche sich einer tumorbedingten Lungenteilresektion unterziehen mussten, native Lungengewebsproben aus dem entnommenen tumorfreien Sicherheitsbereich mit deren schriftlichen Einverständnis gewonnen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Berlin (Ethikvotum: EA2/079/13) genehmigt. Die Lungengewebeproben bzw. daraus hergestellte, formalinfixierte Paraffinschnitte wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Andreas Hocke (Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie u. Pneumologie) zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Immunhistologische Färbung von BLT-1 und ChemR23 in humanem Lungengewebe

Für die immunhistologische Untersuchung der Expression der Rezeptoren BLT-1 und ChemR23 in der humanen Lunge stellte Prof. Dr. Andreas Hocke dem aktuellen Projekt freundlicherweise bereits vorhandene Gewebeschnitte von Formalin-fixiertem und in Paraffinblöcke aufgenommenem humanen Lungengewebe zur Verfügung.

Zur Entparaffinisierung wurden die Objektträger mit den 10 µm dicken Lungengewebeschnitten in dem Xylolersatzstoff Roticlear® bei 60°C über Nacht

inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 30 min in Natriumcitratlösung (0,01 M tri-Natriumcitrat in destilliertem Wasser, pH=6) im Dampfkochgärer erhitzt und danach für 30-45 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei den Lungenschnitten zur ChemR23-Darstellung erfolgte anschließend für 15 min eine Permeabilisierung der Gewebeschnitte in 1%iger Triton-X-100-Lösung (in 0,01molarem PBS verdünnt, Raumtemperatur (RT)), um auch die im Zytoplasma lokalisierten Zielantigenen detektieren zu können. Des Weiteren wurden nach erneutem Waschen der Gewebeschnitte in PBS (0,01 M) die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Präparate in Verdünnungsmedium (0,01 M PBS, 0,1 % BSA, 0,05 % Tween20) mit 5 % Ziegen Serum bei RT blockiert. Die wiederum mit PBS gespülten Schnitte wurden anschließend mit im Verdünnungsmedium entsprechend konzentrierten primären Antikörpern (*rat anti-human* ChemR23 [LifeSpan Biosciences] 1:100; *rabbit anti-human* BLT-1 [Cayman Chemical] 1:100) über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert, am nächsten Tag erneut gewaschen und mit dem korrekt verdünnten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (AF 488 [Molecular Probes] *goat anti-rat* [ChemR23, 1:2000] bzw. *goat anti-rabbit* [BLT-1, 1:2000) erneut über Nacht bei 4 °C gefärbt. Nach wiederholtem Waschen der Schnitte in PBS erfolgte eine 5-minütige Färbung mit DAPI zur Darstellung der Zellkerne und nach erneutem Spülen in PBS das Eindecken der Gewebeschnitte auf dem Objektträger mit Mowiol® (Carl Roth). Die Lagerung der abschließend mit durchsichtigem Nagellack versiegelten Schnitte erfolgte im Dunkeln bei 4 °C. Die mikroskopische Analyse erfolgte unter Anleitung von Prof. Dr. Andreas Hocke (Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie) durch Frau Dr. Reppe und Frau Dr. Gutbier (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martin Witzernath, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie) am LSM780 Mikroskop (Zeiss) mit LSM T-PMT Kamera (Zeiss).

4.2.3 Ex-vivo Stimulation von humanem Lungengewebe mit LPS und MALP-2

Die praktische Durchführung der Vorbereitung des Lungengewebes sowie die nachfolgende *ex - vivo* Stimulation erfolgte gemeinsam mit Dr. Sandra-Maria Wienhold (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martin Witzernath, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie).

Zur *ex - vivo* Stimulation von humanen Lungengewebeproben wurde das Lungengewebe zunächst unter Verwendung eines Einwegskalpells steril in kleine, etwa gleichgroße Teilstücke (ca. 100 mg pro Teilstück) zerteilt. Anschließend wurden

diese Gewebeteile in 12 - Well Zellkulturplatten verteilt und zunächst 24 h in 2 ml Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) -1640 bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, um eventuelle Blut- oder Medikamentenrückstände auszuwaschen. Die anschließenden Stimulationsversuche wurden in Duplikaten durchgeführt (132, 133).

4.2.3.1 Stimulation von humanen Lungengewebeproben mit LPS

Die Stimulation der humanen Lungengewebeproben wurde wie nachfolgend dargestellt durchgeführt (Abb. 5):

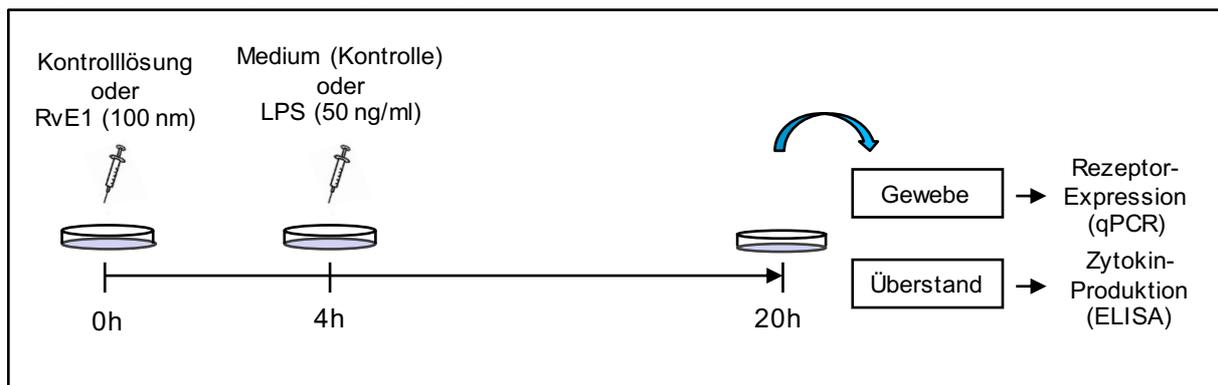


Abb. 5: Versuchsablauf LPS-Stimulation von humanem Lungengewebe.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit LPS (50 ng/ml) oder Medium (Kontrolle). Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zytokine mittels ELISA im Medium quantifiziert. Die Bestimmung der Rezeptorexpression erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR.

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

Tabelle 1: Versuchsgruppen LPS-Stimulation von humanem Lungengewebe.

A: Kontrolllösung + Medium	a: Kontrolllösung + LPS (50 ng/ml)
B: RvE1 (100 nM) + Medium	b: RvE1 (100 nM) + LPS (50 ng/ml)

Die Lungenproben wurden mit 100 nM RvE1 (Cayman Chemical) oder Kontrolllösung behandelt und anschließend mit 50 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS von *Salmonella minnesota*, #ALX-581-008-L002, Enzo Life Sciences) oder purem RPMI-Medium stimuliert (Abb. 5).

Dafür wurde die RvE1 Stammlösung (gelöst in Ethanol, Cayman Chemical, *Item No.* 10007848) 1:5 mit Ethanol verdünnt (= 28,52 μM), zu je 10,56 μl aliquotiert und bei - 80°C gelagert. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurden die RvE1-Aliquots aufgetaut und jedes RvE1-Aliquot mit 3 ml vorgewärmtem RPMI-1640 Medium verdünnt (= RvE1 Stimulationsmedium). Daraus ergab sich eine Stimulationskonzentration von 100 nM RvE1 pro *Well* (2 ml). Als Kontrolle wurden Ethanol (100%)-Aliquots (je 10,56 μl) zu Versuchsbeginn ebenso aufgetaut und entsprechend in Medium verdünnt (nachfolgend Kontrolllösung genannt). Anschließend wurden je 2 ml des RvE1 Stimulationsmediums bzw. der Kontrolllösung in eine frische 12-*Well*-Zellkulturplatte vorgelegt.

Anschließend wurden die vorbereiteten Lungengewebeproben nach der 24-stündigen Inkubationszeit in die vorbereitete neue 12-*Well*-Zellkulturplatte umgebettet. Dabei wurden Gewebeproben der Gruppen B und b in *Wells* überführt, in welchen RPMI-Medium nach obigem Prinzip mit RvE1 versetzt war (RvE1 Stimulationsmedium). Gruppen A und a wurden in mit Lösungsmittel versetztes Medium überführt. Anschließend wurden 400 μl des im *Well* vorhandenen RvE1- bzw. Lösungsmittel-Medium-Gemisches mittels einer 1 ml-Spritze mit einer 26 G-Kanüle in das jeweilige Lungenstückchen injiziert. Die 12-*Well*-Platten wurden danach für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ im Wärmeschrank inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Stimulation mit LPS oder Medium (Kontrolle). Das LPS wurde zuvor als Stammlösung gelöst in *Aqua bidest.* bezogen. Die Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde aliquotiert und bis vor Gebrauch bei - 80°C gelagert. Vor Stimulation erfolgte eine 1:100 Vorverdünnung der Stammkonzentration in 1640-RPMI-Medium. Anschließend wurden 10 μl dieser Stimulationslösung zu den 2 ml Medium pro *Well* pipettiert und gründlich vermischt, so dass eine Endkonzentration von 50 ng/ml LPS entstand. Wiederum wurden 400 μl des im *Well* befindlichen Gemischs mittels einer sterilen Spritze und 26 G Kanüle in die jeweiligen Lungengewebeproben injiziert. Die Kontrollstimulation erfolgte entsprechend mit 10 μl purem 1640-RPMI-Medium. Die 12-*Well*-Platten wurden im Anschluss für weitere 16 h bei 37°C und 5% CO₂ im Wärmeschrank inkubiert. Nach insgesamt 20 h (4 h+16 h) erfolgte auf Eis die vorsichtige Entnahme und Aufteilung des Zellkulturmediums in mehrere Aliquots. Die Lungengewebeproben wurden ebenfalls in sterile Eppendorfgefäße überführt. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80°C gelagert.

4.2.3.2 Stimulation von humanen Lungengewebe mit synthetischem MALP-2

Die Stimulation humaner Lungengewebe mit *Macrophage-activating Lipopeptide-2* (MALP-2) erfolgte analog zur bereits beschriebenen Stimulation mit LPS anhand des nachfolgend dargestellten Versuchsablaufes (Abb. 6):

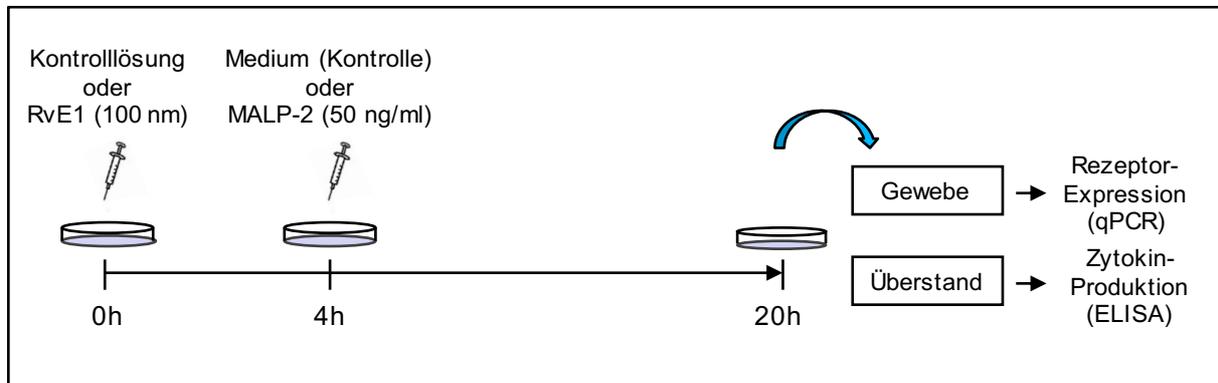


Abb. 6: Versuchsablauf MALP-2 Stimulation von humanem Lungengewebe.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit MALP-2 (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zytokine mittels ELISA im Zellkulturmedium quantifiziert. Die Bestimmung der Rezeptorexpression erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR.

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

Tabelle 2: Versuchsgruppen MALP-2 Stimulation von humanem Lungengewebe.

A: Kontrolllösung + Medium	a: Kontrolllösung + MALP-2 (50 ng/ml)
B: RvE1 (100 nM) + Medium	b: RvE1(100 nM) + MALP-2 (50 ng/ml)

Die Lungenproben wurden wie unter 4.3.1 beschrieben mit 100 nM RvE1 oder Kontrolllösung behandelt und anschließend mit 50 ng/ml MALP-2 (synthetisch, #ALX-162-027-C050, Enzo Life Sciences) oder RPMI-Medium stimuliert (Abb. 6).

Dafür wurde MALP-2 (S-[2,3-bis(Palmitoyloxy)-(2R)-propyl-cysteinyl-GMNDESNIKFKEK) gelöst in 30 % 2-Propanol/H₂O bezogen. Die verwendete Stammlösung wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Vor Stimulation erfolgte eine 1:100 Vorverdünnung der Stammlösung in 1640-RPMI-Medium, so dass eine Endkonzentration von 50 ng/ml MALP-2 pro *Well* bei einer Stimulation mit 10 µl Stimulationlösung in 2 ml Medium pro *Well* erreicht wurde. Die Kontrollstimulation erfolgte entsprechend mit 10 µl 1640-RPMI-Medium (nachfolgend Medium genannt). In Vorversuchen wurde eine Kontrollgruppe mit purem Medium und eine zweite

Kontrollgruppe mit Medium, dem die im Stimulationsmedium enthaltene Menge 30%igem Propanol (Lösungsmittel) zugesetzt wurde, verglichen. Dabei zeigte sich, dass keine messbaren Unterschiede in den geplanten Analyseparametern zwischen der reinen Medium-Kontrolle und dem Medium, das mit 30%igem Propanol versetzt war, nachgewiesen werden konnten (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Daher wurden die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen ausschließlich mit der puren Mediumkontrolle durchgeführt.

Der Ablauf der Stimulation der Lungengewebeproben mit RvE1 und MALP-2 sowie die Probengewinnung erfolgten analog wie bereits unter Punkt 4.3.1 beschrieben (s. o.).

4.2.4 Quantifizierung der Zytokine IL-6 und IL-8 in den Überständen des humanen Lungengewebes

Die Bestimmung der Zytokine IL-6 und IL-8 aus humanem Lungengewebe erfolgte mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) der Firma BD Bioscience. Zuerst wurden die zuvor bei - 80 °C gefrorenen Mediumproben langsam auf Eis aufgetaut. Die jeweiligen ELISA wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden alle Arbeitsschritte der beiliegenden Anleitungen befolgt. Alle verwendeten Puffer und Standardverdünnungen wurden ebenfalls nach Herstellerangaben angefertigt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mittels Anthos ht2 Mikroplatten Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und mit zugehöriger Software (Win Read Anthos). Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte als Doppelbestimmung mit Mittelung der erhaltenen Ergebnisse. Die Auswertung erfolgte unter Berücksichtigung des Gewichtes der humanen Lungenproben und unter Zuhilfenahme der Herstellerangaben.

4.2.5 Quantifizierung der BLT-1- und ChemR23-Rezeptorexpression in humanem Lungengewebe

4.2.5.1 RNA Isolation aus humanem Lungengewebe

Nach Entfernen des Mediums wurden die Lungenstückchen sofort in ein Greiner Bio-One™ Kulturröhrchen mit Entlüftungsstopfen (5 ml), welches mit 1 ml eiskaltem TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) gefüllt war, überführt. Hierauf wurden die Proben mittel Ultra-Turrax T8 homogenisiert. Das im TRIzol™ enthaltene Guanidinthiocyanat lysierte dabei die Zellwände und inaktivierte alle Enzyme, sodass einem Abbau der

instabilen RNA vorgebeugt wurde. In dem zusätzlich enthaltenen Phenol lösten sich Proteine sowie DNA.

Anschließend wurden die gekühlten Proben in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei - 80°C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden die Proben auf Eis aufgetaut, 1 min bei 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen Ethanol versetzt. Anschließend wurde das Gewebehomogenat zur Resuspension für 15 sek gerüttelt. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte unter Zuhilfenahme des Direct-zol™ RNA MiniPrep Kits (Zymo Research). Die Verarbeitung erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurde darauf geachtet, dass höchstens 50 mg Feuchtgewebe auf eine Säule gegeben wurde. Somit wurde die Gewebeprobe bei größerem Gewicht des Lungenstückchens auf zwei beziehungsweise drei Säulen verteilt. Die isolierte RNA wurde sofort auf Eis zwischengelagert.

Zur Herstellung von Aliquots mit einer RNA-Konzentration von je 1 µg/µl wurde zunächst der RNA-Gehalt der Proben durch Absorptionsmessung mit dem NanoDrop 2000 der Firma Thermo Scientific bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt. Eine $OD_{260}=1$ entsprach hierbei einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml RNA in der Probe. Um den Reinheitsgrad der Proben ermitteln zu können, wurde ferner das Verhältnis von OD_{260} und OD_{280} bestimmt. Um eine Verunreinigung mit Proteinen, welche aufgrund ihrer aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, ausschließen zu können, sollte der so errechnete Quotient für eine reine RNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Atypische Absorptionsspektren traten in der isolierten RNA nicht auf. Für alle Arbeitsschritte wurden RNase-, DNase- sowie pyrogenfreie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet.

4.2.5.2 Durchführung der reversen Transkription

Für den Einsatz der isolierten Lungenproben in der quantitativen PCR musste die gewonnene RNA zunächst in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) benötigt, die ausgehend von der einzelsträngigen RNA zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang synthetisiert.

Anschließend wurde der RNA-Anteil von einer anderen Untereinheit desselben Enzyms mit Exoribonukleaseaktivität abgebaut. Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit* der Firma Applied Biosystems® gemäß Herstellerangaben verwendet.

Es wurde ein Master Mix aus den folgenden Komponenten vorbereitet (Tab. 3):

Tabelle 3: Master-Mix für die reverse Transkription der RNA in cDNA.

Reverse Transkription	
Nuklease-freies Wasser	4,2 µl
dNTP	0,8 µl
10x Puffer	2,0 µl
Hexamer Primer	2,0 µl
HCRT Polymerase	1,0 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	10,0 µl

Die benötigten Komponenten wurden in ein DNase- und RNase-freies Reaktionsgefäß pipettiert und mit 10 µl der eluierten RNA (2,5 µg) versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde der Inhalt vermischt und anschließend kurz herunterzentrifugiert. Es erfolgte eine anschließende Inkubation der Ansätze zuerst für 10 min bei 25 °C (*primer annealing*) und anschließend für 2 h bei 37 °C (Transkription) auf dem Thermocycler Biometra®. Während des ersten Inkubationsschrittes erfolgte die Primerhybridisierung. Im nächsten Schritt schloss sich die Transkription an. Die Enzyminaktivierung erfolgte danach bei 85 °C für 5 sek. Die nun entstandene cDNA, die nachfolgend als Matrize für die quantitative PCR diente, wurde im Thermocycler bei 4 °C bis zur Entnahme gekühlt, anschließend 1:5 mit RNA/DNA-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

4.2.5.3 Durchführung der quantitativen real time PCR

Für jeden Reaktionsansatz wurden 15 µl des *Master Mix* (Tab. 4) in eine *96-Well-Optical-Reaction-Platte* vorgelegt und anschließend mit 5 µl der cDNA-Verdünnung auf ein Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktionsplatte wurde mit Folie versiegelt, kurz abzentrifugiert (100 rpm, 30 sec) und anschließend in den qPCR-Cycler platziert.

Zuerst erfolgte eine Inkubation bei 95 °C für 10 min. Danach folgten 40 Zyklen bestehend aus der Denaturierung bei 95 °C für 15 sec und anschließender Elongation bei 60 °C von 1 min.

Für die Durchführung der quantitativen *real time* PCR (qPCR) wurden TaqMan Assaysonden verwendet. Dabei wird der Mechanismus des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) genutzt, bei dem ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) angeregt wird und seine Energie auf einen *dark Quencher* überträgt, welcher das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffes damit unterdrückt. Die für die Zielsequenz spezifische TaqMan-Sonde beinhaltet ein Oligonukleotid, welches mit einem Fluoreszenz-Reporter an seinem 5`-Ende und einem am 3`-Ende befindlichen *Quencher* markiert ist. Für die TaqMan-Sonden wurde der fluoreszierende Reporterfarbstoff (FAM), sowie TAMRA als Quencher eingesetzt. Durch die räumliche Nähe des Reporterfarbstoffes zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporters während der Hybridisierung unterdrückt. Kommt es jedoch zur Synthese des Neustrangs während der Elongation, baut die im Master Mix befindliche Polymerase, die Exonukleaseaktivität besitzt, die Sonde vom 5`-Ende her ab. Somit erhöht sich der Abstand des Reporterfarbstoffes zum *Quencher*, wodurch das Reportersignal nicht mehr vom *Quencher* unterdrückt, sondern als Fluoreszenzsignal emittiert wird. Dabei findet die Messung am Ende jedes Zyklus statt.

Als endogene Kontrolle (Referenzgen) diente die Expression von Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als Enzym der Glykolyse wird GAPDH ubiquitär synthetisiert und exprimiert und eignet sich daher als Referenzgen der RT-qPCR.

Die relative Quantifizierung (RQ) des Zielgens in Bezug auf das Referenzgen wurde nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode bestimmt (134). Die Induktion des Referenzgens wurde 1 gesetzt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der relativen Quantifizierung (RQ) des Zielgens in Relation zur endogenen Kontrolle nach folgender Formel:

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

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

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Dabei bezeichnet der CT-Wert (*cycle threshold*, Schwellenwert) die Zyklusanzahl, bei der das Fluoreszenzsignal des Zielgens erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Eine irrtümliche Amplifikation genomischer DNA konnte durch Verwendung von Intron-überspannenden Primern ausgeschlossen werden.

Tabelle 4: Zusammensetzung Master Mix für die *real time* PCR

Master Mix quantitative PCR:	
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 µl
Nuklease-freies Wasser	4 µl
TaqMan® Gene Expression Assay (Assay on demand)	1 µl
Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:	15 µl

4.2.6 Versuchsaufbau der tierexperimentellen Untersuchungen

Die tierexperimentellen Untersuchungen der aktuellen Dissertation wurden im Rahmen des vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigten Versuchsvorhaben G0042/15 durchgeführt.

Tabelle 5: Versuchsaufbau Akute Pneumokokkenpneumonie (Versuchsteil 5.3.).

Versuchsgruppen	Untersuchungszeitpunkt p.i.	Gruppengröße
PBS + Kontrolle	48 h	n=8
PBS + RvE1	48 h	n=8
<i>S. pneumoniae</i> + Kontrolle	48 h	n=10
<i>S. pneumoniae</i> + RvE1	48 h	n=10

Tabelle 6: Versuchsaufbau Influenzaviruspneumonie (Versuchsteil 5.4.).

Versuchsgruppen	Untersuchungszeitpunkt p.i.	Gruppengröße
PBS + Kontrolle	96 h	n=10
H1N1 + Kontrolle	96 h	n=10
H1N1 + 18R-HEPE	96 h	n=10
H1N1 + RvE1	96 h	n=10

Tabelle 7: Versuchsaufbau Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikatherapie (Versuchsteil 5.5.).

Versuchsgruppe			Untersuchungszeitpunkt p.i.	Gruppengröße
PBS	+ Kontrolle	+ Ampicillin	72 h	n=8
PBS	+ 18R-HEPE	+ Ampicillin	72 h	n=8
PBS	+ RvE1	+ Ampicillin	72 h	n=8
<i>S. pneumoniae</i>	+ Kontrolle	+ Ampicillin	72 h	n=10
<i>S. pneumoniae</i>	+ 18R-HEPE	+ Ampicillin	72 h	n=10
<i>S. pneumoniae</i>	+ RvE1	+ Ampicillin	72 h	n=10

4.2.7 Versuchsablauf der tierexperimentellen Untersuchungen

Zur Abbildung unterschiedlicher Stadien der Entzündungsreaktion im Rahmen pulmonaler Infektionen wurden die in Abb. 7-9 aufgeführten Mausmodelle verwendet. Dabei erfolgte die Applikation von RvE1 oder 18R-HEPE entsprechend der dargestellten Versuchsprotokolle (Abb. 7-9).

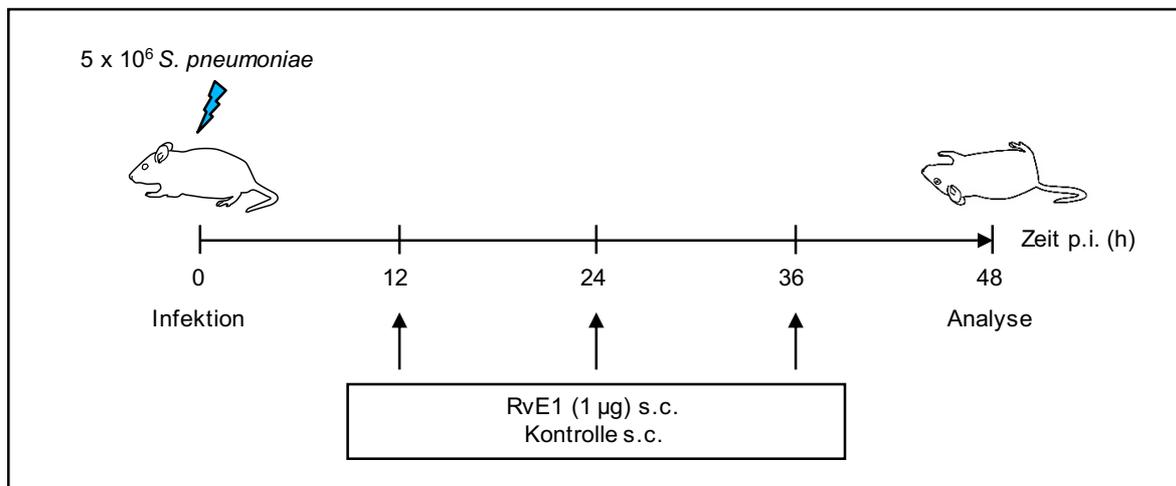


Abb. 7: Versuchsablauf im murinen Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie (Versuchsteil 5.3).

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h *post infectionem* subkutan mit RvE1 (1 µg) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h behandelt. Kontroll-infizierte Tiere erhielten PBS transnasal verabreicht. Die Analyse der gewonnenen Proben erfolgte 48 h p.i..

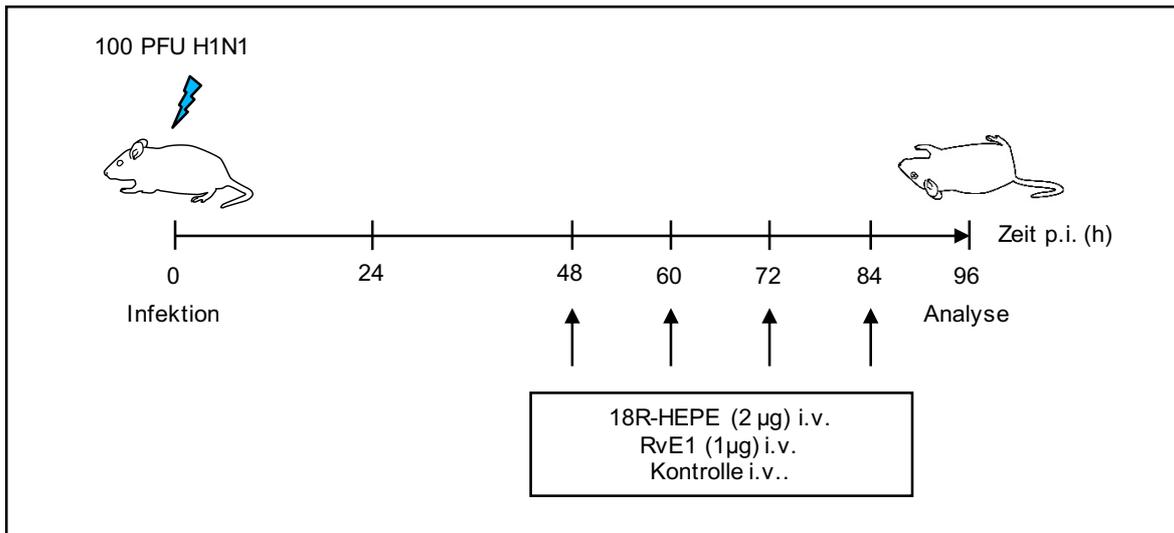


Abb. 8: Versuchsablauf im murinen Modell der frühen Influenzaviruspneumonie (Versuchsteil 5.4).

Mäuse wurden mit 100 *Plaque-forming units* (PFU) Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung. Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS infiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Analyse der gewonnenen Proben erfolgte 96 h p.i..

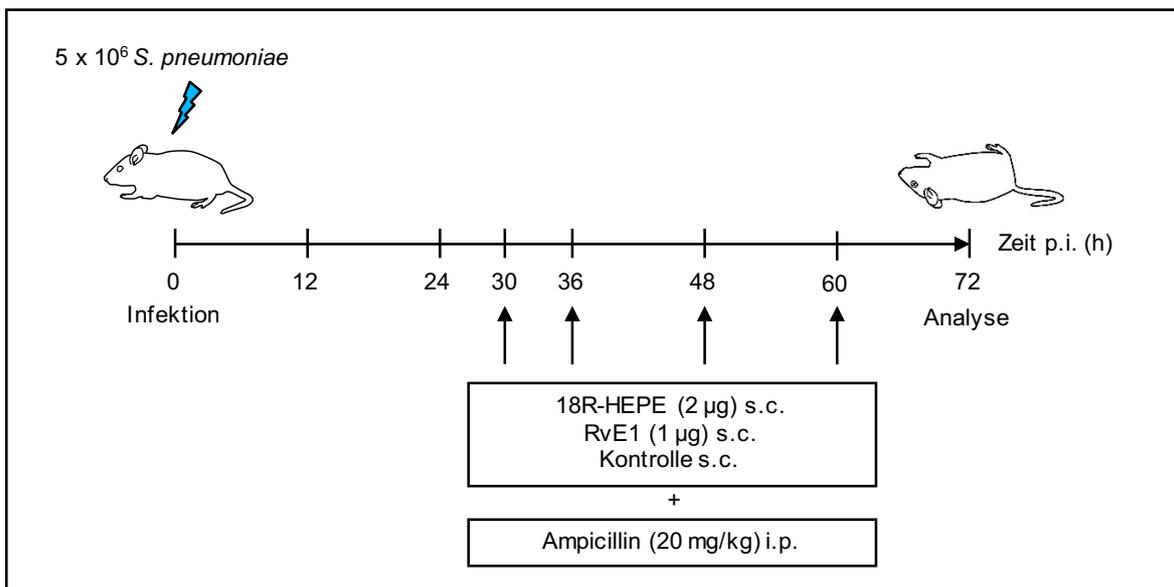


Abb. 9: Versuchsablauf im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung (Versuchsteil 5.5).

Mäuse wurden mit 5x10⁶ KbE *Streptococcus pneumoniae* oder PBS (Scheininfektion) transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 30 h p.i. erhielten die Mäuse eine subkutane Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung, die anschließend ab 36 h p.i. alle 12 h fortgeführt wurde. Darüber hinaus wurden alle Mäuse zu den gleichen Zeitpunkten mit Ampicillin (20 mg/kg) intraperitoneal behandelt. Die Analyse der gewonnenen Proben erfolgte 72 h p.i..

4.2.8 Versuchstiere

Zur Durchführung der Versuche wurden weibliche C57BL/6N Wildtypmäuse (Inzuchtstamm) im Alter von 8-10 Wochen und einem Gewicht von 18 g - 22 g verwendet. Die Tiere wurden spezifiziert-pathogen-frei (SPF) von Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie (Versuchsgruppe: *S.pn.* + RvE1) und im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung (Versuchsgruppe: *S.pn.* + Kontrolle + Ampicillin) wurde jeweils ein Tier von den Analysen ausgeschlossen, da es bereits vor Versuchsende eine Pneumoniesymptomatik entsprechend der vorab festgelegten Tötungskriterien zeigte und daher unmittelbar euthanasiert werden musste. Darüber hinaus wurden im Modell der frühen Influenzaviruspneumonie zwei Mäuse (Versuchsgruppe: PBS + Kontrolle) und eine Maus im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung (Versuchsgruppe: *S.pn.* + 18R-HEPE + Ampicillin) aufgrund eines technischen Fehlers bei der Durchführung der Infektion vom Versuch ausgeschlossen.

4.2.8.1 Tierhaltung

Die Tiere wurden während des Versuchszeitraums in Gruppen in geschlossenen und individuell ventilierten Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) gehalten, wobei den Tieren freier Zugang zu pelletiertem Futter und Wasser möglich war. Die tägliche Beleuchtungsphase betrug 12 Stunden.

4.2.9 Infektion mit *S. pneumoniae*

4.2.9.1 Vorbereitung

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

Für die Anzuchtung war zudem steriles fetales Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) erforderlich. Hierzu wurde FCS bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen steril aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Vor Gebrauch wurde das FCS aufgetaut und mittels eines Rotilabo Spitzenfilters mit einer Porengröße von 0,45 µm steril filtriert.

4.2.9.2 Bakterien

Bei dem verwendeten Bakterium handelt es sich um die Gattung *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978). Nach zweimaliger Bebrütung der Bakterien auf Columbia Blutagar mit 5 % Schafblut wurde ein Arbeitsstock in 1,5 ml Einfriermedium bestehend aus 80 % Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillon (und einem Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt) und 20 % Glycerol hergestellt und bei -80 °C gelagert.

4.2.9.3 Anzucht

Zur Anzucht wurde der Arbeitsstock aus der -80°C-Lagerung entnommen und durchgehend in einem tiefgekühlten Transportgefäß belassen. Die Bakteriensuspension wurde mittels einer Einweg-Plastiköse der Größe 1 µl auf eine Columbia Agarplatte mit 5 % Schafblut ausgebracht und 9-10 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Kurz vor Ende der Bebrütungszeit erfolgte die Herstellung des Anzuchtmediums aus 18 ml THY-Nährlösung und 2 ml sterilem FCS.

Unter Verwendung eines sterilen Wattestäbchens erfolgte anschließend die Abnahme und Überführung von mehreren Einzelkolonien in die 20 ml des angewärmten Anzuchtmediums. Dieser Vorgang wurde bis zum Erreichen einer gemessenen optischen Dichte (OD) von 0,03-0,04 wiederholt. Die Bestimmung der OD erfolgte im Photometer (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) bei einer Wellenlänge von 600 nm. Die entstandene Kockensuspension wurde anschließend noch einmal für ca. 2 h bei 37°C bebrütet, bis eine OD von 0,3 (Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *S. pneumoniae*) erreicht war. Nach Messung des Gesamtvolumens wurde die Suspension 10 min bei 3100 rpm zentrifugiert. Es wurde so viel Überstand wie möglich verworfen, das übrige Zentrifugat resuspendiert und dessen Volumen bestimmt. Die Errechnung der Bakterienkonzentration erfolgte unter Berücksichtigung der nach 2 h gemessenen OD, des Gesamtvolumens der Suspension und des resuspendierten Restvolumens an Zentrifugat. Hierbei entsprach eine OD von 0,1 einer Bakterienkonzentration von 1×10^8 KbE/ml. Zunächst wurde eine Suspension mit einer Konzentration von 1×10^9 KbE/ml (Stammlösung) hergestellt, die danach zur Herstellung der gewünschten Infektionsdosis (Infektionslösung) mit PBS (*phosphate buffered saline*) in mehreren Schritten weiter verdünnt und am Ende nochmals 1:2 mit 100 µl Hyaluronidase (Konzentration 9000 Units/ml) vermischt wurde.

Zur Kontrolle der korrekten Konzentration der Infektionslösung wurde diese nochmals verdünnt und auf Columbia Schafblutagar ausplattiert. Die Auszählung der Kolonien erfolgte nach 24 h erneuter Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂.

4.2.9.4 *Infektion der Tiere*

Nach Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse wurden die Mäuse durch die intraperitoneale (i.p.) Injektion eines Gemisches bestehend aus 80 mg/kg Körpermasse Ketamin und 25 mg/kg Körpermasse Xylazin verdünnt mit isotoner Kochsalzlösung narkotisiert. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung wurde den narkotisierten Tieren Thilo-Tears® Augengel (Alcon Pharma GmbH Freiburg) vorsichtig ohne direkten Kontakt auf die Augen aufgetragen. Nach Kontrolle der korrekten Narkosetiefe wurden die Versuchstiere unter der Sterilbank in vertikaler Position fixiert und jeder Maus 10 µl der zuvor hergestellten Infektionslösung transnasal in kleinen Tröpfchen pro Nasenloch (insgesamt 20 µl pro Maus) appliziert. Den scheininfizierten Mäusen wurden entsprechend 10 µl der PBS-Hyaluronidasemischung ohne Bakterien (nachfolgend nur als PBS bezeichnet) pro Nasenloch verabreicht. Im Anschluss wurden die Tiere zurück in den Käfig verbracht und während der Aufwachphase unter Rotlicht in einer ruhigen Umgebung regelmäßig überwacht.

4.2.10 Infektion mit Influenzavirus

Zur Virusinfektion wurden Viren des Stammes Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 verwendet, welche freundlicherweise von PD Dr. Thorsten Wolff vom Robert Koch Institut zur Verfügung gestellt wurden. Die bei -80°C gelagerte Virusstammlösung mit einer Konzentration von $8,4 \times 10^9$ Plaque-bildenden Einheiten (*plaque forming units*, PFU) pro Milliliter (PFU/ml) wurde nach dem Auftauen schrittweise mit PBS verdünnt. Nach Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse wurde jedes Versuchstier einzeln in eine Narkosekammer verbracht und mit 5% Isofluran narkotisiert. Nach Erreichen der Narkosetiefe wurden je 25 µl der Infektionslösung pro Nasenloch langsam transnasal appliziert (Infektionsdosis insgesamt: 100 PFU/Tier). Nicht-infizierte Kontrolltiere erhielten entsprechend 50 µl PBS nach gleichem Prinzip.

4.2.11 Verabreichung der eingesetzten Therapeutika

4.2.11.1 *Resolvin E1 Applikation*

In allen Tierversuchsmodellen dieser Arbeit erfolgte eine Behandlung mit Resolvin E1 (5S, 12R, 18R-Trihydroxy-6Z, 8E, 10E, 14Z, 16E-EPA, Cayman Chemical, *Item No.* 10007848) entsprechend des jeweiligen Versuchsaufbaus (Abb. 7-9), frühestens aber 12 h *post infectionem* (p.i.). Die RvE1-Stammlösung (0,1 mg/ml in 100% Ethanol)

wurde 1:2 mit 100%igem Ethanol (EMPROVE®, Merck, ≥ 99,5%, gemäß PhEur, BP, JP, USP, Index-Nr. 603-002-00-5100%) verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die RvE1-Aliquots (je 20 µl) wurden erst unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, jeweils mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung auf 200 µl (subkutane Behandlung) oder 100 µl (intravenöse Behandlung) verdünnt und jeweils 1 µg pro Maus subkutan (s.c. 200 µl/Maus) oder intravenös (i.v. 100 µl/Maus) appliziert (Abb. 10). Die Kontroll-behandelten Tiere erhielten entsprechend 20 µl Ethanol (EMPROVE®, Merck, ≥ 99,5%, gemäß PhEur, BP, JP, USP, Index-Nr. 603-002-00-5) verdünnt mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (nachfolgend als Kontrolllösung bezeichnet) subkutan (200 µl/Maus) oder intravenös (100 µl/Maus) verabreicht.

4.2.11.2 *18R-HEPE Applikation*

Der Bezug von 18R-HEPE (*18R-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-EPA*, Item No. 32840) erfolgte ebenfalls über Cayman Chemical. Die 18R-HEPE-Stammlösung (0,1 mg/ml in 100% Ethanol) wurde steril aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die 18R-HEPE-Aliquots (je 20 µl) wurden erst unmittelbar vor Gebrauch aufgetaut, jeweils mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung auf 200 µl (subkutane Behandlung) oder 100 µl (intravenöse Behandlung) verdünnt und jeweils 2 µg pro Maus subkutan (s.c. 200 µl/Maus) oder intravenös (i.v. 100 µl/Maus) appliziert (Abb. 10). Die Kontroll-behandelten Tiere erhielten entsprechend 20 µl Ethanol (EMPROVE®, Merck, ≥ 99,5%, gemäß PhEur, BP, JP, USP, Index-Nr. 603-002-00-5) verdünnt mit steriler physiologischer Kochsalzlösung (nachfolgend als Kontrolllösung bezeichnet) subkutan (200 µl/Maus) oder intravenös (100 µl/Maus) verabreicht.

4.2.11.3 *Antibiotikaapplikation*

Ampicillin wurde als Trockensubstanz von der Ratiopharm GmbH (Ampicillin Ratiopharm® 0,5 g, Ratiopharm GmbH, Ulm) bezogen. Die Tiere in Versuchsteil 5.5 erhielten pro intraperitonealer (i.p.) Injektion 20 mg/kg Ampicillin gelöst in 200 µl isotoner Kochsalzlösung (Natriumchloridlösung, 0,9 % B.Braun Melsungen AG, Melsungen) (Abb. 10).

4.2.12 Klinische Überwachung der infizierten Tiere

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde über den gesamten Versuchszeitraum zweimal täglich im Abstand von 12 h überwacht. Zusätzlich erfolgte die Messung von Körpertemperatur und Körpermasse. Für den Fall, dass die Erkrankung bei einem Tier wider Erwarten vor Versuchsende soweit fortgeschritten war, dass absehbar war, dass sein Leiden ein ethisch vertretbares Maß überschreiten wird, wurde das Tier anhand

der vorab festgelegten Tötungskriterien (siehe Tabelle 8) mittels intraperitonealer Ketamin/Xylazin-Injektion tief narkotisiert und durch anschließende zervikale Dislokation getötet.

Die Beurteilung des klinischen Zustands erfolgte anhand der Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren (siehe Tabelle 8), die auf Grundlage der „Empfehlungen der Berliner Tierschutzbeauftragten zu Score Sheet und Abbruchkriterien“ (Stand 01.06.2013) versuchs- und modellspezifisch vorab festgelegt wurde.

Tabelle 8: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung.

Tiernummer: Versuchsbeginn: Ausgangsgewicht:	Kat.	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit
<u>Beobachtung in Ruhe im Käfig</u>				
Tier isoliert sich	A			
Struppiges/ungepflegtes Fell	A			
Verhaltens-/und Haltungsauffälligkeiten	A			
Augen (krustige Belege, Augenausfluss)	B			
Atmung n/t/s *	-/B/C			
Krämpfe, Torkeln, Apathie	C			
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen, beim Anfassen)	C			
<u>Beim Umsetzen</u>				
Tier vermeidet Bewegung / Reaktionsminderung auf äußeren Reiz	A			
Fehlstellung der Zähne	A			
<u>Äußere Veränderungen:</u>				
Verletzungen Hautveränderungen (A)** / Abszesse, äußerlich sichtbare Infektionen, Ödeme, Automutilation (B)**	A/B			
Hautfalten bleiben stehen	B			
Leib hart und aufgetrieben	B			
<u>Körpertemperatur-Bestimmung [°C]</u>				
Hypothermie (Körperkerntemperatur < 35°C)	B			
<u>Körpermasse-Bestimmung [g]</u>				
Körpermasseabnahme ab 10%	A			
Körpermasseabnahme ab 20%	B			
Körpermasseabnahme = 25%	C			

Legende: * Atmung: n = normal; t = beschleunigt/ flach (gilt als Kategorie B); s = schwerfällige/ stark pumpende Atmung (gilt als Kategorie C), ** Kategorie + Beschreibung der Veränderung eintragen

Tötungskriterien (nach Kategorien):

A oder B Tier weiter beobachten.

B in Kombination mit Torkeln, Schmerzen oder Apathie: Tier unverzüglich schmerzlos töten

C Tier unverzüglich schmerzlos töten

4.2.13 Präparation der Tiere und Probenentnahme

4.2.13.1 *Präparation der Mäuse*

Vor Präparationsbeginn erfolgte nochmals die Beurteilung des klinischen Zustandes des Versuchstieres. Zudem wurden Körpertemperatur und Körpermasse (KM) bestimmt. Anschließend wurde die Maus mit einem Gemisch aus 160 mg/kg KM Ketamin und 75 mg/kg KM Xylazin verdünnt in isotoner Kochsalzlösung narkotisiert. Durch die Überprüfung des Lidreflexes, Zwischenzehenreflexes und Schmerzreflexes wurde die korrekte Narkosetiefe sichergestellt. Der Operationsbereich wurde daraufhin

mit Braunol® 7,5% gereinigt und das Tier in Rückenlage auf einer Styroporunterlage fixiert. Es erfolgte ein medianer Hautschnitt vom Xyphoid bis zur Mandibula und anschließend die Darstellung der Trachea, welche kaudal des Larynx eröffnet wurde. Mit Hilfe einer zuvor gefertigten Ligatur wurde die nachfolgend eingeführte Trachealkanüle fixiert. Nun wurde die Maus über den gesamten Versuchszeitraum mit einem Beatmungsgerät für Kleinnager mit Raumluft (150 Atemzüge pro Minute und 150 µl Tidalvolumen) beatmet.

Nach medianer Laparotomie bis zum Xyphoid und Anlegen von seitlichen Entlastungsschnitten wurde das Zwerchfell eröffnet und 50 µl Heparin (25.000 I.E./ml 1:1 verdünnt mit isotoner Natriumchloridlösung, 0,9 %) direkt in die rechte Herzkammer appliziert. Anschließend erfolgte, mit oder ohne vorherige Blutentnahme, nach Eröffnen der *Vena cava caudalis* ein rasches Entbluten mit sofortigem Herz- / Kreislaufstillstand. Das Diaphragma wurde vollständig von der Brustwand gelöst, der Brustkorb entlang des Brustbeines eröffnet und beide Thoraxhälften nach vorsichtiger Entfernung von Verklebungen und Verwachsungen der Pleura auf der Styroporunterlage seitlich fixiert. Danach wurde der Thymus entfernt und eine lockere Ligatur um die *Arteria pulmonalis* gelegt. Mit Entfernung der Herzspitze wurden die Herzkammern eröffnet und mittels einer Pinzette vorgedehnt. Eine spezielle Pulmonalarterienkanüle wurde über die rechte Herzkammer in den *Truncus pulmonalis* vorgeschoben und mittels vorgelegter Ligatur fixiert.

Anschließend wurde die Lunge 1 min mit steriler Natriumchloridlösung (0,9 %) mittels einer Rollenpumpe mit einer Flussrate von 1 ml/min perfundiert, um das Blut aus dem pulmonalen Gefäßbett zu entfernen. Abschließend wurden die Organe für die anstehenden Untersuchungen entnommen.

4.2.13.2 *Durchführung der Blutentnahme*

Zur aseptischen Blutentnahme erfolgte im beschriebenen Verlauf der Präparation die Punktion der *Vena cava caudalis*.

4.2.13.3 *Durchführung der bronchoalveolären Lavage*

Nach beendeter Perfusion und Beatmung der Lunge wurde diese zweimal mit jeweils frischen 800 µl eiskaltem PBS, welchem Protease-Inhibitoren (1 Tablette Complete™ Mini, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, gelöst in 10 ml PBS) zugesetzt wurden, vorsichtig und gleichmäßig gespült. Die zurückgewonnene bronchoalveoläre Flüssigkeit (BALF 1 und BALF 2) wurde nach Bestimmung des Gesamtvolumens in 5 ml-Polypropylen Round-Bottom Tubes gegeben und unmittelbar weiterverarbeitet.

4.2.13.4 *Entnahme der Lunge*

Im Anschluss an die Präparation der Maus wurden die Lungenlappen unter Schonung des Gewebes und Aussparung von Hilus und ortsständigen Lymphknoten entnommen. Danach erfolgte die Zerkleinerung des Lungengewebes unter Zuhilfenahme einer sterilen spitzen Präparationsschere. Anschließend wurde das vermischte Lungenhomogenat in zwei gleichgroße Teile eingewogen, wovon eine Hälfte für die Bestimmung der Erregerlast verwendet wurde. Der zweite Teil wurde entweder zur Differenzierung der Leukozyten im Lungengewebe (Versuchsteil 5.4) genutzt oder in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C.

4.2.14 Bestimmung der Bakterienlast in BALF, Lungengewebe und Blut

4.2.14.1 *Bakterienlast der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit*

Zur Bestimmung der Bakterienlast in der BALF wurden 10 µl der puren zurückgewonnenen Lavageflüssigkeit sowie je 10 µl einer 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000 Verdünnung (in sterilem PBS) auf Columbia Blutagarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach der anschließenden Auszählung der KbE erfolgte die Berechnung der Bakterienlast unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe.

4.2.14.2 *Bakterienlast der Lunge*

Eine Hälfte des hergestellten Lungenhomogenats (wie unter 4.11.4 beschrieben) wurde direkt in einem Medikamentenbecher mit 1 ml sterilem PBS vermischt und in ein BD Falcon™ Zellsieb (100 µm), welches auf ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgesetzt war, gegeben. Der Medikamentenbecher wurde nochmals mit PBS gespült bis keine Gewebereste mehr enthalten waren. Mit Hilfe eines 2 ml-Spritzenkonus wurde das zerkleinerte Lungengewebe durch das Zellsieb gedrückt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend wurde das BD Falcon™ Zellsieb (100 µm) in mehreren Zwischenschritten mit PBS gespült, bis nur noch Bindegewebe zurückblieb. Die Organsuspension wurde mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt und gründlich gerüttelt. Je 10 µl der Organsuspension wurden pur sowie in einer Verdünnung von 1:10, 1:100 und 1:1.000 auf vorgewärmte Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Anschließend erfolgte die Auszählung der KbE und die Berechnung der Bakterienlast der gesamten Lunge unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsstufe, der eingesetzten Probenmenge von 10 µl und verwendeten Gewebemenge.

4.2.14.3 *Bakterienlast des Blutes*

Um die Bakterienlast im Blut zu bestimmen, wurden je 10 µl Blut pur sowie in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 auf Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut ausplattiert und für 18 h bei 37°C und 5 % CO₂ bebrütet. Nach der anschließenden Auszählung der KbE erfolgte die Berechnung der Bakterienlast unter Berücksichtigung der eingesetzten Probenmenge sowie der jeweiligen Verdünnungsstufe.

4.2.15 Bestimmung der Viruslast im Lungengewebe

Im Modell der frühen Influenzapneumonie wurde die Anzahl infektiöser, vermehrungsfähiger Influenzaviren im Lungengewebe mittels Virus-Plaque-Assay bestimmt. Die so ermittelte Viruskonzentration wird als Plaque-bildende Einheit (engl. *plaque forming unit*, PFU) pro ml angegeben.

Dafür wurde eine Hälfte des hergestellten Lungenhomogenates (wie unter 4.11.4 beschrieben) in Lysing Matrix D Röhrchen (2ml, #116913050-CF, MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) mit 1 ml eiskaltem PBS (mit MgCl₂ und CaCl₂) überschichtet und anschließend im MP Biomedicals™ FastPrep-24 Instrument (MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) mit 6,0 m/sek gekühlt in 3-4 Zyklen zu je 30 sek homogenisiert. Danach wurden die Lungenhomogenate bei 6000 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und jeweils 500 µl des Überstandes in ein neues steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Viruslast wurden *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells* (MDCK-II-Zellen) benutzt, welche in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert wurden. Um zytotoxische Effekte durch das DMSO im Gefriermedium zu vermeiden, wurden die Zellen unmittelbar nach dem Auftauen in MEM Kulturmedium (*minimal essential medium*, versetzt mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Steptomycin) überführt und in T75 Zellkulturflaschen ausgesät. Danach erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ bis ein konfluenten Zellrasen (*monolayer*) entstand. Nach Entfernung des Mediums wurden die MDCK-II-Zellen mit PBS gewaschen und mittels 2 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Nach Zugabe von 8 ml frischem MEM-Zellkulturmedium wurden die Zellen geerntet und jeweils 250 µl der entstandenen Zellsuspension mit 1 ml MEM Kulturmedium in 12-Well Zellkulturplatten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Bei Konfluenz des Zellrasens wurden die Lungenprobenüberstände auf Eis aufgetaut und eine Verdünnungsreihe (jeweils 1:10)

mit PBS (unter Zugabe von 0,2 % BSA, 1 mM MgCl₂, 0,9 mM CaCl₂, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) hergestellt. Anschließend wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 150 µl der Probenverdünnungen für 45 min bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schwenken der Platten inkubiert. Danach wurde die Probenlösung entfernt und die MDCK II Zellen mit 1 ml Avicel-Medium (bestehend aus 486 µl 2,5 % Avicel®-Suspension, 486 µl 2XMEM, 6,7 µl 30 % BSA, 10 µl 5 % NaHCO₃, 10 µl 1 % Dextran, 1 µl TPCK Trypsin [1mg/ml]) beschichtet. Die infizierten Zellen wurden anschließend für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei verhinderten die enthaltenen mikrokristallinen Zellulosepartikel im Avicel-Medium die freie Diffusion neugebildeter Viren, wodurch die freigesetzten Viren ausschließlich angrenzende Zellen infizierten und es bei geeigneter Verdünnung zur Ausbildung der typischen kreisrunden Löcher im Zellrasen (=Virusplaques) kam. Nach der Inkubation wurde das Avicellmedium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Abschließend erfolgte eine Fixation und Färbung des Zellrasens mit je 400 µl Färbelösung (0,1 % Kristallviolett, 2 % Ethanol, 9 % Formaldehyd). Nach etwa 20 min wurde die Färbelösung entfernt und die entstandenen Plaques ausgezählt. Die Berechnung der Viruslast in der gesamten Lunge erfolgte unter Berücksichtigung des eingesetzten Volumens pro Vertiefung, der jeweiligen Verdünnungsstufe und verwendeten Gewebemenge.

4.2.16 Leukozytendifferenzierung in BALF und Lungengewebe

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) ist eine Zelltypisierung anhand von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften der Einzelzellen möglich. Die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen und Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils*, PMN), Alveolarmakrophagen und inflammatorischen Monozyten erfolgte im BD FACSCanto™ (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) anhand ihrer Eigenschaften in der Seitwärtsstreuung (*Side-Scatter*, SSC), der Vorwärtsstreuung (*Forward-Scatter*, FSC) sowie anhand des durch die spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 7) entstandenen Färbemusters. Zur Messung und Auswertung wurde die BD FACS Diva Software 8.0.1 verwendet.

4.2.16.1 Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die BALF 1 und 2 wurden direkt nach der Entnahme zentrifugiert (2200 rpm, 10 min, 4°C), die Überstände jeweils abpipettiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und

bei -80°C gelagert. Die beiden verbliebenen Zellpellets wurden gepoolt und anschließend in insgesamt 1 ml PBS mit 0,2 % Bovinem Serum Albumin (BSA) suspendiert. Die Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl erfolgte mittels manueller Auszählung in der Neubauerkammer (Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie) oder über die durchflusszytometrische Erfassung von sogenannten *Counting Beads* (Modell der frühen Influenzaviruspneumonie und Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung).

Zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie wurde die Neubauerzählkammer mit 5 µl eines Zellgemisches, welches aus 5 µl der gepoolten Zellsuspension der BALF sowie 5 µl Methylenblau bestand, befüllt. Es erfolgte die Auszählung von 4 Großquadraten zu je 16 Kleinquadraten. Die mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat errechnete sich anhand folgender Formel: [Leukozytenzahl in 4 Großquadraten / 4]. Anschließend wurde die Gesamtleukozytenzahl der entnommenen BALF (Gesamtvolumen BALF1 + BALF 2) unter Verwendung der Berechnungsformel [(mittlere Leukozytenzahl pro Großquadrat) x 2 x 10 000] ermittelt.

Die Zellsuspension wurde anschließend mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 4 ml aufgefüllt und zur Zellwäsche erneut bei einer Drehzahl von 1500 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 100 µl eiskaltem PBS mit 0,2 % BSA und 1 µg / 100 µl anti-CD16/CD32 Antikörper zur Blockierung unspezifischer Immunglobulinrezeptoren für 5 min bei 4°C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde der Antikörper-Mastermix mit den zu verwendenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern gemäß Tabelle 9 hergestellt.

Tabelle 9: Antikörper-Master-Mix zur Färbung von Leukozyten in BALF und Lungengewebe.

Antikörper/ konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	Je Probe (100 µl)
CD11b/ PE-Cy7	0,8 µl
F4/80/ PE	0,8 µl
Ly6G/ PerCP-Cy5.5	0,8 µl
Ly6C/ V450	0,8 µl
CD11c/ Cy5	0,4 µl
MHCII/ Alexa Fluor 700	0,15 µl
PBS + 0,2 % BSA	16,25 µl

Anschließend wurden jeweils 20 µl des Antikörper-Master-Mixes zu den resuspendierten BALF-Zellen zugefügt, vorsichtig vermischt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in reinem PBS wurden danach jeweils 800 µl 2%iges Formaldehydlösung (Methanol-frei, mit PBS verdünnt) zur Fixierung der Antikörper zur Probe hinzugefügt und diese noch einmal für weitere 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend erneut mit kaltem PBS aufgefüllt und 5 min mit 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 300 µl PBS mit 0,2 % BSA resuspendiert, und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Vor der Analyse der Zellsuspension im Durchflusszytometer wurden im Modell der frühen Influenzaviruspneumonie und im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl noch 50 µl *CountBright™ Absolute Counting Beads*, die zuvor 1:10 in PBS mit 0,2 % BSA verdünnt wurden, zur Zellsuspension gegeben.

Die Gesamtleukozytenzahl wurde nach Analyse der BALF-Zellen im Durchflusszytometer anhand der zugegebenen definierten Konzentration an *Counting Beads* und dem pro Zeiteinheit gemessenen Verhältnis der Leukozyten zu *Counting Beads* berechnet. Die Berechnung der absoluten Zahl der Alveolarmakrophagen, inflammatorischen Monozyten und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten bezogen auf 1 ml BALF erfolgte anschließend anhand der Gesamtleukozytenzahl, des Gesamtvolumens der entnommenen BALF und der prozentualen Anteile der Leukozytenpopulationen.

4.2.16.2 *Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl und Leukozytendifferenzierung im Lungengewebe*

Die im Modell der frühen Influenzaviruspneumonie gemäß 4.11.4 zerkleinerte und eingewogene eine Hälfte des Lungenhomogenates wurde 30 min bei 37°C in 6 ml RPMI mit 10 % FCS, 6 mg Kollagenase und 2 mg DNase unter rüttelnden Bewegungen verdaut. Zur Vereinzelnung der Zellen und ihrer Trennung vom Bindegewebe wurde der Verdauansatz anschließend mit einem 2 ml-Spritzenkonus durch ein 100 µm-Zellsieb in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gedrückt. Das Sieb wurde danach mehrmals mit Medium (RMPI, 10 % FCS) gespült und die Einzelzellsuspension auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und dekantiert. Das verbleibende Zellpellet wurde in 2 ml Erylysepuffer (destilliertes H₂O mit 0,01 M KHCO₃, 0,155 M NH₄Cl und 0,1 mM EDTA, pH 7,5) zur Lyse der Erythrozyten resuspendiert. Nach zweiminütiger Inkubation wurde der Vorgang durch Zugabe von 18 ml PBS mit 0,2 % BSA gestoppt. Es schloss sich eine erneute Zentrifugation von 5 min bei 1500 rpm an. Das Zellpellet wurde abschließend mit 1 ml PBS und 0,2 % BSA resuspendiert. Zur anschließenden FACS-Analyse wurden 100 µl der Suspension zur Antikörperfärbung verwendet.

Die Färbung der Lungenzellsuspension wurde analog zur Bestimmung der Leukozytensubpopulationen in der BALF, wie unter 4.14.1 bereits beschrieben, durchgeführt. Vor der Analyse der Zellsuspension im Durchflusszytometer wurden zur Bestimmung der Gesamtleukozytenzahl noch 50 µl *CountBright™ Absolute Counting Beads*, die zuvor 1:2 in PBS mit 0,2 % BSA verdünnt wurden, zur Zellsuspension gegeben.

4.2.17 Leukozytendifferenzierung im Blut

Die Differenzierung der Blutleukozyten erfolgte ebenfalls mittels Durchflusszytometrie. Hierzu wurden 50 µl der Vollblutprobe sofort nach Entnahme in ein EDTA-Blutröhrchen überführt. Im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie erfolgte die Differenzierung und Auswertung der Blutleukozyten mit Hilfe des Hämatologie-Analysators scil Vet abc™ der Firma scil vet und der scil vIP Manager V2.0 Software (scil animal care company GmbH). Die Bedienung des Gerätes, die Messung der Proben und Auswertung erfolgte hierbei strikt entsprechend der Herstellervorgaben. Aus technischen Gründen kam es bei der Analyse der Blutleukozyten im scil Vet abc™ zu abweichenden Gruppengrößen.

Im Modell der frühen Influenzaviruspneumonie, sowie im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung erfolgte die Quantifizierung der Gesamtlymphozyten, B- und T-Lymphozyten, inflammatorischer Monozyten und neutrophiler Granulozyten im Blut mittels BD FACSCanto™ anhand ihrer Eigenschaften in der Seitwärtsstreuung (Side-Scatter, SSC), der Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter, FSC), sowie anhand des durch die spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 10) entstandenen Färbemusters. Zur Messung und Auswertung wurde die BD FACS Diva Software 8.0.1 verwendet. Durch die durchflusszytometrische Messung von zugesetzten *CountBright™ Absolute Counting Beads* (1:2 verdünnt in PBS + 0,2 % BSA) wurde die Gesamtleukozytenzahl pro μl Blut bestimmt.

In einem ersten Schritt wurden die Erythrozyten der antikoagulierten Vollblutproben mittels Zugabe von 500 μl Erylysepuffer für 3 min Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde der Vorgang durch Zugabe von PBS mit 0,2 % BSA gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 1500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand unter Schonung der Zellpellets dekantiert. Nach einem erneuten Waschritt erfolgte die Resuspension der Zellsuspension in 100 μl des nach Tabelle 10 hergestellten Antikörper-Master-Mixes und die Inkubation der Zellen für 15 min bei 4°C im Dunkeln. Nach erneutem Waschen der Zellen in reinem PBS wurden 800 μl 2%ige Formaldehydlösung (Methanol-frei, mit PBS verdünnt) zur Fixierung der Antikörper zur Probe hinzugefügt und diese noch einmal für weitere 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend erneut mit kaltem PBS aufgefüllt und 5 min mit 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 300 μl PBS mit 0,2 % BSA resuspendiert, und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Berechnung der Gesamtleukozytenzahl erfolgte je μl Blut wie unter 4.14.1 beschrieben. Die Bestimmung des Anteils der Lymphozyten, B- und T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten erfolgte je μl Blut anhand des Vorwärtsstreulichtes (forward scatter, FSC), des Seitwärtsstreulichtes (side scatter, SSC) und dem Muster der Antikörperfärbung.

Tabelle 10: Antikörper-Master-Mix zur Färbung von Leukozyten im Blut.

Antikörper/ konjugierter Fluoreszenzfarbstoff	je Blutprobe
CD45/ PerCP	2 µl
CD3/ Alexa Fluor 700	2 µl
CD19/ PE	2 µl
Ly6G/ FITC	2 µl
Ly6C/ V450	2 µl
CD11b/ PECy7	2 µl
CD11c/ APC	2 µl
PBS + 0,2 % BSA	86 µl

4.2.18 Quantifizierung der Zytokine in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Quantifizierung der Zytokine in der BALF wurde unter Anwendung der ProcartaPlex Multiplex Immunoassay Technologie der Firma eBioscience durchgeführt. Hierbei wurden folgende Zytokine untersucht: IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10, MCP-1, IFN- γ , IFN- α und IL-18.

Für jeden Versuchsteil wurden die zur Verfügung stehenden BALF-Proben in Duplikaten jeweils auf einer 96-Well-Platte gleichzeitig gemessen, um die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu sichern. Daher war die Zahl der möglichen BALF-Überstände pro Messdurchgang begrenzt, wodurch es zum Teil zu abweichenden Gruppengrößen kam.

Für die Analyse der Zytokinkonzentration in der BALF wurden die bei -80 °C gelagerten Überstände der BALF 1 langsam bei 4°C aufgetaut und auf Eis gelagert.

Die Durchführung des *Procartaplex*TM erfolgte strikt nach Herstellerangaben. Dabei wurden alle Arbeitsschritte gemäß der im Testkit beiliegenden Anleitungen durchgeführt. Die verwendeten Puffer sowie Standardverdünnungen wurden ebenfalls nach Herstellerangaben angefertigt. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate aufgetragen und die erhaltenen Werte anschließend gemittelt. Die Analyse der Proben sowie die anschließende Auswertung erfolgte mittels Bio-Plex Array Reader mit der Bioplex Manager 6.0 Software.

4.2.19 Ermittlung der pulmonalvaskulären Permeabilität

Zur Quantifizierung der endo-epithelialen Schrankenstörung in der Lunge wurde das murine Serumalbumin (MSA) mittels ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA) im Überstand der BALF 1 und im Plasma in geeigneter Verdünnung quantifiziert. Die bei -80 °C gelagerten Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und umgehend verarbeitet. Die Durchführung des ELISA erfolgte strikt nach Herstellerangaben. Es konnte nur Daten von Tieren erhoben werden, von denen sowohl BALF als auch Plasmaproben zur Verfügung standen. Daher kam es zu abweichenden Gruppengrößen.

Zuerst wurde der erste Antikörper in geeignetem Puffer (*Coating Buffer*: 0,05 M Na₂CO₃, pH 9,6) verdünnt und auf eine 96 - *Well* Platte gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die 96 - *Well* Platte mehrfach mit Waschpuffer (50 mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 0,05 % Tween20) gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen wurde für 30 Minuten ein geeigneter Puffer (*Postcoat Buffer*: 50 mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 1 % BSA) aufgetragen. Im Anschluss wurden Proben und Standards in geeignetem Puffer (*Sample Buffer*: 50 mM Tris-Base, 0,14 M NaCl, 1 % BSA, 0,05 % Tween20) zunächst verdünnt und dann aufgetragen. Danach wurde die Platte für eine weitere Stunde inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen wurde der zweite Antikörper in die 96 - *Well* Platte pipettiert und es wurde wiederum für eine Stunde inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurde anschließend das Enzymsubstrat Tetramethylbenzidine Liquid Substrat (TMB) aufgetragen. Nachdem der Farbumschlag erfolgt war, wurde die Reaktion mittels 2 molarer Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der OD erfolgte bei 450 nm im Anthos ht2 Mikroplatten Photometer mit zugehöriger Software. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme der Herstellerangaben sowie unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnungen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate aufgetragen und die erhaltenen Werte anschließend gemittelt. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Herstellerangaben. Anschließend wurde das MSA-BALF/Plasma-Verhältnis berechnet, um eine Aussage über die Schädigung der alveolokapillären Barrierefunktion zu erhalten.

4.2.20 Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung aller Daten wurde mithilfe des Graphik- und Statistikprogramms GraphPad Prism 8.0 (Graph Pad Software Incorporated, San Diego, California, USA) durchgeführt.

Die Daten wurden als arithmetischer Mittelwert (mean) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Analyse der Messwerte erfolgte für Versuchsreihen mit nur zwei experimentellen Gruppen zu einem einzigen Zeitpunkt mit dem two-tailed Mann-Whitney U-Test. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Testung mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns *post-hoc* Test für relevante Gruppen. Die Auswertung der Körpermasse und Körpertemperatur wurde anhand des Vergleichs von mehr als zwei Versuchsgruppen mit mehreren, zeitlich aufeinanderfolgenden Messungen unter Verwendung der Two-Way *repeated measures (RM)* ANOVA und Tukeys *multiple comparisons* Test durchgeführt. Dabei wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Lokalisation von BLT-1 und ChemR23 in der humanen Lunge

ChemR23 und BLT-1 werden als RvE1-Zielrezeptoren unter anderem auf Epithelzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert (85, 135). Auch im Zellverband muriner Lungengewebschnitte gelang eine Anfärbung von BLT-1 und ChemR23 in vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung). Nun sollte erstmals der immunhistologische Nachweis erbracht werden, dass RvE1-Zielrezeptoren auch in humanen Lungengewebschnitten vorhanden sind und RvE1 demnach prinzipiell rezeptorvermittelte Wirkungen auch in der humanen Lunge entfalten kann. Um das Verteilungsmuster von BLT-1 und ChemR23 im Lungengewebe des Menschen, insbesondere bei strukturellen Zellen sowie Zellen der angeborenen Immunität zu visualisieren, wurden uns freundlicherweise fixierte Lungenproben von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hocke (gemäß den Ausführungen in Kapitel 4.4. Material und Methoden) immunhistologisch gefärbt. Anschließend erfolgte die Analyse dieser Schnitte mittels Konfokalmikroskopie durch Frau Dr. Reppe und Frau Dr. Gutbier unter Aufsicht von Prof. Dr. Hocke.

Die mikroskopische Begutachtung der Proben anhand der DAPI Färbung (blaues Fluoreszenzsignal in Abb. 10) zeigte Lungenausschnitte mit intakter Kernmorphologie. Eine zusätzliche immunhistologische Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (grünes Fluoreszenzsignal in Abb. 10) machte die Verteilung von BLT-1 und ChemR23 in den humanen Lungengewebschnitten sichtbar. Dabei emittierten Alveolar- und Bronchialepithelzellen, Endothelzellen sowie Alveolarmakrophagen nach Färbung mit spezifischen anti-BLT-1-Antikörpern positive Signale (Abb. 10A-D). Das grüne Fluoreszenzsignal der anti-ChemR23-spezifischen Antikörper wurde bei Alveolarepithel- und Endothelzellen sowie Alveolarmakrophagen (Abb. 10E-G) nachgewiesen. Zusammengefasst gelang die Sichtbarmachung beider Zielrezeptoren auf wichtigen strukturellen Zellen des bronchoalveolären Raums sowie auf ortsständigen Zellen der pulmonalen angeborenen Immunität.

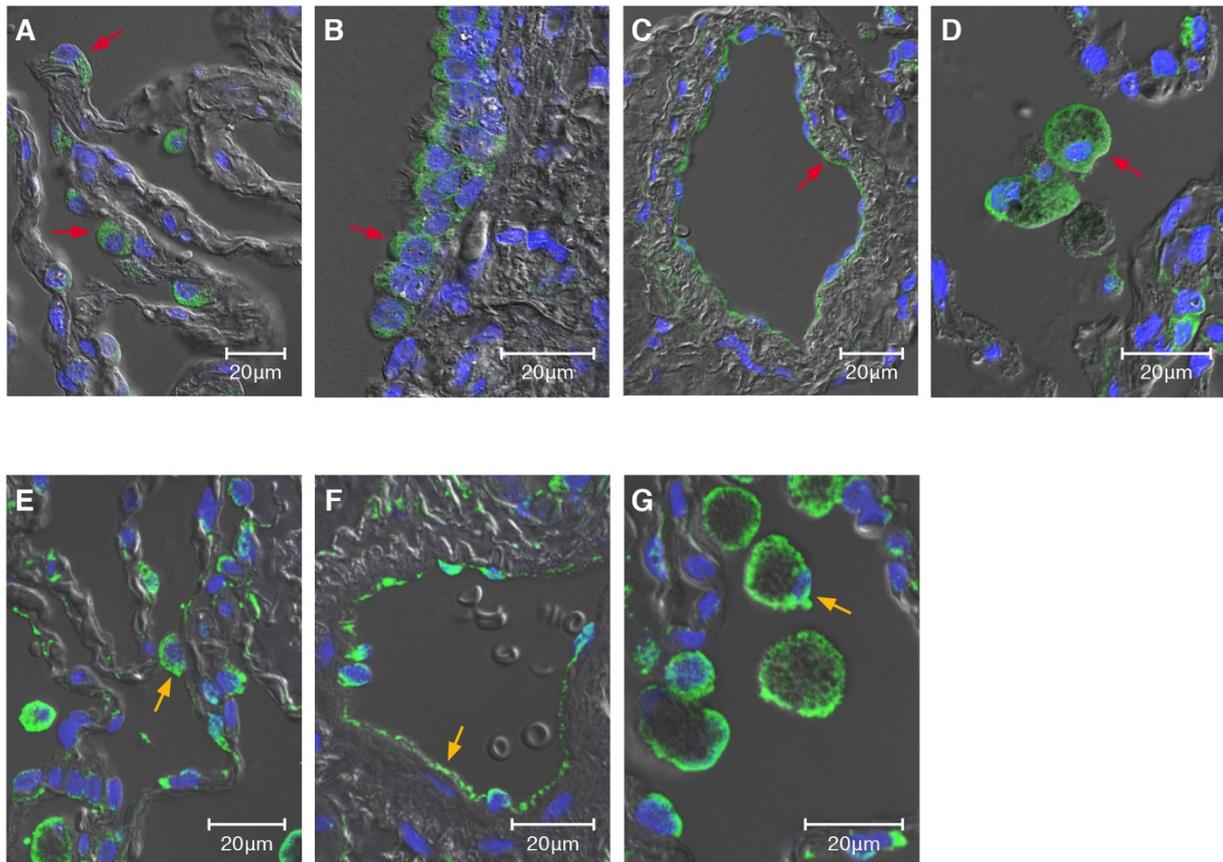


Abb. 10: Immunhistologische Färbung von BLT-1 und ChemR23 in humanem Lungengewebe.

Humane Lungengewebsproben wurden für die immunhistologische Analyse fixiert, gegen BLT-1 (A-D) oder ChemR23 (E-G) gefärbt (grün) und mittels Konfokalmikroskopie analysiert. Alveolarepithel- (A), Bronchialepithel- (B) und Endothelzellen (C) sowie Alveolarmakrophagen (D) emittierten positive Signale der anti-BLT-1-Antikörper (rote Pfeile). Signale der spezifischen anti-ChemR23-Antikörper wurden bei Alveolarepithel- (E) und Endothelzellen (F) sowie Alveolarmakrophagen (G) detektiert (orange Pfeile). Die Lungenstruktur (grau) wurde mit Hilfe des Differentialinterferenzkontrastes und Zellkerne durch eine DAPI Färbung (blau) sichtbar gemacht. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der anti-BLT-1- und anti-ChemR23-Färbung von je 3 Patientenlungenproben. Maßstab: 20 µm.

5.2 Effekt von RvE1 im ex-vivo Modell der humanen Lungengewebskultur

5.2.1 LPS-Stimulationsmodell im primären humanen Lungengewebe

Das etablierte Verfahren der *ex-vivo* Stimulation humaner Lungengewebskulturen bietet viele Vorteile (132, 136). So kann mit Hilfe dieses Modells der Einfluss von RvE1 auf die LPS-induzierten lokalen Entzündungsprozesse direkt im menschlichen

Lungengewebe untersucht werden. Sowohl die Applikation von RvE1 als auch die Stimulation mit LPS, einem Agonisten des *Toll-like* Rezeptor 4, erfolgten auf gleiche Weise direkt in den bronchoalveolären Raum. Hierfür wurde das kultivierte Lungengewebe zunächst mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit LPS (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h wurden die Überstände der Gewebekulturen und die Lungengewebeproben gewonnen und für die nachfolgenden Analysen weiterverarbeitet.

5.2.1.1 RvE1 hat keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im humanen Lungengewebe

Um den Einfluss von RvE1 auf die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-8 und IL-6 im humanen Lungengewebe genauer zu untersuchen, wurden die vom Lungengewebe sezernierten Zytokine in den Gewebekulturüberständen mittels ELISA quantifiziert. Hierbei führte die Stimulation mit LPS zu einer vermehrten Ausschüttung aller untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine. Die stimulierten und mit RvE1 behandelten Gruppen wiesen gegenüber den Kontroll-behandelten stimulierten Gewebekulturen vergleichbar hohe Zytokinspiegel auf (Abb. 11). Durch eine prophylaktische RvE1-Behandlung wurde die LPS-induzierte Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren nicht inhibiert.

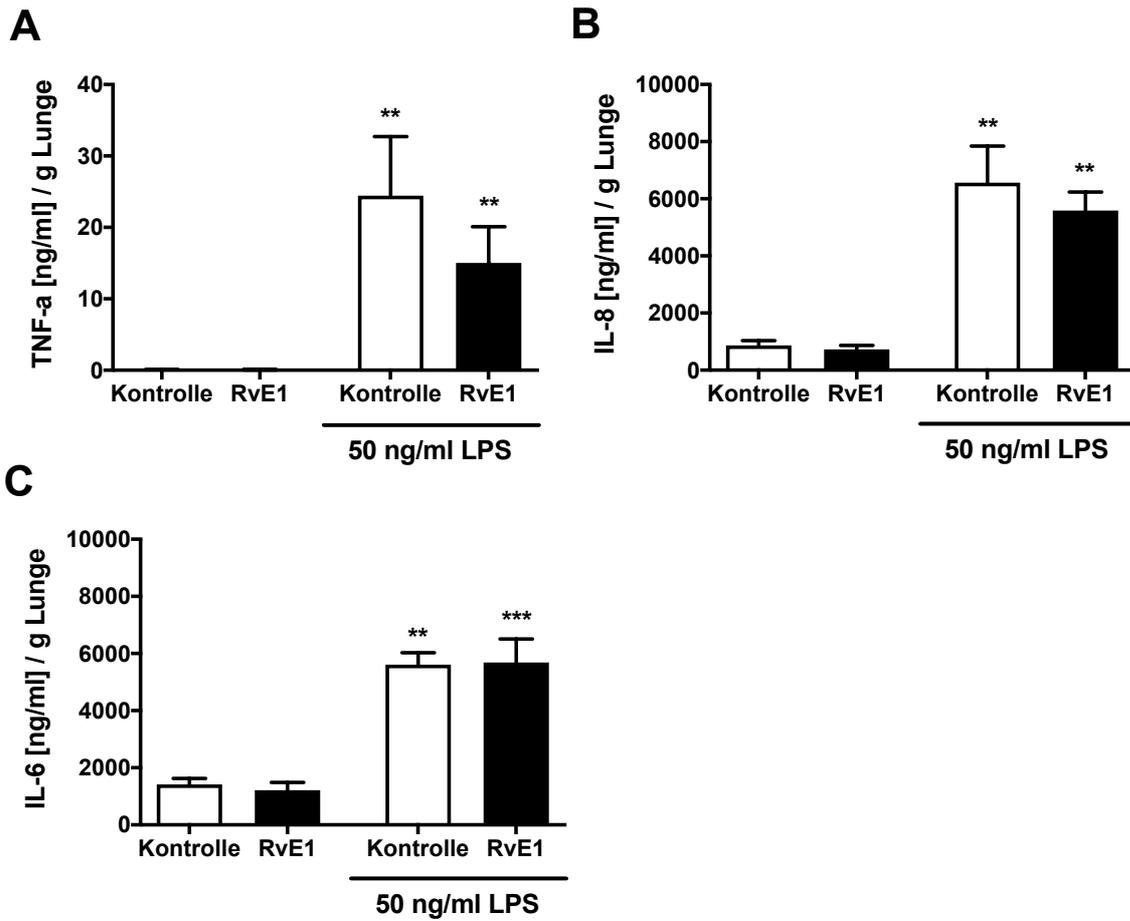


Abb. 11: Zytokinproduktion im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit RvE1.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit LPS (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zytokine TNF- α (A), IL-8 (B) sowie IL-6 (C) mittels ELISA aus den Überständen quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus korrespondierender Medium-stimulierter Vergleichsgruppe mit gleicher Behandlung; $n=7$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc Test.

5.2.1.2 RvE1 verändert die Expression von BLT-1 und ChemR23 in LPS-stimuliertem humanen Lungengewebe nicht

Um den Einfluss von RvE1 auf die Expression seiner Zielrezeptoren BLT-1 und ChemR23 nach LPS-Stimulation in der humanen Lunge zu evaluieren, wurde die mRNA der Rezeptoren im Lungengewebe mittels qPCR quantifiziert. Dazu wurden die in Abschnitt 8.1.6 beschriebenen Intron-überspannende PCR-Primer verwendet.

Hierbei unterschieden sich die Expressionen von BLT-1 und ChemR23 in den Lungengewebskulturen, welche mit LPS stimuliert wurden, nicht von denen der

jeweiligen unstimulierten Kontrollen. Ferner blieb die Expression von BLT-1 und ChemR23 im LPS-stimulierten und mit RvE1 vorbehandelten Lungengewebe im Vergleich zu den Kontroll-behandelten Lungen unverändert (Abb. 12).

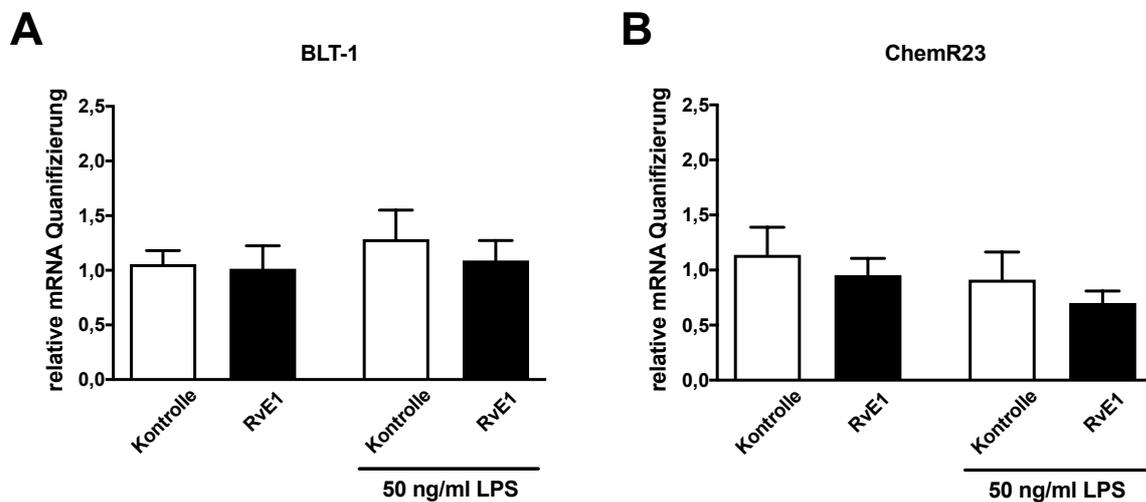


Abb. 12: Genexpression von BLT-1 und ChemR23 im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit LPS und Behandlung mit RvE1.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit LPS (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h Inkubation wurde die RNA der Gewebe isoliert. Die Genexpression der Zielrezeptoren BLT-1 (**A**) und ChemR23 (**B**) wurde mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. (n=7). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test).

5.2.2 MALP-2-Stimulationsmodell im primären humanen Lungengewebe

Die zuvor beschriebenen Vorteile des *in-vitro* Stimulationsmodells gelten auch für die Stimulation mit MALP-2. MALP-2 ist ein Lipopeptid und Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien wie *S. pneumoniae*. Als TLR-2/6-Agonist bewirkt MALP-2 ähnlich wie das LPS der Gram-negativen Bakterien die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren. Es hat darüber hinaus auch immunmodulatorische Wirkungen. Das kultivierte Lungengewebe wurde analog mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit MALP-2 (50 ng/ml). Nach weiteren 16 h wurden die Überstände der Gewebekulturen und die Lungengewebeproben gewonnen und für die nachfolgenden Analysen weiterverarbeitet.

5.2.2.1 RvE1 beeinflusst nicht die MALP-2-induzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im humanen Lungengewebe

Zur Untersuchung des Effektes von RvE1 auf die Entzündungsreaktion lokal im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit MALP-2 (50 ng/ml) wurden die Zytokine TNF- α , IL-8 und IL-6 mittels ELISA in den Gewebekulturüberständen quantifiziert.

Dabei induzierte MALP-2 eine signifikant erhöhte Freisetzung aller untersuchten Zytokine im Vergleich zur unstimulierten Vergleichsgruppe. In RvE1- und Kontroll-behandelten Lungengeweben wurden nach MALP-2 Stimulation vergleichbare Zytokinlevel festgestellt (Abb. 13). RvE1 beeinflusste demnach die MALP-2-induzierte Freisetzung der ausgewählten entzündungsfördernden Mediatoren nicht.

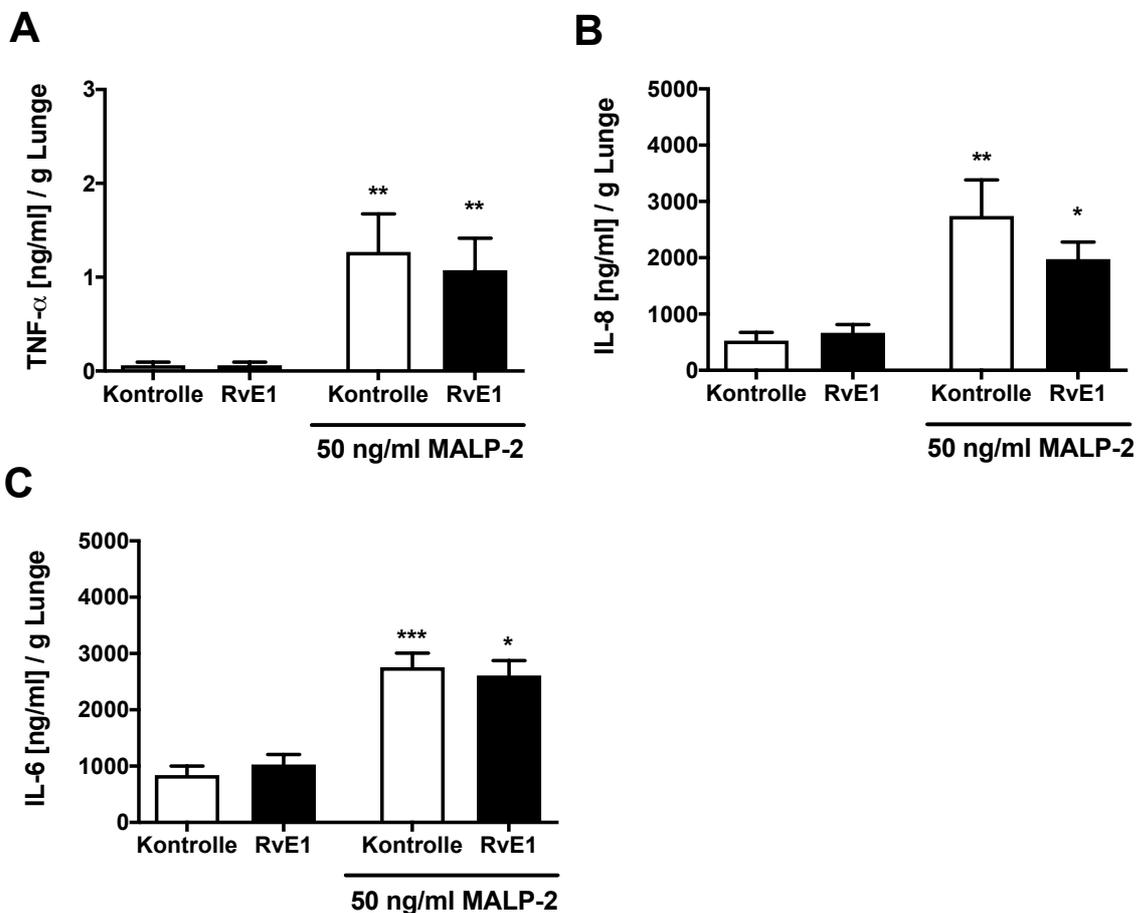


Abb. 13: Zytokinproduktion im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit MALP-2 und Behandlung mit RvE1.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit MALP-2 (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h Inkubation wurden die Zytokine TNF- α (**A**), IL-8 (**B**) sowie IL-6 (**C**) mittels ELISA in den Überständen quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, versus korrespondierender Medium-stimulierter Vergleichsgruppe mit gleicher Behandlung; $n=7$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.2.2.2 RvE1 verändert nicht die Expression von BLT-1 und ChemR23 im MALP-2-stimulierten humanen Lungengewebe

Analog zum LPS-Modell wurde ebenso der Einfluss von RvE1 auf die Expression der Zielrezeptoren BLT-1 und ChemR23 nach MALP-2-Stimulation mittels qPCR evaluiert. Hierbei unterschied sich die Expression der Rezeptoren BLT-1 und ChemR23 in den Lungengewebskulturen, welche mit MALP-2 stimuliert wurden, nicht von denen der jeweiligen unstimulierten Vergleichsgruppe. Darüber hinaus zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression der Zielrezeptoren in den MALP-2-stimulierten und mit RvE1 behandelten Lungen im Vergleich zu den MALP-2-stimulierten, Kontroll-behandelten Lungen (Abb. 14).

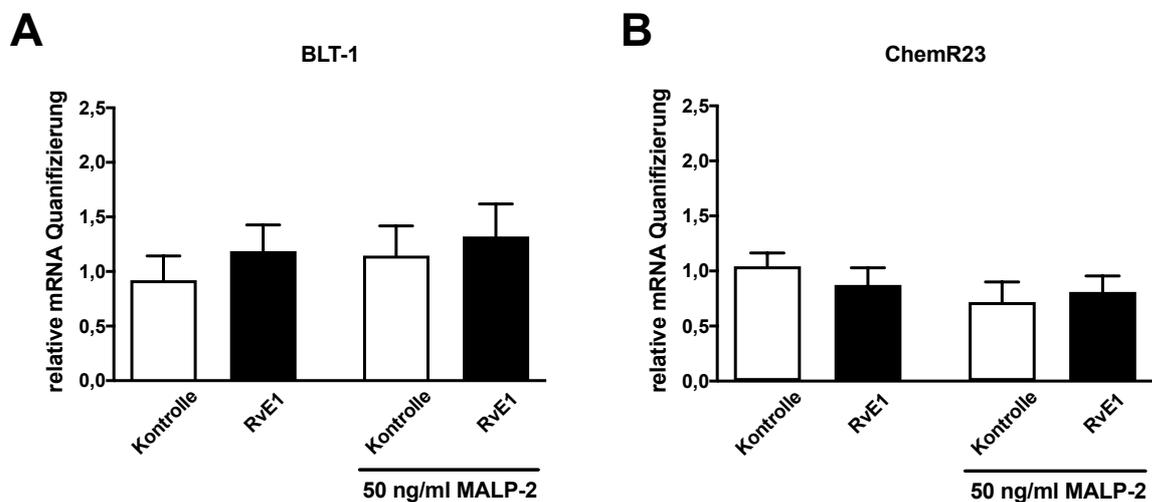


Abb. 14: Genexpression von BLT-1 und ChemR23 im humanen Lungengewebe nach Stimulation mit MALP-2 und Behandlung mit RvE1.

Humanes Lungengewebe wurde *ex-vivo* mit RvE1 (100 nM) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 4 h erfolgte die Stimulation mit MALP-2 (50 ng/ml) oder Medium. Nach weiteren 16 h Inkubation wurde die RNA der Gewebe isoliert. Die Genexpression der Zielrezeptoren BLT-1 (A) und ChemR23 (B) wurde mittels quantitativer *real time* PCR bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (n=7). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.3 RvE1 im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie: Einfluss auf die akute Phase der Immunabwehr

Untersuchungen in verschiedenen murinen Modellen peritonealer, intestinaler und anderer lokaler Entzündungen zeigten, dass RvE1 die Infiltration von neutrophiler

Granulozyten an den Ort der Entzündung blockiert und gleichzeitig die Rekrutierung von Monozyten fördert (90, 106). Zusammengenommen tragen beide Prozesse zu einer Abschwächung des Entzündungsprozesses bei (68).

Diese beiden entscheidenden Wirkungsweisen von RvE1 können mit dem Modell des isolierten humanen Lungengewebes nicht dargestellt werden, da es hier zu keiner Einwanderung von Immunzellen über das Blut in das betroffene Gewebe kommen kann. Des Weiteren ist es nicht möglich das klinisch relevante Eindringen und Ausbreiten der Erreger in der Lunge nach Tröpfcheninfektion in dem Modell nachzuahmen. Ferner können Kompartiment überschreitende systemische Effekte der RvE1-Behandlung nicht dargestellt werden. Deshalb wurde zur Untersuchung dieser komplexen Pathogen-Wirts-Interaktionen das murine Modell der Pneumokokkenpneumonie verwendet.

Um nun zu evaluieren, in wieweit RvE1 in der Phase der akuten Inflammation Einfluss auf das Entzündungsgeschehen nehmen kann, wurden Mäuse mit 5×10^6 *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) oder Kontrolllösung (PBS) transnasal infiziert und ab 12 h *post infectionem* (p.i.) im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende subkutan mit 1 µg RvE1 (in 200 µl) oder Kontrolllösung behandelt. Nach 48 h p.i. wurden die Mäuse zur Probengewinnung schmerzlos getötet.

5.3.1 RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der akuten Pneumokokkenpneumonie

Die Erfassung der klinischen Parameter Körpermasse und Körpertemperatur ist im akuten Entzündungsgeschehen von zentraler Bedeutung, um den Verlauf und die Intensität der Infektion im Mausmodell objektiv abbilden zu können. Hierzu wurden die Körpermasse und Körpertemperatur 24 h und 48 h nach der Infektion ausgewertet.

Die mit *S. pneumoniae* infizierten Mäuse wiesen im Vergleich zu PBS-infizierten Kontrollen innerhalb der ersten 24 h nach Infektion eine geringe, jedoch signifikante Abnahme von Körpermasse (Abb. 15A) und -temperatur (Abb. 15B) auf. Zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion zeigte sich eine weitere Reduktion der Körpermasse sowie eine deutliche Hypothermie. Zwischen der Gruppe der infizierten Tiere, die mit RvE1 oder Kontrolllösung behandelt wurden, konnten jedoch bei beiden Parametern keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Abb. 15). Die Körpermasse der nicht-infizierten Versuchsgruppen blieb ebenso wie die Körpertemperatur unabhängig von der subkutanen Behandlung über den Versuchszeitraum konstant (Abb. 15).

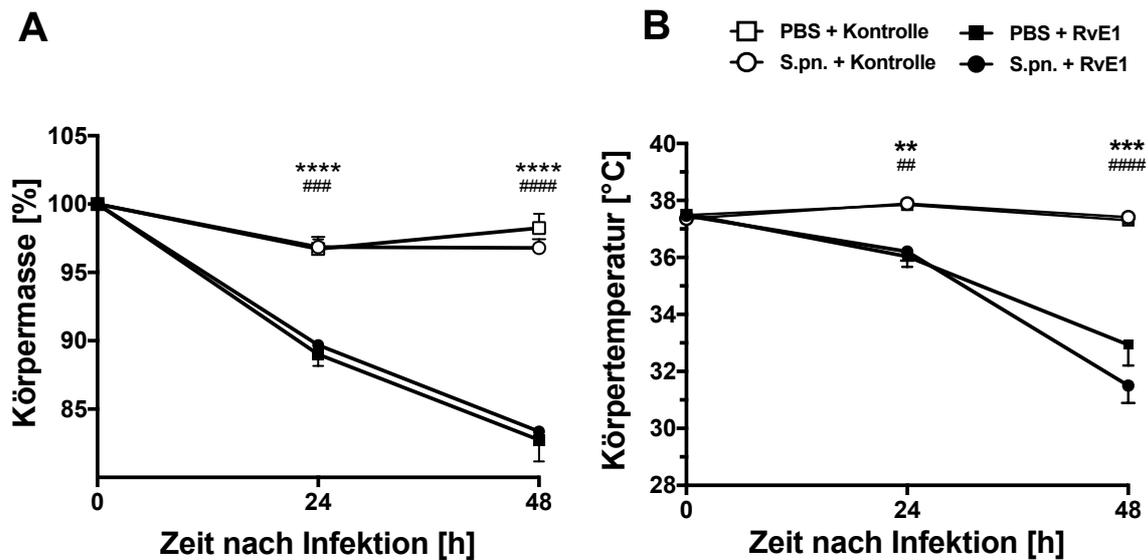


Abb. 15: Klinische Parameter im Verlauf der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie.

Mäuse wurden transnasal mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS via Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 μ g RvE1 (in 200 μ l) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h behandelt. Die Versuchsdauer betrug 48 h. Die Körpermasse (A) und die Körpertemperatur (B) wurden zum Zeitpunkt 24 h und 48 h p.i. ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ S.pn. + Kontrolle versus PBS + Kontrolle, ### $p < 0,01$, #### $p < 0,001$, ##### $p < 0,0001$ S.pn. + RvE1 versus PBS + RvE1; $n = 8-10$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way RM ANOVA und Tukeys multiple comparisons Test.

5.3.2 RvE1 hat keinen Einfluss auf die Erregerlast in der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie

Im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae* infiltrieren die Pneumokokken das Lungengewebe, vermehren sich und treten in die Blutbahn über (137). Zudem deuten *in-vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung) darauf hin, dass sich die Stimulation des 18R-HEPE/RvE1-Signalweges auch positiv auf die Phagozytoseaktivität von zu Makrophagen differenzierten Knochenmarksmonozyten auswirkt. Daher erfolgte im aktuellen Versuchsvorhaben die Evaluation der Erregerelimination. Dazu wurden die Tiere am Versuchsende 48 h nach Infektion tief narkotisiert und durch finalen Blutentzug schmerzlos getötet. Anschließend erfolgte eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) und die Entnahme der Lungen. Danach wurde die Erregerlast (in KbE pro Einheit) in der BAL-Flüssigkeit (BALF), im Lungengewebe und im Blut der mit *S. pneumoniae* infizierten Tiere bestimmt.

Sowohl in der BALF (Abb. 16A) als auch im Lungengewebe (Abb. 16B) konnten 48 h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* Erreger in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden auch im Blut infizierter Tiere Bakterien in ausgeprägter Konzentration als Zeichen einer Bakteriämie detektiert werden (Abb. 16C). Die Bakterienlast in der BALF war jedoch am Versuchsende 48 h p.i. in infizierten und mit RvE1 behandelten Tieren verglichen mit infizierten und Kontroll-behandelten Tieren nicht signifikant verschieden. Ebenso wiesen Lungengewebe und Blut von infizierten Versuchsgruppen mit und ohne RvE1 Behandlung vergleichbare Bakterienzahlen auf. Zusammenfassend konnten in keinem der untersuchten Kompartimente signifikante Unterschiede bezüglich der Erregerlast nach RvE1-Behandlung festgestellt werden.

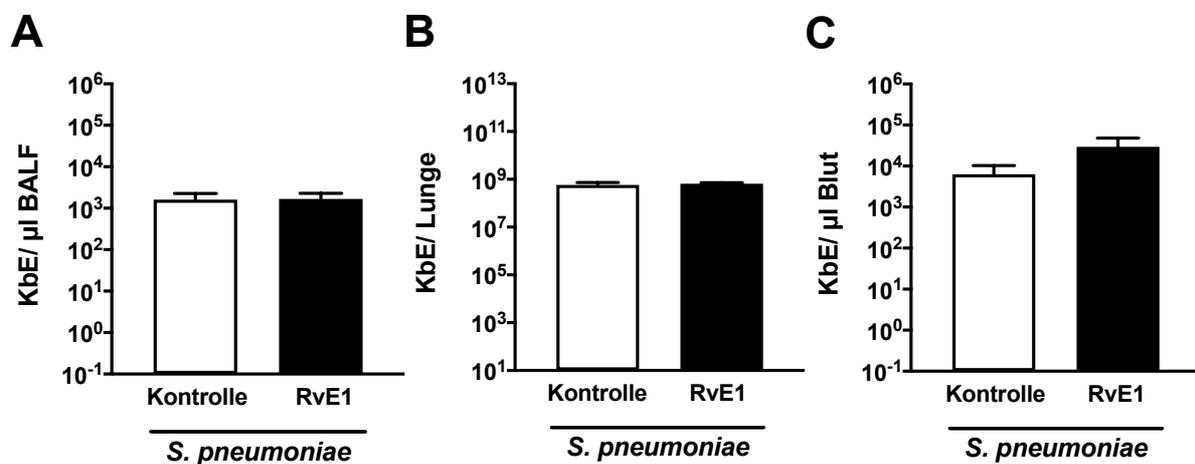


Abb. 16: Bakterienlast 48 h nach Pneumokokkeninfektion.

Mäuse wurden mit 5×10^6 koloniebildenden Einheiten (KbE) *S. pneumoniae* transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 µg RvE1 (in 200µl) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende behandelt. Die Zahl der KbE wurden am Versuchsende (48 h) in BALF (A), Lunge (B) und Blut (C) bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben (n= 10). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test.

5.3.3 RvE1 bewirkt keine Veränderung der pulmonalen Barrierestörung in der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie

Neben Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* wie Pneumolysin und Hyaluronidase ist auch die Erreger-induzierte Entzündungsreaktion an der Induktion der endo-epithelialen Barrierestörung in der Lunge pathophysiologisch beteiligt (138). Die damit einhergehende gesteigerte Permeabilität der pulmonalen Blut-Luft-Schranke trägt wesentlich zur Entstehung eines Lungenödems und damit zur Genese des akuten

Lungenversagens im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie beim Menschen bei (137). Da bei Störung der endo-epithelialen Barriere in der Lunge vermehrt Serumalbumin aus dem Blut in den bronchoalveolären Raum übertritt, kann die Schrankenstörung anhand der Konzentrationsbestimmung des Serumalbumin im bronchoalveolären Raum quantitativ bestimmt werden. Um nun den indirekten Effekt einer RvE1-Behandlung (durch die postulierte Abmilderung der Entzündungsreaktion) auf die pulmonale Schrankenstörung im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen, wurde der Quotient aus murinem Serumalbumin in BALF und Blutplasma als Maß zur Quantifizierung der pulmonalen Barriestörung herangezogen.

Dabei zeigte sich, dass Tiere 48 h nach Infektion einen signifikant höheren Mausserumalbumin-Quotienten (BALF/Plasma) im Vergleich zu den entsprechenden Vergleichsgruppen ohne Infektion aufwiesen. Die infizierten und RvE1-behandelten Tiere zeigten jedoch im Vergleich zu den Kontroll-behandelten infizierten Tieren keine signifikante Veränderung der Albuminratio (Abb. 17). Somit hatte die Behandlung mit RvE1 keinen Einfluss auf die Integrität der alveolokapillären Schranke der Maus nach Pneumokokkeninfektion.

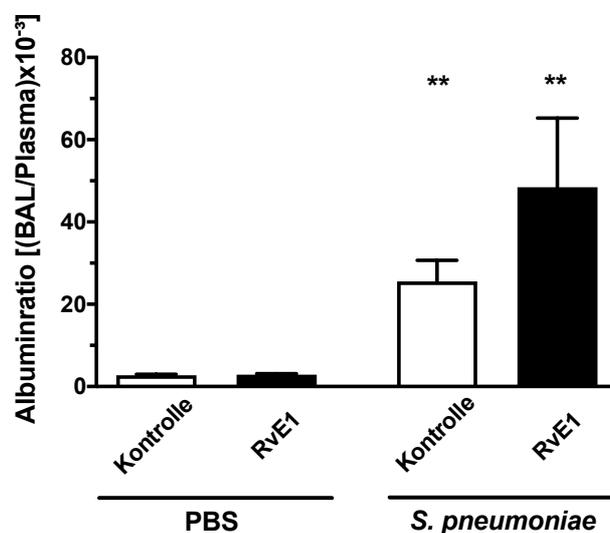


Abb. 17: Pulmonale Schrankenstörung 48 h nach Pneumokokkeninfektion.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 µg RvE1 (in 200 µl) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende behandelt. Murines Serumalbumin (MSA) wurde am Versuchsende (48 h) mittels ELISA in BALF und Plasma quantifiziert und der Quotient aus MSA in BALF und Plasma als Maß der pulmonalen Schrankenstörung bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (** $p < 0,01$ versus korrespondierende nicht-infizierte Behandlungsgruppe; $n=8$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.3.4 RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die akute Entzündungsreaktion in der Lunge nach Pneumokokkeninfektion

5.3.4.1 Entzündungszellen in der BALF

Zur Untersuchung des Einflusses von RvE1 auf die *S. pneumoniae*-induzierte akute Entzündungsreaktion in der Lunge wurde zunächst die zelluläre Entzündungsantwort in den infizierten Mauslungen im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen analysiert. Dafür erfolgte die Quantifizierung und Differenzierung der in der BALF enthaltenen Leukozyten mittels Durchflusszytometrie 48 h p.i.

Dabei zeigte sich, bedingt durch die Infektion, ein signifikanter Anstieg der Leukozyten in der BALF infizierter Tiere im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 18A). Die Hauptfraktion der rekrutierten Leukozyten bildeten die neutrophilen Granulozyten (Abb. 18B). Darüber hinaus war auch die Anzahl der residenten Alveolarmakrophagen (Abb. 18C) tendenziell erhöht dagegen und die Zahl der eingewanderten inflammatorischen Monozyten (Abb. 19D) 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren signifikant angestiegen. Zwischen den RvE1-behandelten und den Kontroll-behandelten Tieren zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Zellpopulationen der BALF, weder mit noch ohne Infektion. Zusammenfassend induzierte die Infektion mit *S. pneumoniae* eine Rekrutierung aller untersuchten Leukozytensubpopulationen in den Bronchoalveolarraum. Diese wurde durch die Behandlung mit Resolvin jedoch nicht beeinflusst.

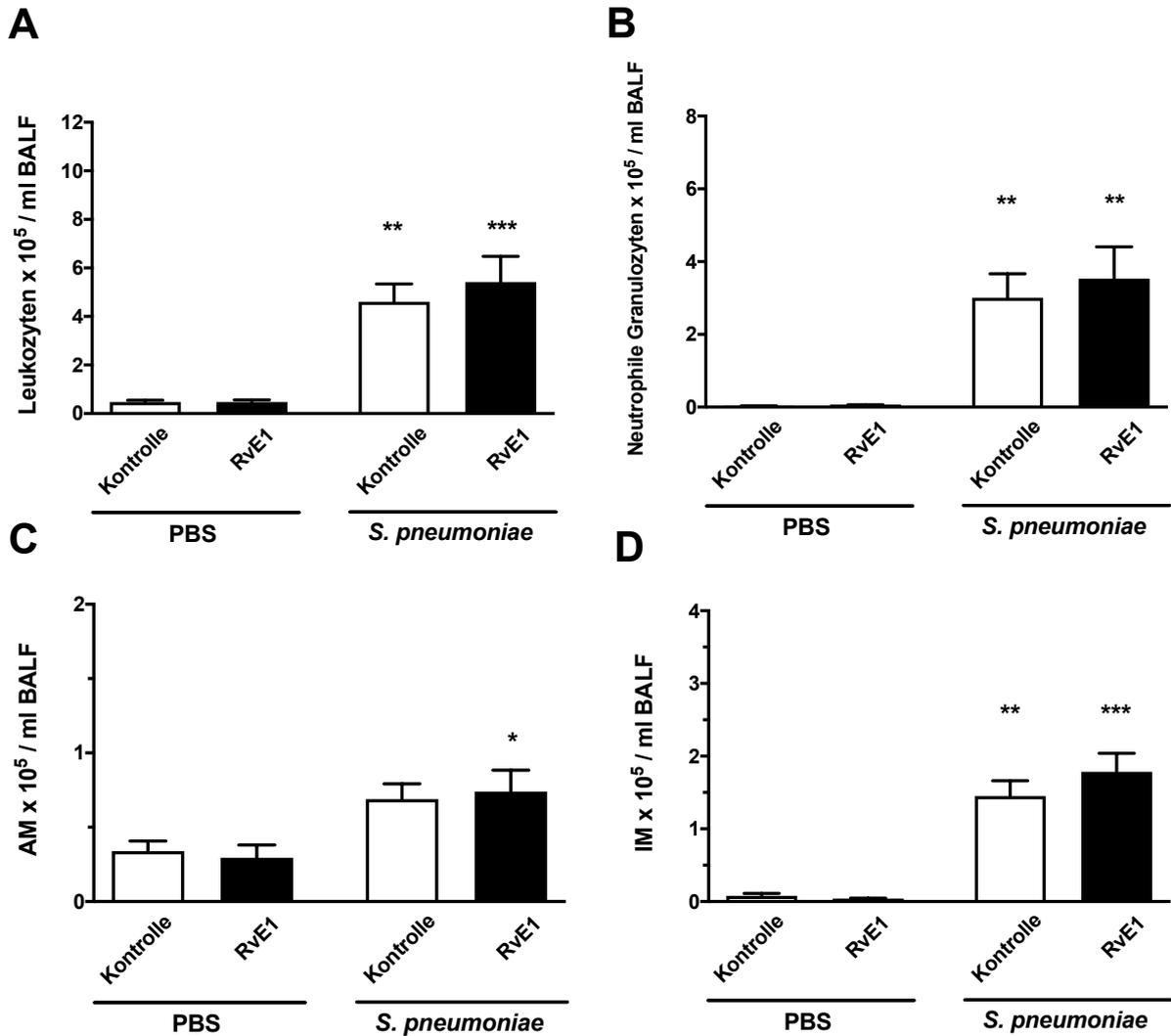


Abb. 18: Leukozytensubpopulationen in der BALF 48 h nach Pneumokokkeninfektion. Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 μ g RvE1 (in 200 μ l) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende behandelt. Die Versuchsdauer betrug 48 h. Leukozyten (A), neutrophile Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (AM) (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ infizierte versus nicht-infizierte Vergleichsgruppe mit gleicher Behandlung; $n = 8-10$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.3.4.2 Zytokine in der BALF

Um den Einfluss von RvE1 auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren in der akuten Entzündungsphase der murinen Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen, wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL12p40, TNF- α , IFN- γ , das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 sowie das Chemokin MCP-1 mittels ProcartaPlex-Immunassay untersucht.

Dabei zeigte sich, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* die Freisetzung von IL-1 β (Abb. 19A), TNF- α (Abb. 19B), IL-12p40 (Abb. 19C), IL-10 (Abb. 19D), IFN- γ (Abb. 19E) und MCP-1 (Abb. 19F) in den bronchoalveolären Raum induzierte. Infizierte Tiere der mit RvE1-behandelten Versuchsgruppe wiesen eine vergleichbare Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie infizierte mit Kontrolllösung behandelte Tiere auf. Die Behandlung mit RvE1 blieb daher ohne Effekt auf die untersuchten Zytokinspiegel der infizierten Tiere.

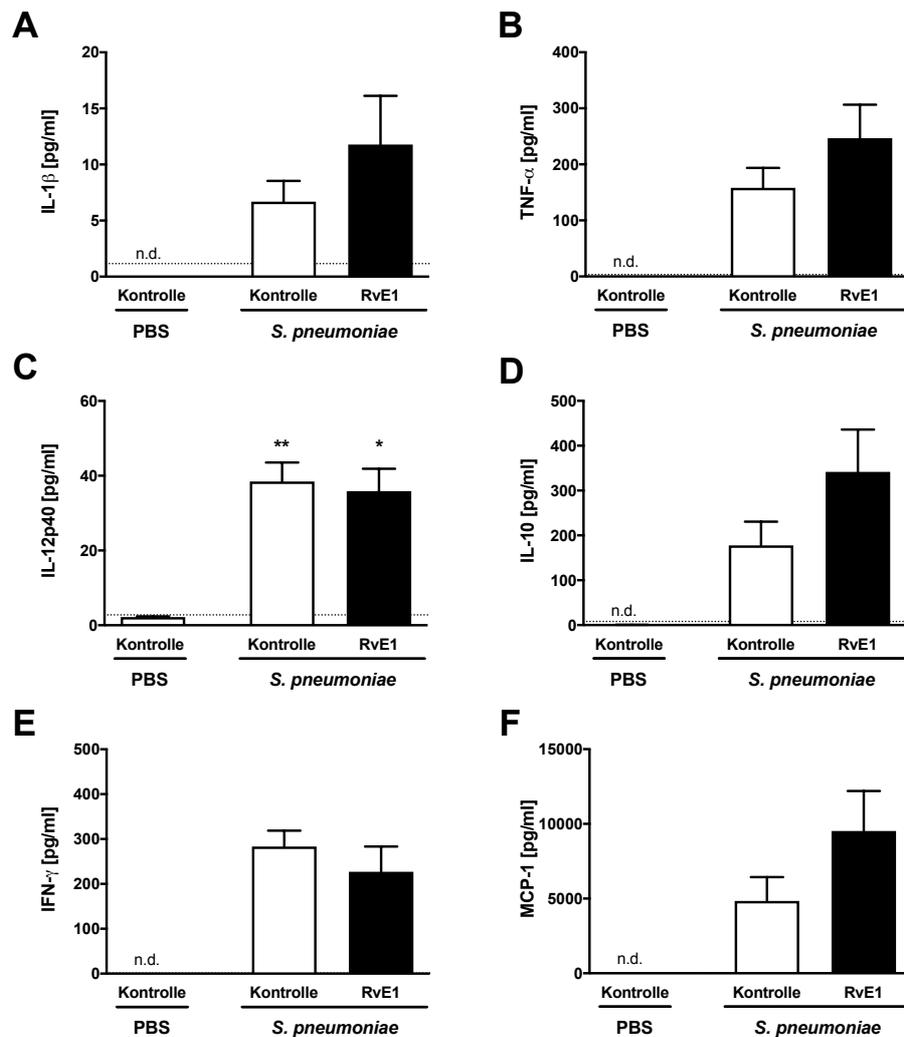


Abb. 19: Zytokine in der BALF 48 h nach Pneumokokkeninfektion.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KfE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 μ g RvE1 (in 200 μ l) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende behandelt. Die Zytokine IL-1 β (A), TNF- α (B), IL-12p40 (C), IL-10 (D), IFN- γ (E), MCP-1 (F) wurden mittels ProcartaPlex *Immunoassay* am Versuchsende (48 h p.i.) ermittelt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ infizierte versus nicht-infizierte Versuchsgruppe mit gleicher Behandlung; $n = 5-6$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test. Die gestrichelte Linie gibt die untere Detektionsgrenze des Assays an. *n.d.*: nicht detektierbar (Werte unterhalb der Nachweisgrenze).

5.3.5 RvE1 führt nicht zur Veränderung der systemischen Entzündungsreaktion im Blut bei akuter Pneumokokkenpneumonie

Da den Versuchstieren RvE1 subkutan appliziert wurde, ist ein direkter Effekt von RvE1 auf die systemische akute Entzündungsreaktion nicht auszuschließen. Daher erfolgte zusätzlich die Differenzierung und Quantifizierung der Blutleukozyten mittels SciVet-Leukozytendifferenzierung 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae*.

Als Zeichen einer progredienten Infektion mit Bakteriämie zeigte sich eine Lymphozytendepletion im Blut. So konnte 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae* eine signifikante Reduktion der Lymphozyten (Abb. 20A) im Blut im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen nachgewiesen werden. Gleichzeitig nahm die Anzahl der Granulozyten im Blut bei infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren signifikant zu (Abb. 20B). Die Zahl der Blutmonozyten blieb bei infizierten im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren unverändert (Abb. 20C). In allen untersuchten Leukozytensubpopulationen zeigten sich weder in den infizierten noch in den nicht-infizierten Versuchsgruppen signifikante Unterschiede zwischen den RvE1-behandelten und Kontroll-behandelten Tieren.

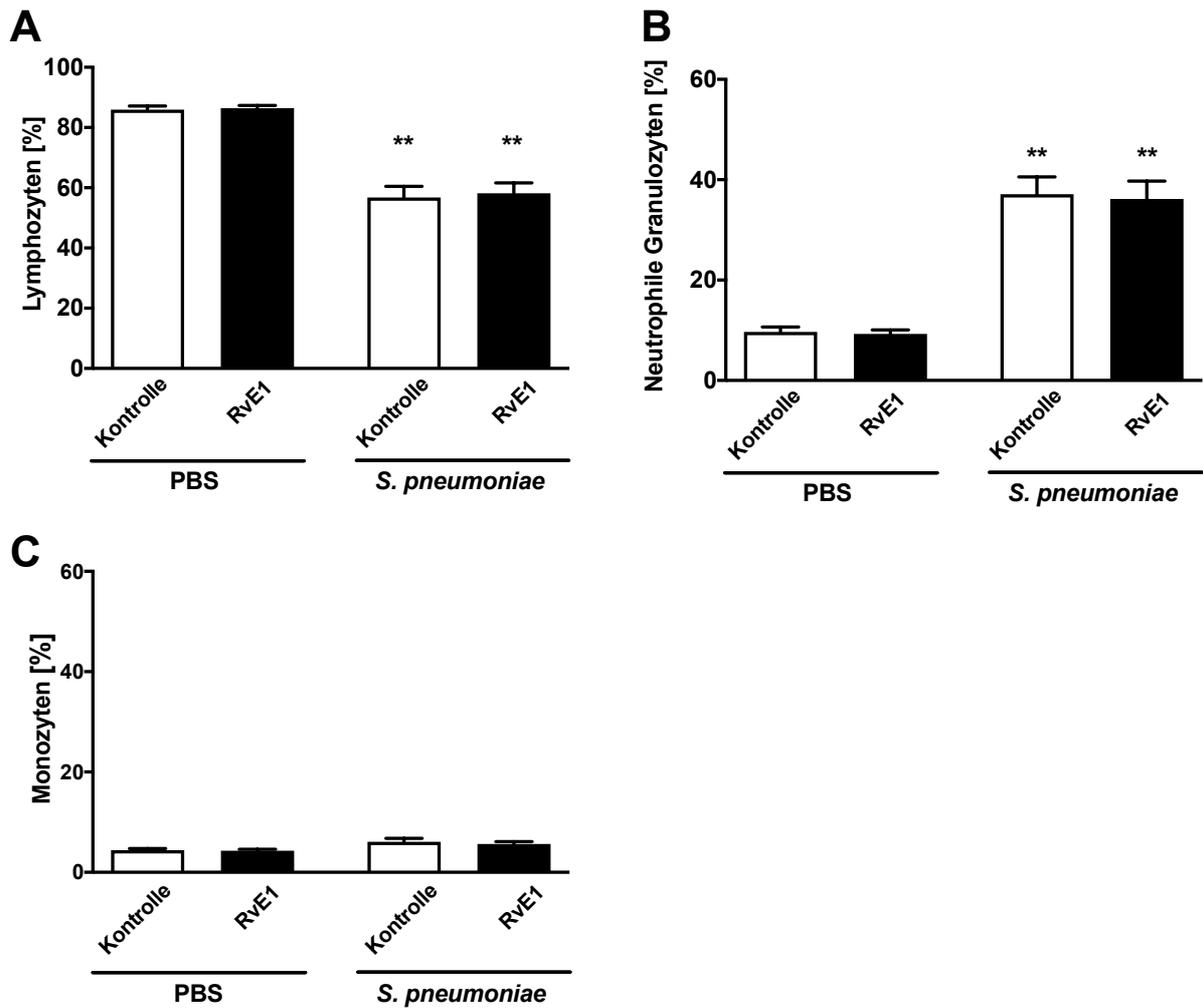


Abb. 20: Leukozytenpopulationen im Blut 48 h nach Pneumokokkeninfektion.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert und anschließend ab 12 h p.i. subkutan mit 1 µg RvE1 (in 200 µl) oder Kontrolllösung im Abstand von 12 h bis zum Versuchsende behandelt. Nicht-infizierte Tiere (PBS) erhielten entsprechend RvE1 oder Kontrolllösung s.c. appliziert. Lymphozyten (A), neutrophile Granulozyten (B) und Monozyten (C) wurden mittels SciVet quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (** $p < 0,01$ infizierte versus nicht-infizierte Versuchsgruppe mit gleicher Behandlung; $n=8-10$) Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.4 RvE1 im murinen Modell der Influenzaviruspneumonie: Einfluss auf die frühe viral-bedingte Entzündungsreaktion

Sowohl die Initiation als auch die Resolution der Entzündungsreaktion sind aktiv regulierte Prozesse (81). Obwohl erste Signalwege der Resolution bereits in der frühen Entzündungsreaktion beginnen (73) dominieren in der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie die pro-inflammatorischen Prozesse zur Bekämpfung der

in die Lunge vorgedrungenen Pathogene (6). Die Ausbreitung und Vermehrung der Pneumokokken in die Lunge sowie der Übertritt der Erreger in die Blutbahn erfolgen im murinen Modell sehr schnell innerhalb von 24 h bis 36 h nach Infektion. Diese Vorgänge gehen einher mit einer rasch ansteigenden Entzündungsreaktion mit starker Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren und hochgradiger Invasion des Lungengewebes vor allem durch neutrophile Granulozyten (139). Daher ist unklar, ob eine RvE1 Behandlung in der Phase der hochgradigen Entzündungsreaktion ein ausreichender Stimulus ist, um die Entzündungsprozesse durch Aktivierung einzelner gegenregulierender Resolutionsvorgänge abzumildern. Aus diesem Grund wurde der Effekt von RvE1 in einem weiteren klinisch relevanten Infektionsmodell untersucht, dass mit einer zunächst mildereren, sich langsamer entwickelnden Entzündungsreaktion zur Erregerabwehr einhergeht. Hierfür wurde das murine Modell der frühen Influenzavirus-A-Infektion verwendet. Bei diesem Mausmodell zeigt sich das Inflammationsgeschehen in der frühen Infektionsphase weniger ausgeprägt (140). Im weiteren Verlauf dieser viral bedingten Pneumonie ist das Gleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen Vorgängen und Resolutionsprozessen für den Ausgang der Erkrankung jedoch essentiell (141).

Um nun den Einfluss von RvE1 in der frühen Phase der Influenzavirusinfektion zu untersuchen, wurden Mäuse transnasal mit Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 (100 PFU) infiziert. Ab 48 h nach Infektion wurden die Tiere im Abstand von 12 h bis einschließlich 84 h nach Versuchsbeginn mit 1 µg RvE1 (in 100 µl) oder Kontrolllösung intravenös behandelt. Für diese Experimente wurde die intravenöse Applikationsroute anstatt der subkutanen Injektion gewählt, um maximale RvE1 Konzentrationen im Blut zu erhalten und den Wirkstoff unverzüglich zum Ort des Geschehens zu bringen ohne zeitliche Verzögerungen durch vorher notwendige Resorptionsvorgänge.

Ferner wurde eine mit 2 µg 18R-HEPE (in 100 µl) i.v. behandelte Versuchsgruppe vergleichend untersucht. Als Vorläufermolekül wird 18R-HEPE durch die 5-Lipoxygenase (5-LOX), die vor allem in neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, zu RvE1 verstoffwechselt. Somit entsteht RvE1 nur am Ort der Entzündung und entfaltet daher auch nur dort, lokal, seine Wirkung. Die Einführung dieser neuen Gruppe erlaubte es, neben den systemischen Effekten des RvE1 (i.v. Applikation von RvE1) auch die lokalen Effekte von RvE1 (i.v. Applikation von 18R-HEPE) differenziert zu untersuchen.

5.4.1 RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Erregerabwehr in der Lunge nach Influenzavirusinfektion

Im Rahmen der regelmäßigen Überwachung der Tiere im Verlauf des Experimentes erfolgte die Messung von Körpertemperatur und Körpermasse. Am Versuchsende 96 h nach Infektion wurde eine BAL durchgeführt, die Lungen anschließend entnommen und die Viruslast im Lungengewebe (lavagiert) mittels Virus Plaque Assay bestimmt.

Die Infektion mit H1N1 induzierte bis 96 h nach Infektion weder eine Reduktion der Körpermasse (Abb. 21A) noch eine Hypothermie bei den Tieren (Abb. 21B). Zudem bewirkte weder die Behandlung mit RvE1 noch 18R-HEPE im Vergleich zur Kontroll-Behandlung eine signifikante Veränderung der beiden untersuchten Parameter bei infizierten Tieren.

Die Quantifizierung der Viruslast im Lungengewebe ergab dagegen deutlich erhöhte Virusmengen von $2,34 \times 10^5 \pm 1,24 \times 10^5$ PFU pro Lunge (Mittelwert \pm SEM Kontroll-behandelte infizierte Gruppe), unter Berücksichtigung einer initialen Infektionsdosis von 100 PFU pro Maus. Jedoch zeigte sich auch hier keine signifikante Veränderung der pulmonalen Viruslast infolge der RvE1- oder 18R-HEPE-Behandlung der infizierten Tiere im Vergleich zu den Lungen Kontroll-behandelter infizierter Tiere (Abb. 21).

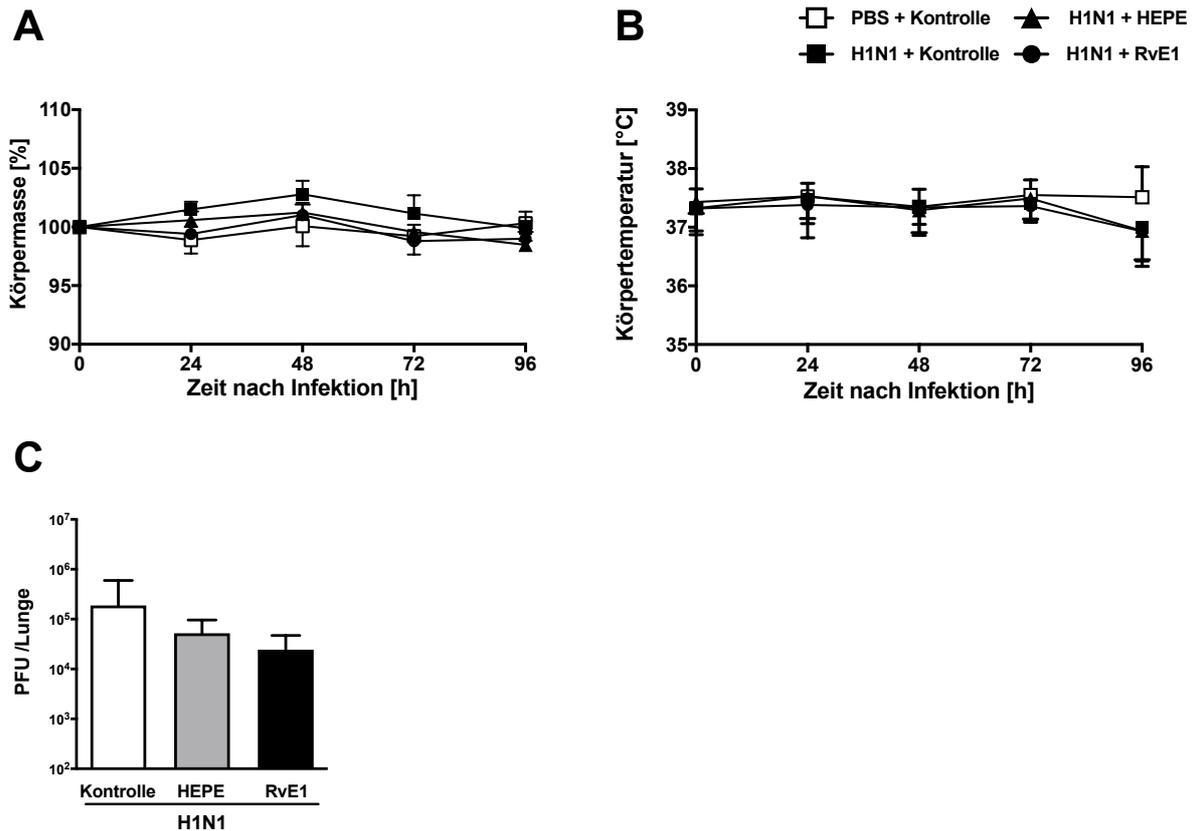


Abb. 21: Klinische Parameter und Viruslast in der Lunge 96 h nach Influenzavirusinfektion.

Mäuse wurden mit 100 PFU Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung (in 100 µl). Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS scheininfiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Versuchsdauer betrug 96 h. Die Körpermasse (**A**) und die Körpertemperatur (**B**) wurden im Abstand von 24 h dargestellt und ausgewertet. **C**, Plaque-bildende Einheiten (PFU) wurden mittels Virus Plaque Assay im Lungenhomogenatsüberstand quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben (n=8-10). Testung auf Signifikanz erfolgte mittels Two-Way RM ANOVA und Tukeys *multiple comparisons* Test (**A und B**), bzw. mittels Kruskal-Wallis und Dunns post-hoc Test (**C**).

5.4.2 RvE1 hat keinen Einfluss auf die akute Entzündungsreaktion in der Lunge nach Influenzavirusinfektion

5.4.2.1 Entzündungszellen im Lungengewebe

Influenzaviren replizieren intrazellulär und infizieren nach der Lyse der befallenen Wirtszelle die Zellen der direkten Umgebung, wodurch das typische Bild der vorrangig interstitiellen Bronchopneumonie entsteht. Daher wurde der Einfluss der systemischen RvE1-Behandlung auf die Influenzavirus-induzierte akute zelluläre

Entzündungsreaktion zunächst im Lungengewebe (lavagiert) von infizierten Mäusen 96 h nach Infektion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Infektion mit H1N1 eine deutlich sichtbare, wenn auch nicht signifikante Rekrutierung von Leukozyten (Abb. 22A), vor allem von neutrophilen Granulozyten (Abb. 22B) und inflammatorischen Monozyten (Abb. 22D) im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollen induziert. Die Subpopulation der residenten Alveolarmakrophagen (Abb. 22C), die nach der bronchoalveolären Lavage in der Lunge zurückblieben, war dagegen unverändert. Darüber hinaus unterschieden sich die RvE1- und 18R-HEPE-behandelten infizierten Tiere in den analysierten Leukozytensubpopulationen nicht von denen der Kontroll-behandelten infizierten Gruppe (Abb. 22).

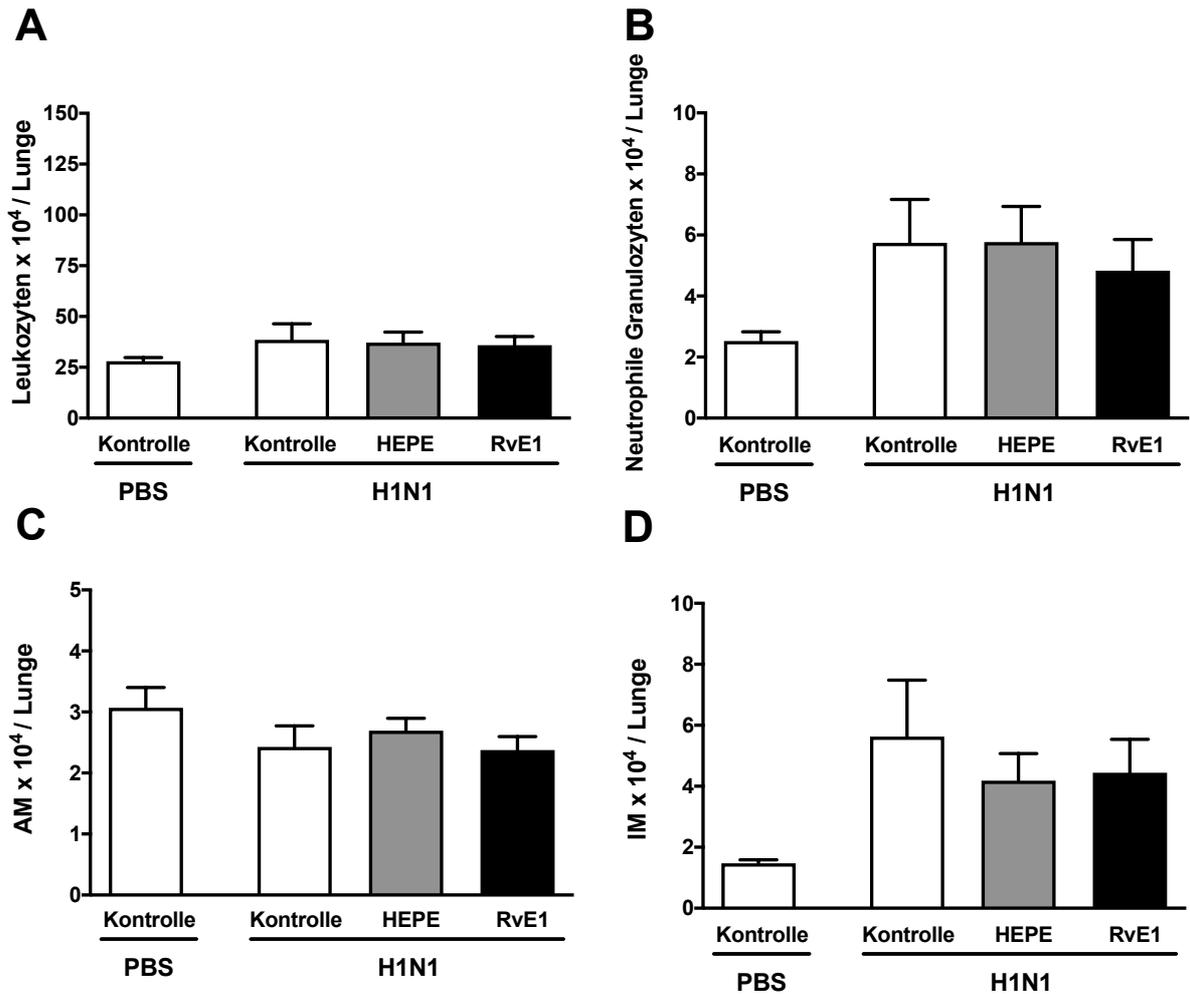


Abb. 22: Leukozytenpopulationen im Lungengewebe 96 h nach Influenzavirusinfektion. Mäuse wurden mit 100 PFU Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung (100 µl). Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS infiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Versuchsdauer betrug 96 h. Leukozyten (A), neutrophile Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (AM) (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden nach 96 h im Lungengewebe mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben. (n= 8-10) Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal- Wallis-Test mit Dunns post-hoc.

5.4.2.2 Entzündungszellen in der BALF

Analog zur Analyse der zellulären Immunantwort im lavagierten Lungengewebe erfolgte die Untersuchung der zellulären Entzündungsantwort in der BALF ebenfalls nach 96 h mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurde die Anzahl der Leukozyten (Abb. 23A), der neutrophilen Granulozyten (Abb. 23B), der residenten Alveolarmakrophagen (Abb. 23C), sowie der inflammatorischen Monozyten (Abb. 23D) in der BALF bestimmt. Ähnlich der Ergebnisse im lavagierten Lungengewebe induzierte die Infektion mit

Influenzavirus eine nachweisbare Rekrutierung von Leukozyten vorrangig von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den bronchoalveolären Raum. Eine signifikante Erhöhung der Zahl der Leukozyten, neutrophilen Granulozyten sowie der inflammatorischen Monozyten wurde dabei jedoch lediglich in der mit 18R-HEPE-behandelten infizierten Gruppe im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen beobachtet. Wie bereits im lavagierten Lungengewebe nachgewiesen, konnten auch in der BALF keine signifikanten Unterschiede zwischen der RvE1- bzw. der 18R-HEPE-behandelten infizierten Versuchsgruppe im Vergleich zur infizierten Kontroll-behandelten Versuchsgruppe festgestellt werden (Abb. 23).

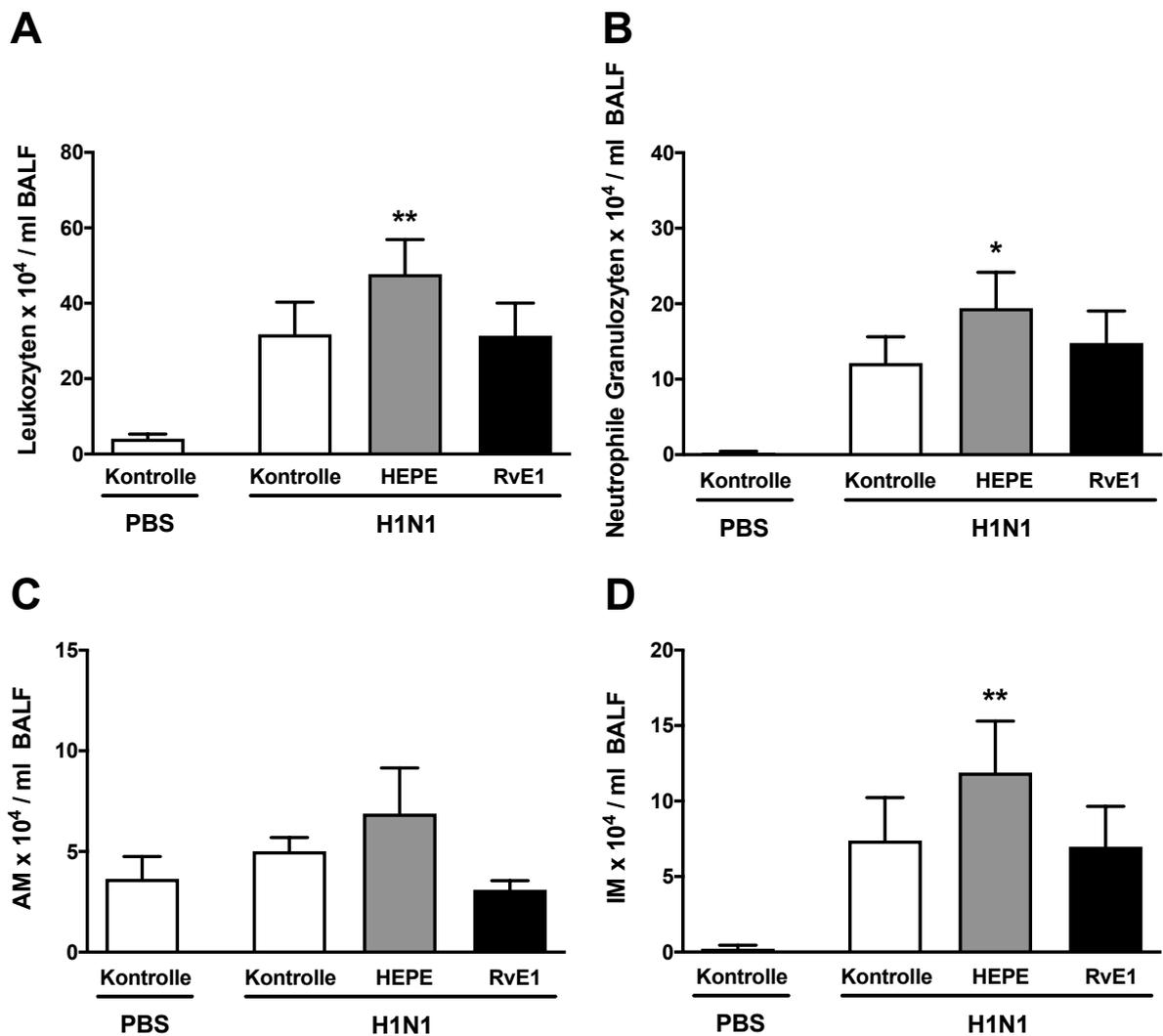


Abb. 23: Leukozytenpopulationen in der BALF 96 h nach Influenzavirusinfektion.

Mäuse wurden mit 100 PFU Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung (100 µl). Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS infiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Versuchsdauer betrug 96 h. Leukozyten (A), neutrophile Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (AM) (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden nach 96 h in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (*p<0,05, **p<0,01 vs. nicht-infizierte Vergleichsgruppe mit Kontroll-Behandlung; n=10-8). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal- Wallis-Test und Dunns post-hoc.

5.4.2.3 Zytokine in der BALF

Zur weiteren Charakterisierung der Virus-induzierten Entzündungsreaktion wurden die pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, IL-6, MCP-1, TNF- α sowie Zytokine, die typischerweise in die Virusabwehr involviert sind, wie IFN- α und IL-18 mittels ProcartaPlex Immunassay untersucht.

Im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrolltieren führte eine Influenzavirusinfektion zu einer signifikant erhöhten Freisetzung von IFN- α (Abb. 24A), INF- γ (Abb. 24B), IL-1 β (Abb. 24C), IL-12p40 (Abb. 24E), IL-18 (Abb. 24F) sowie TNF- α (Abb. 24G). Zudem wurden auch für IL-6 (Abb. 24D) und MCP-1 (Abb. 24H) deutlich, jedoch nicht signifikant, erhöhte Konzentrationen im bronchoalveolären Raum nachgewiesen.

Dagegen wiesen mit Influenzavirus infizierte Tiere, die mit RvE1 oder 18R-HEPE behandelt wurden, eine vergleichbare Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie infizierte, Kontroll-behandelte Tiere auf. Die Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE hatte daher keinen Effekt auf die Virus-induzierte Zytokinproduktion 96 h nach Influenzavirusinfektion (Abb. 24).

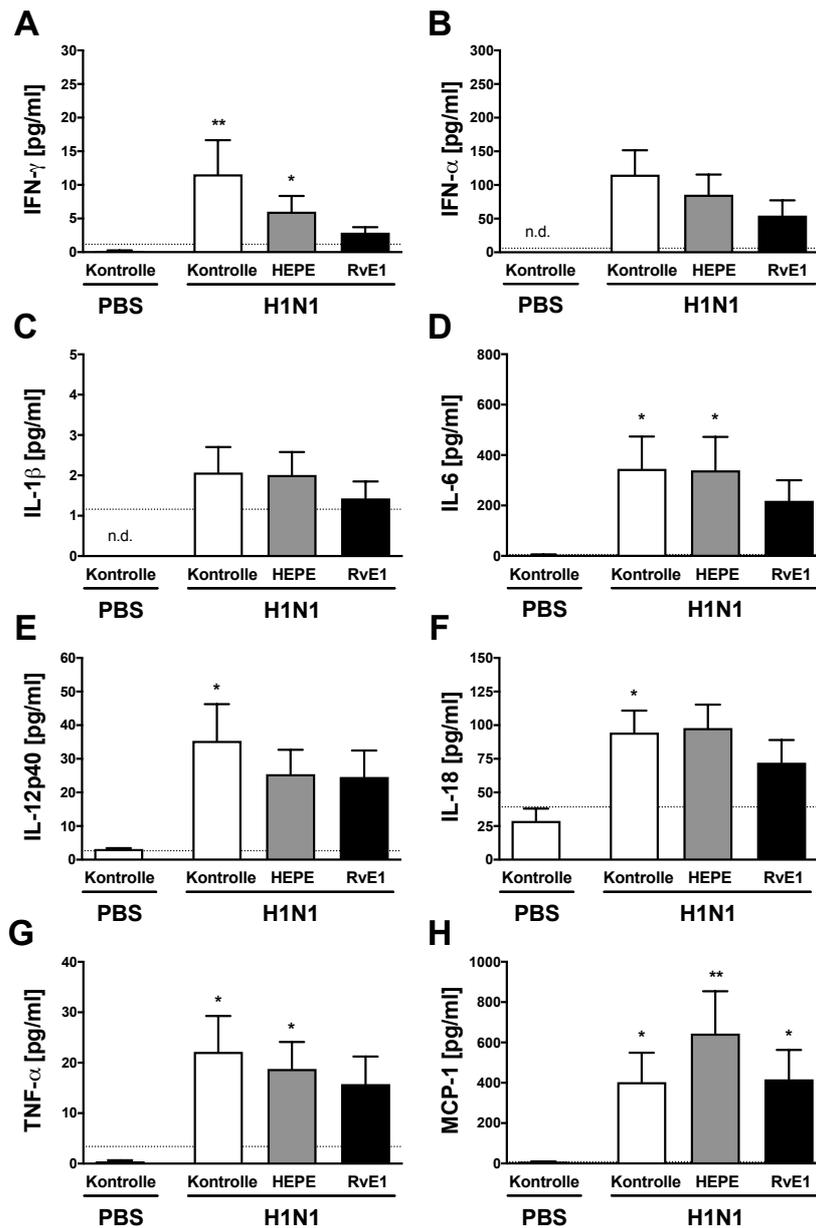


Abb. 24: Zytokine in der BALF 96 h nach Influenzavirusinfektion.

Mäuse wurden mit 100 PFU Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 μ g RvE1, 2 μ g 18R-HEPE oder Kontrolllösung (100 μ l). Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS infiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Versuchsdauer betrug 96 h. Die Zytokinkonzentrationen in der BALF wurden mittels ProcartaPlex Immunassay 96 h nach Infektion ermittelt: IFN- γ (A), INF- α (B), IL1- β (C), IL-6 (D), IL-12p40 (E), IL-18 (F), TNF- α (G), MCP-1 (H). Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* p <0,05, ** p <0,01 vs. nicht-infizierte, Kontroll-behandelte Versuchsgruppe; n =5-6). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test). Die gestrichelte Linie gibt die untere Detektionsgrenze des Assays an. *n.d.*: nicht detektierbar (Werte unterhalb der Nachweisgrenze).

5.4.3 RvE1 und 18R-HEPE haben keinen Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion im Blut nach Influenzavirusinfektion

Um den Einfluss von RvE1 auf die systemische Entzündungsantwort nach Influenzavirusinfektion zu eruieren, wurde am Versuchsende 72 h nach Infektion bei den Tieren Blut entnommen. Anschließend wurde der Anteil der B-Lymphozyten (Abb. 25A) und T-Lymphozyten (Abb. 25B), darüber hinaus der Anteil der neutrophilen Granulozyten (Abb. 25C) und inflammatorischen Monozyten (Abb. 25D) im Blut mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der B-Lymphozyten in infizierten, Kontroll-behandelten sowie infizierten und mit 18R-HEPE behandelten Tieren im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollgruppe. Alle weiteren analysierten Zellpopulationen blieben nach Infektion im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe unverändert. Ferner kam es innerhalb der infizierten Gruppen in keiner der untersuchten Zellpopulationen zu einer signifikanten Veränderung zwischen RvE1-beziehungsweise 18R-HEPE-behandelten Tieren und Kontroll-behandelten Tieren.

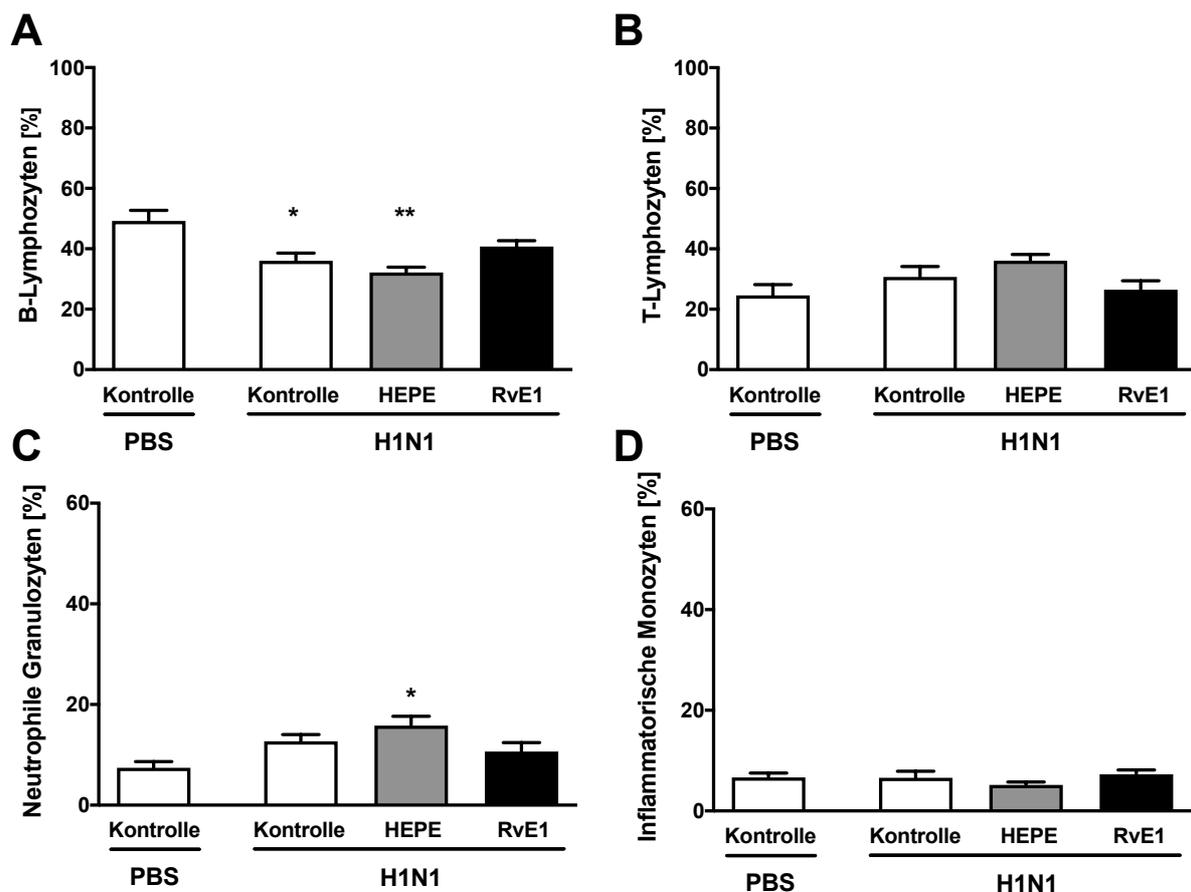


Abb. 25: Leukozytenpopulationen im Blut 96 h nach Influenzavirusinfektion.

Mäuse wurden mit 100 PFU Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Beginnend 48 h nach der Infektion erhielten die Mäuse im Abstand von 12 h eine intravenöse Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung (100 µl). Nicht-infizierte Tiere wurden entsprechend mit PBS infiziert und mit Kontrolllösung behandelt. Die Versuchsdauer betrug 96 h. B-Lymphozyten (A), T-Lymphozyten (B), neutrophile Granulozyten (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden nach 96 h im Blut isoliert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus nicht-infizierte Kontrollgruppe; $n = 8-10$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.5 RvE1 im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikatherapie: Einfluss auf die Resolution der Entzündung

Im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie wurden mögliche Effekte von RvE1 auf die Entzündungs- und Abwehrreaktion in der akuten Phase der Erregerabwehr untersucht. Ergänzend dazu sollten ebenso die Effekte des RvE1 auf die Auflösung der Entzündungsreaktion untersucht werden, in einer Phase, in der die Pathogene

nahezu beseitigt sind, die antimikrobielle Entzündungsreaktion abklingt und Reparationsprozesse einsetzen. Dafür wurde das Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikagabe herangezogen. Hierbei durchlaufen die Tiere eine klinisch apparente Pneumokokkenpneumonie, die jedoch durch die Gabe von Ampicillin im Verlauf der Erkrankung erfolgreich therapiert wird. Die Antibiotikatherapie ermöglicht es dabei, den Einfluss von RvE1 auf die Phase der Entzündungsauflösung und Gewebereparation ohne Störung durch eine andauernde Wirt-Pathogen-Interaktion zu untersuchen.

Dazu wurden Tiere mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Scheininfektion) transnasal infiziert. Die intraperitoneale (i.p.) Behandlung mit Ampicillin erfolgte erstmals 30 h p.i. und wurde ab 36 h p.i. bis 60 h p.i. im Abstand von 12 h fortgeführt. Simultan dazu erfolgte die Applikation von 1 μ g RvE1 oder Kontrolllösung subkutan (200 μ l s.c.). Der Beginn der RvE1-Behandlung wurde im Vergleich zum akuten Pneumokokkenpneumoniemodell auf 30 h p.i. verschoben, um den Effekt des Lipidmediators auf die Resolution und Terminierung der Entzündung, nicht aber auf frühere Stadien der akuten Entzündung zur aktiven Erregerabwehr einzugrenzen. Die Untersuchung einer mit 18R-HEPE behandelten Versuchsgruppe wurde zur Unterscheidung von lokalen und systemischen Effekten des RvE1 mitgeführt.

5.5.1 RvE1 hat keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie unter Antibiotikatherapie

Zur Überwachung des klinischen Verlaufs der Erkrankung erfolgte die regelmäßige Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse während der Versuchsdauer.

Die Auswertung dieser Parameter zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion ergab, dass infizierte Tiere einen signifikanten Abfall der Körpermasse im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren mit gleicher Behandlung zeigten. Nach Beginn der Therapie mit Ampicillin (30 h p.i.) sank die Körpermasse der infizierten Tiere nicht weiter ab, sondern blieb bis 60 h p.i. konstant und stieg bis zum Versuchsende 72 h p.i. auf $91,97 \pm 1,76\%$ (Mittelwert \pm SEM aller infizierten Tiere) des Ausgangswertes vor der Infektion wieder an (Abb. 26A). Nach Beginn der Antibiotikatherapie stieg auch die Körpertemperatur aller infizierten Gruppen wieder auf das Niveau der nicht-infizierten Tiere an (Abb. 26B).

Zwischen den infizierten Gruppen, die jeweils mit RvE1, 18R-HEPE oder Kontrolllösung behandelt wurden, zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Körpermasse und Körpertemperatur (Abb. 26). Ebenso veränderte sich die

Körpermasse und die Körpertemperatur der nicht-infizierten Tiere über den Versuchszeitraum nicht signifikant.

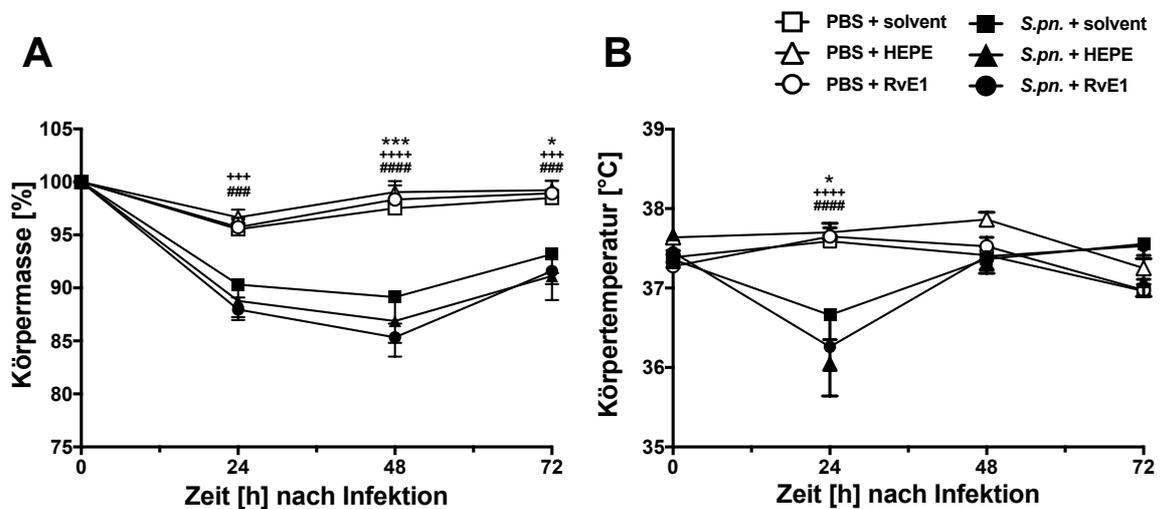


Abb. 26: Klinische Parameter nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.

Mäuse wurden transnasal mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) via Tröpfcheninfektion infiziert. Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt 30 h und ab 36 h p.i. alle 12 h eine subkutane Behandlung mit 1 μ g RvE1, 2 μ g 18R-HEPE oder Kontrolllösung (200 μ l). Parallel zur subkutanen Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 0,4 mg Ampicillin in 200 μ l steriler Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Die Versuchsdauer betrug 72 h. Die Körpermasse (A) und die Körpertemperatur (B) wurden zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h ausgewertet. Die Daten sind als Mittelwert und SEM angegeben (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ PBS + Kontrolle versus *S.pn.* + Kontrolle, +++ $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ PBS + HEPE versus *S.pn.* + HEPE, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$ PBS + RvE1 versus *S.pn.* + RvE1; $n = 8-10$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way RM ANOVA und Tukeys multiple comparisons Test.

5.5.2 RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Entzündungsreaktion in der Lunge nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie

5.5.2.1 Entzündungszellen in der BALF

Um den Einfluss von RvE1 auf die zelluläre Entzündungsantwort in der Lunge infizierter Mäuse unter Antibiotikatherapie zu untersuchen, wurde am Versuchsende 72 h nach Infektion eine BAL durchgeführt und die in der BALF enthaltenen Leukozyten mittels Durchflusszytometrie sowohl differenziert als auch quantifiziert.

Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Leukozytenpopulationen bei infizierten und Ampicillin-behandelten Tieren im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen (Abb. 27A). Die eingewanderten inflammatorischen Monozyten bildeten dabei den

Hauptanteil der rekrutierten Leukozyten zum Zeitpunkt 72 h *post infectionem* (Abb. 27D). Auch die Zahl der eingewanderten neutrophilen Granulozyten (Abb. 27B) und residenten Alveolarmakrophagen (Abb. 27C) zeigte sich tendenziell leicht erhöht bei *S. pneumoniae* infizierten, mit Antibiotikum-behandelten Tieren im Vergleich zur nicht-infizierten Vergleichsgruppe. Weder die RvE1- noch die 18R-HEPE-Behandlung ergab im Vergleich zur Kontroll-Behandlung signifikante Veränderungen auf die untersuchten Zellpopulationen der infizierten und mit Antibiotikum-behandelten Gruppen. Entsprechend der Ergebnisse im akuten Entzündungsmodell der Pneumokokkenpneumonie (48 h p.i. ohne Antibiotikatherapie) konnten zusammenfassend auch 72 h nach der Infektion mit *S. pneumoniae* und unter Antibiotikatherapie noch vermehrt Leukozyten im Bronchoalveolarraum nachgewiesen werden, wenn auch auf niedrigerem Niveau. Dabei dominierte jedoch vorrangig die Subpopulation der inflammatorischen Monozyten. Infizierte und mit Ampicillin-therapierte Mäuse wiesen jedoch weder durch die RvE1 noch die 18R-HEPE-Behandlung signifikante Unterschiede in den analysierten Leukozytensubpopulationen in der BALF auf.

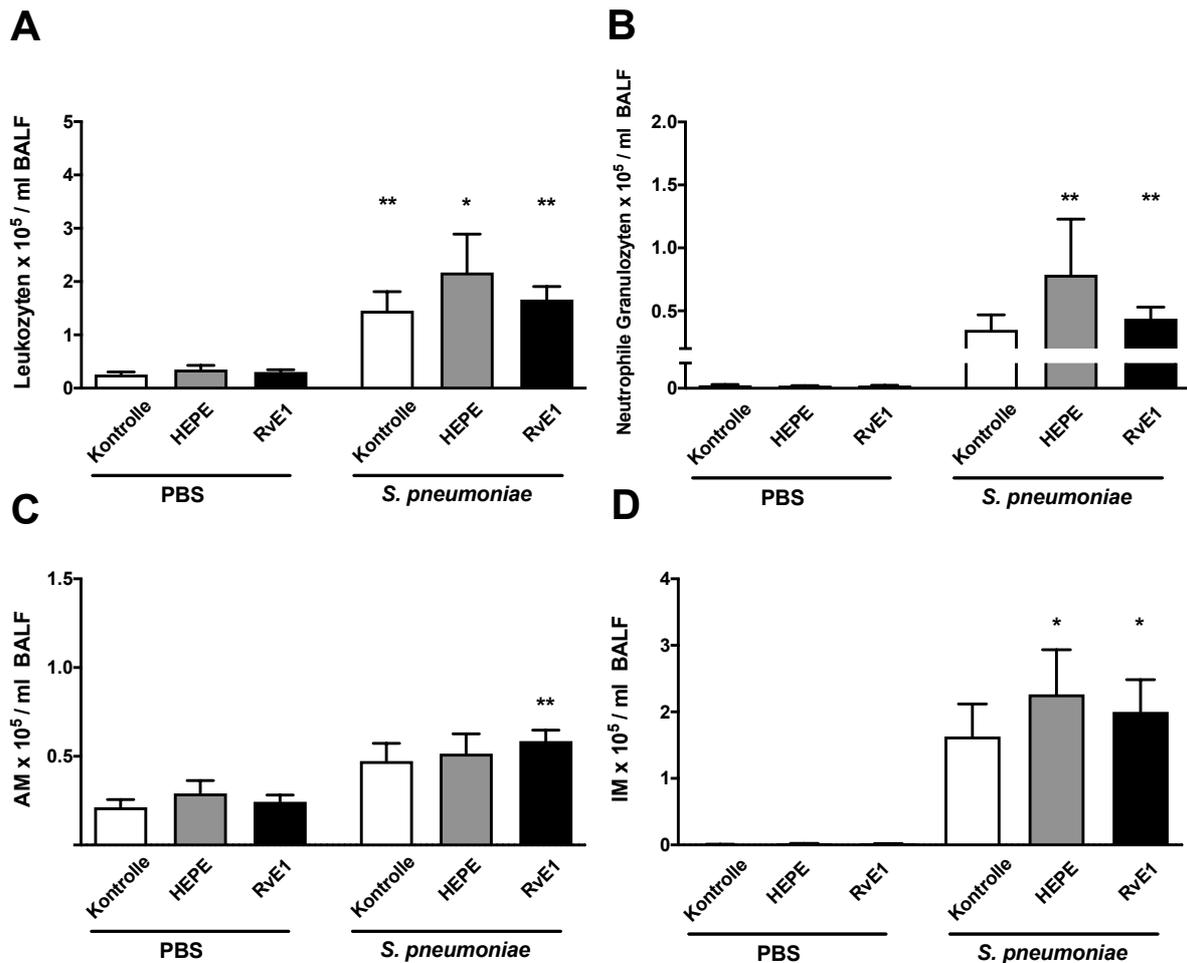


Abb. 27: Leukozytenpopulationen in der BALF 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie. Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt 30 h und ab 36 h p.i. alle 12 h eine subkutane Behandlung mit 1 μ g RvE1, 2 μ g 18R-HEPE oder Kontrolllösung (200 μ l). Parallel zur subkutanen Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 0,4 mg Ampicillin in 200 μ l steriler Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Leukozyten (A), neutrophile Granulozyten (B), Alveolarmakrophagen (AM) (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden nach 72 h in der bronchoalveolären Flüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus nicht-infizierte Kontrollgruppe mit gleicher Behandlung; $n = 8-10$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.5.2.2 Zytokine in der BALF

Zur Ermittlung der resolutionsfördernden Eigenschaften von RvE1 in der murinen Pneumokokkenpneumonie wurde ergänzend zur Analyse der zellulären Entzündungsreaktion in der BALF auch die Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine mittels ProcartaPlex *Immunassay* evaluiert.

Hierbei waren die Zytokinspiegel in nicht-infizierten Kontrollgruppen nicht detektierbar bzw. unterhalb der Detektionsgrenze. In infizierten Versuchsgruppen induzierte die Pneumokokkeninfektion eine nachweisbare, jedoch nicht signifikante Freisetzung von TNF- α (Abb. 28A), IL-6 (Abb. 28B), IL-12p40 (Abb. 28C), IFN- γ (Abb. 28D) und MCP-1 (Abb. 28E) in den Bronchoalveolarraum.

Zwischen den RvE1- bzw. 18R-HEPE-behandelten und den Kontroll-behandelten Tieren zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in den analysierten Entzündungsmediatoren in der BALF, weder mit noch ohne Infektion. Es konnte demnach kein Effekt von RvE1 auf die Zytokinproduktion nachgewiesen werden.

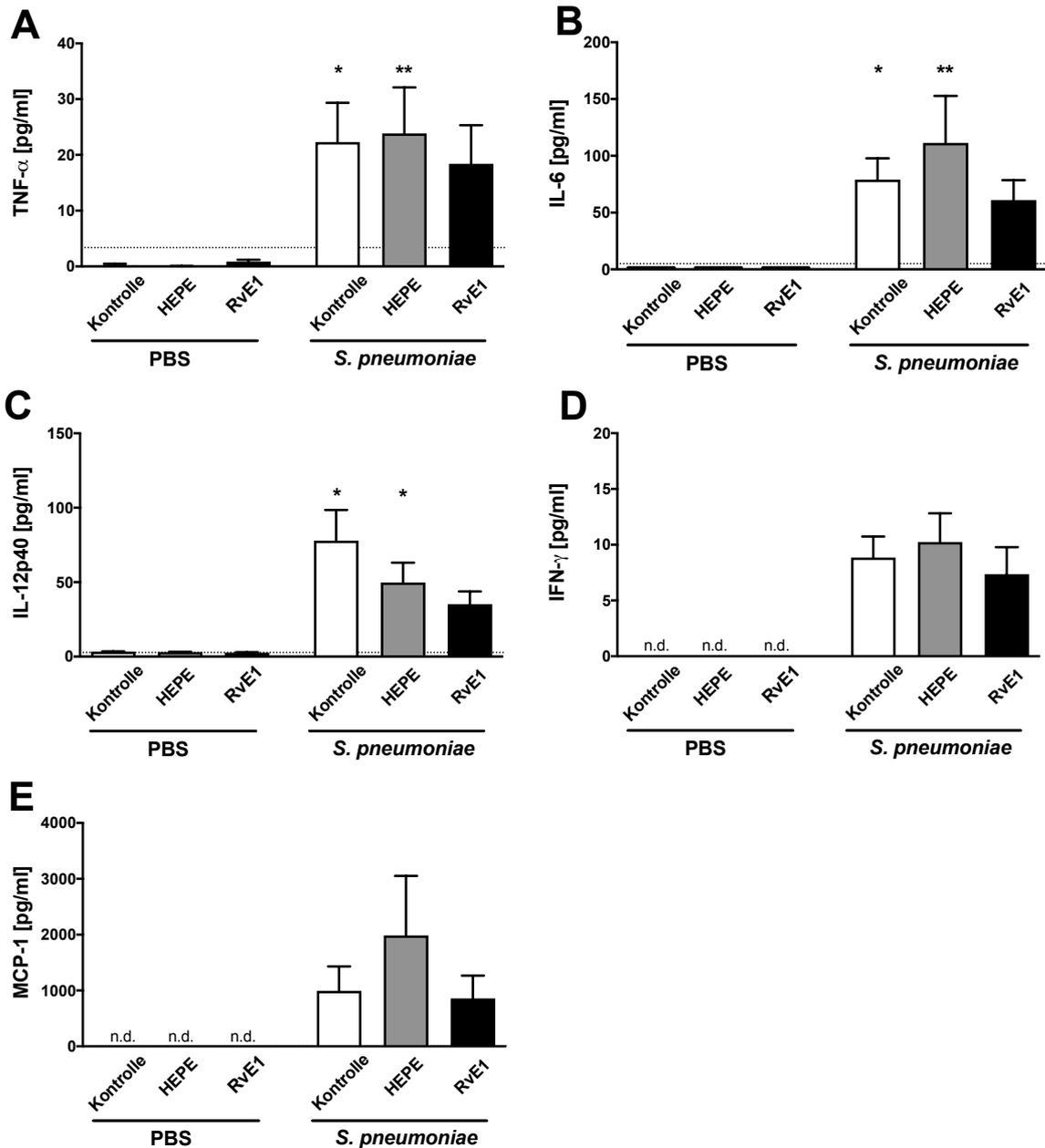


Abb. 28: Zytokinproduktion in der BALF 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt 30 h und ab 36 h p.i. alle 12 h eine subkutane Behandlung mit 1 μ g RvE1, 2 μ g 18R-HEPE oder Kontrolllösung (200 μ l). Parallel zur subkutanen Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 0,4 mg Ampicillin in 200 μ l steriler Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Nach 72 h erfolgte die Bestimmung von TNF- α (A), IL-6 (B), IL-12p40 (C), IFN- γ (D) und MCP-1 (E) mittels ProcartaPlex *Immunoassay*. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ versus nicht-infizierte Kontrollgruppe mit gleicher Behandlung). Die gestrichelte Linie gibt die untere Detektionsgrenze des Assays an. n.d.: nicht detektierbar (Werte unterhalb der Nachweisgrenze).

5.5.3 RvE1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion im Blut nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie

Um eventuelle direkte Effekte des RvE1 oder 18R-HEPE im Blut nach subkutaner Applikation auszuschließen und resolutionsbedingte Veränderungen bei *S. pneumoniae*-Infektion unter Antibiotikatherapie zu eruieren, wurden B-Lymphozyten (Abb. 29A), T-Lymphozyten (Abb. 29B), neutrophile Granulozyten (Abb. 29C) und inflammatorische Monozyten (Abb. 29D) 72 h nach Infektion im Blut mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

Dabei induzierte die Infektion mit *S. pneumoniae* unter Antibiotikabehandlung zum untersuchten Zeitpunkt keine signifikante Veränderung der analysierten Leukozytensubpopulationen im Vergleich zur jeweils nicht-infizierten Behandlungsgruppe. Auch führte weder eine RvE1- noch eine 18R-HEPE-Behandlung zu einer Veränderung des leukozytären Blutbildes bei nicht-infizierten Tieren und infizierten Tieren mit Antibiotikabehandlung im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-behandelten Tieren.

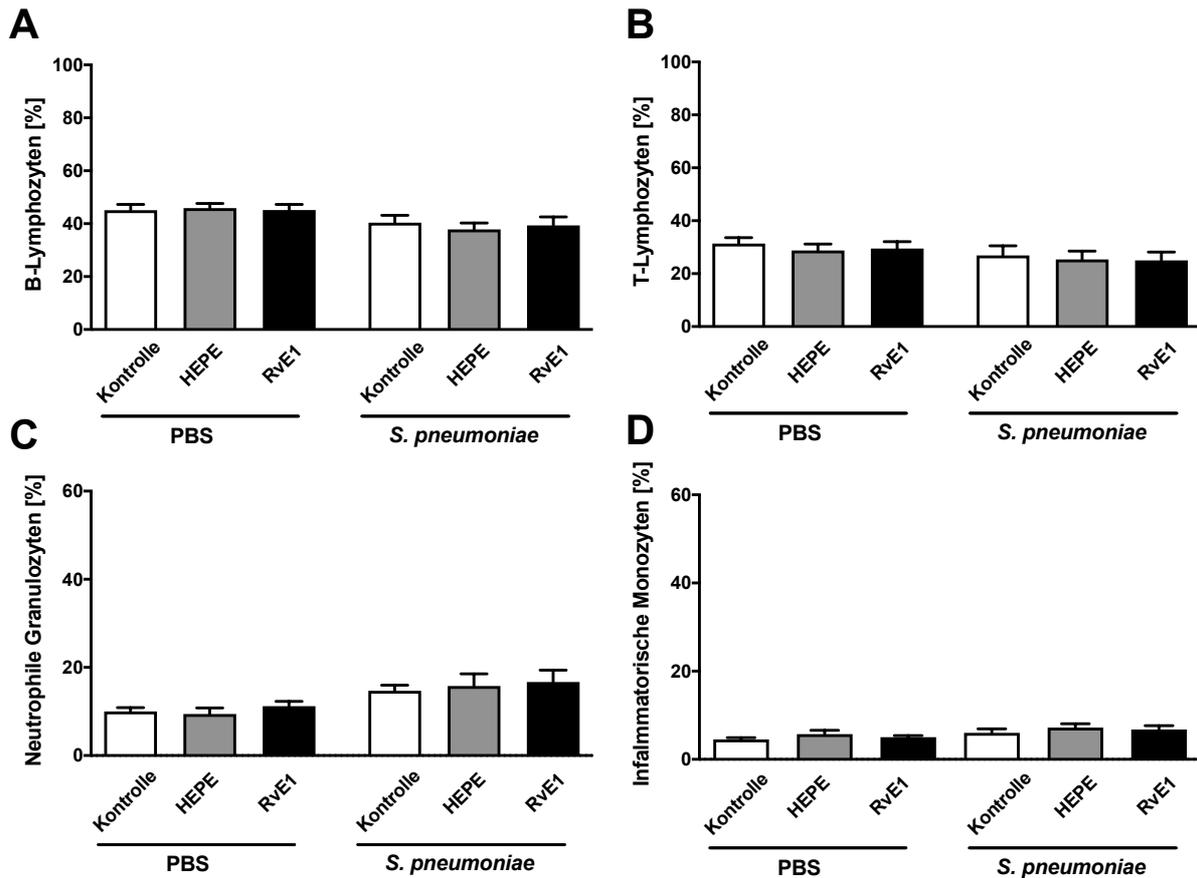


Abb. 29: Leukozytenpopulationen im Blut 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal via Tröpfcheninfektion infiziert. Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt 30 h und ab 36 h p.i. alle 12 h eine subkutane Behandlung mit 1 μ g RvE1, 2 μ g 18R-HEPE oder Kontrolllösung (200 μ l). Parallel zur subkutanen Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 0,4 mg Ampicillin in 200 μ l steriler Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. B-Lymphozyten (A), T-Lymphozyten (B), neutrophile Granulozyten (C) und inflammatorische Monozyten (IM) (D) wurden nach 72 h aus dem Blut isoliert und mittels Durchflusszytometrie differenziert. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (n=8-10). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

5.5.4 RvE1 bewirkt keine Veränderung der pulmonalen Barrierestörung nach Pneumokokkeninfektion und Antibiotikatherapie

Um die Auswirkung der lokalen und systemischen RvE1-Substitution auf die Wiederherstellung der endo-epithelialen Barriere in der Lunge nach Infektion mit *S. pneumoniae* unter Antibiotikatherapie analysieren zu können, wurde die endo-epitheliale Schrankenstörung in der Lunge quantifiziert. Dafür erfolgte die Messung der Konzentration von murinem Serumalbumin (MSA) in der BALF sowie im Plasma mittels ELISA. Da bei einer pulmonalen Schrankenstörung Albumin aus dem Blut in

den Bronchoalveolarraum übertritt, kann der Quotient aus dem gemessenen Albumin in BALF und Plasma anschließend als Maß zur Quantifizierung der Schrankenstörung verwendet werden.

Die Analysen ergaben, dass infizierte Tiere 72 h nach Infektion auch unter Antibiotikatherapie noch einen leicht erhöhten, wenn auch nicht in allen Versuchsgruppen signifikanten, MSA-Quotienten im Vergleich zu ihren entsprechenden nicht-infizierten Kontrollgruppen aufwiesen. Dabei zeigte weder die RvE1- noch die 18R-HEPE-Behandlung im Vergleich zur Kontroll-Behandlung signifikante Effekte auf die Integrität der pulmonalen Blut-Luft-Schranke der infizierten und mit Antibiotikum-behandelten Versuchsgruppen. Ein positiver Einfluss der lokalen oder systemischen RvE1-Substitution in Kombination mit der Antibiotikatherapie auf die Wiederherstellung der endo-epithelialen Barriere in der Lunge blieb somit aus (Abb. 30).

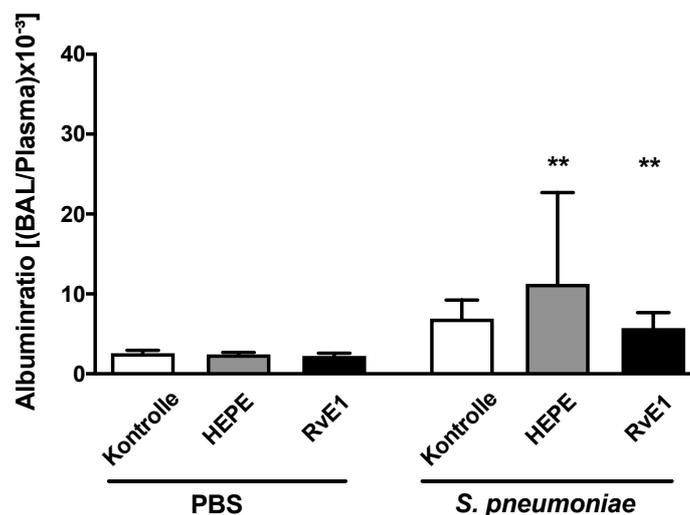


Abb. 30: Pulmonale Schrankenstörung 72 h nach Pneumokokkeninfektion mit Antibiotikatherapie.

Mäuse wurden mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* oder PBS (Kontrolle) transnasal *via* Tröpfcheninfektion infiziert. Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt 30 h und ab 36 h p.i. alle 12 h eine subkutane Behandlung mit 1 µg RvE1, 2 µg 18R-HEPE oder Kontrolllösung (200 µl). Parallel zur subkutanen Behandlung wurden die Tiere jeweils mit 0,4 mg Ampicillin in 200 µl steriler Kochsalzlösung intraperitoneal behandelt. Murines Serumalbumin (MSA) wurde 72 h nach Infektion mittels ELISA in BALF und Plasma quantifiziert. Als Maß für die pulmonale Schrankenstörung wurde der MSA Quotient BALF/Plasma bestimmt. Die Daten sind als Mittelwert + SEM angegeben (** $p < 0,01$ versus nicht-infizierte Kontrollgruppe mit gleicher Behandlung; $n=8$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunns post-hoc Test.

6 Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der Einfluss des Lipidmediators Resolvin E1 (RvE1) auf die pulmonale Immunabwehr und ihre Resolution in verschiedenen Pneumoniemodellen untersucht.

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie gelang erstmals die Anfärbung der RvE1-Zielrezeptoren BLT-1 und ChemR23 auf strukturegebenden Zellen sowie auf ortsständigen Zielzellen der pulmonalen angeborenen Immunität in humanen Lungenexplantaten. Zur Evaluation der anti-inflammatorischen Effekte von RvE1 ex-vivo erfolgte die Stimulation von humanen Lungenexplantaten mit LPS oder MALP-2. Die Genexpression der Zielrezeptoren sowie die Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren blieb jedoch von der Behandlung mit RvE1 unbeeinflusst.

Durch Anwendung von drei murinen Pneumoniemodellen gelang die Abbildung verschiedener Stadien der pulmonalen Entzündungsreaktion in-vivo bei therapeutischer Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE nach Pathogeninfektion. Dabei wurden die Effekte einer RvE1 bzw. 18R-HEPE Behandlung auf die pulmonale und systemische Entzündungsreaktion, die Erregerelimination, die pulmonalvaskuläre Schrankenstörung sowie den klinischen Verlauf der Infektion untersucht. Hierbei zeigten sich keine Hinweise auf anti-inflammatorische Effekte, weder im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie, noch in dem der frühen Influenzaviruspneumonie. Auch resolutions-fördernde Effekte durch eine Behandlung mit RvE1 im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikatherapie blieben aus.

6.1 Nachweis der BLT-1 und ChemR23 Expression in humanem Lungengewebe

Resolvin E1 interagiert selektiv mit seinen GPC-Zielrezeptoren BLT-1 und ChemR23 (86, 95). In noch unpublizierten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Witzernath konnte eine Expression von ChemR23 und BLT-1 bislang nur in murinem Lungengewebe mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass BLT-1 vor allem auf Bronchialepithelzellen sowie Alveolarmakrophagen und vereinzelt auch auf Makrophagen und Endothelzellen exprimiert wird. Ebenso ließ sich eine mittel- bis hochgradige Expression von ChemR23 auf Bronchialepithelzellen sowie Makrophagen darstellen. Ferner zeigte sich eine vereinzelte Expression auf neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es nun erstmalig, die basale Expression von RvE1-Zielrezeptoren gleichzeitig in strukturellen Zellen sowie Zellen der angeborenen Immunität im Zellverband von humanen Lungengewebschnitten mittels Immunhistochemie nachzuweisen. Hierbei zeigten Alveolarepithel-, Bronchialepithel- und Endothelzellen sowie Alveolarmakrophagen positive Signale der anti-BLT-1-Antikörper. Signale der spezifischen anti-ChemR23-Antikörper wurden bei Alveolarepithel- und Endothelzellen sowie Alveolarmakrophagen detektiert (vgl. Kapitel 5.1, Abb. 10).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei BLT-1 und ChemR23 um konservierte Epitope handelt, welche unter anderem sowohl auf murinen und humanen Zellen exprimiert werden. So konnten bereits publizierte *in-vitro* Studien die Expression von ChemR23 sowohl auf humanen als auch murinen Zellen der angeborenen sowie adaptiven Immunität zeigen. Beispielsweise detektierten Samson et al. (142) für ChemR23 kodierende mRNA mittels Northernblot in humanen dendritischen Zellen und Makrophagen. Mittels Dot-Blot-Technik und anschließender RT-PCR wiesen Arita et al. (85) die Expression von ChemR23 in humanen Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten nach. Luangsay et al. (143) zeigten mittels RT-PCR die Expression von ChemR23 in murinen plasmazytoiden dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen.

BLT-1 wurde erstmalig mittels Northernblot in hoher Konzentration bei menschlichen Leukozyten nachgewiesen (99). Die Proteinexpression von BLT-1 wurde seither mittels Durchflusszytometrie sowie Westernblot unter anderem auf neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten gezeigt (144-146). Northern-Blotting ergab eine ähnliche Expression bei murinen eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (147).

Neben der Expression durch Zellen der angeborenen und adaptiven Immunität wurden ChemR23 und BLT-1 auch auf strukturellen Zellen wie Endothelzellen oder glatten Muskelzellen nachgewiesen (91, 148).

Im Hinblick auf die pulmonale Expression der RvE1-Zielrezeptoren im Lungengewebe ist jedoch wenig bekannt. Bisher existieren quantitative Nachweise der Expression von BLT-1 oder ChemR23 in Lungengewebshomogenaten oder auf glatten bronchialen Muskelzellen mittels RT-PCR, Westernblot oder Durchflusszytometrie (85, 143). Durch den histologischen Nachweis der Zielrezeptoren im Zellverband gelang darüber hinaus die zelluläre Auflösung der Expression der Zielrezeptoren im Lungengewebe (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung). So war es möglich, erstmals BLT-1 und ChemR23 auf Alveolarepithelzellen, pulmonalen Endothelzellen und Alveolarmakrophagen im humanen Lungengewebe nachzuweisen. Der Nachweis der

RvE1-Zielrezeptoren auf strukturellen Zellen und Immunzellen in humanen und murinen Lungengewebeschnitten legt den Schluss nahe, dass RvE1 die in der Literatur beschriebenen anti-inflammatorischen und resolutionsfördernden Effekte auch in Inflammationsprozessen in der Lunge zu vermitteln vermag.

6.2 Exogene Applikation von RvE1 hat keinen Einfluss auf sterile Stimulationsmodelle in humanem Lungengewebe

Nach dem erfolgreichen immunhistochemischen Nachweis von ChemR23 und BLT-1 in humanen und murinen Lungengewebebeobachtungen (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung, Abb. 11) wurden im nächsten Schritt humane Lungengewebeexplantate mit RvE1 vorbehandelt und nachfolgend mit LPS oder MALP-2 stimuliert, um die Auswirkungen von RvE1 auf die Entzündungsreaktion im humanen Lungengewebe zu untersuchen. Die Stimulation mit dem TLR-4-Liganden LPS diente hierbei zur sterilen Nachahmung einer pulmonalen Infektion durch Gram-negative Erreger (149)(154). Die Stimulation von Lungengewebe mit dem TLR-2/6-Agonisten MALP-2 diente dagegen der Nachahmung einer pulmonalen Infektion durch Gram-positive Pneumokokken (140, 150). Die Quantifizierung der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8 erfolgte aus Überständen der Lungengewebskultur mittels ELISA. Zusätzlich zur Analyse der Zytokinproduktion wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Genexpression der RvE1-Zielrezeptoren im humanen Lungengewebe nach Immunstimulation mit LPS oder MALP-2 mittels qPCR bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Expression von BLT-1 und ChemR23 im sterilen Inflammationsprozess im menschlichen Lungengewebe weder nach MALP-2 noch nach LPS-Stimulation verändert war. Dies steht im Gegensatz zu Beobachtungen im Mauslungengewebe, die zeigen, dass BLT-1 in der Phase der akuten Entzündung und ChemR23 in der Phase der Resolution im Rahmen der murinen Pneumokokkenpneumonie tendenziell verstärkt exprimiert werden (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung). Auch Qiu et al. (151) zeigten mittels RT-PCR, dass sich die Expression von BLT-1 in humanen Endothelzellen 60 Minuten nach Stimulation mit LPS oder Leukotrien-B4 signifikant steigert. Arita et al. (85) beobachteten mittels RT-PCR eine verstärkte ChemR23-Expression bei humanen Makrophagen 24 h nach Stimulation mit TNF- α oder INF- γ .

In der vorliegenden Arbeit wirkte sich eine exogene Behandlung mit RvE1 weder positiv noch negativ auf die Expression der Zielrezeptoren im humanen Lungengewebe aus. Möglicherweise war die veränderte Expression von BLT-1 durch

den späten Untersuchungszeitpunkt einer Analyse nicht mehr zugänglich. Ferner wurden in der aktuellen Studie im Unterschied zu klassischen *in-vitro* Versuchsmodellen nicht nur einzelne Zelltypen untersucht. Durch die Analyse der Rezeptorexpression in humanen Lungengewebshomogenaten konnten mögliche differente Expressionsmuster einzelner Zelltypen demnach nicht erkannt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus nach RvE1-Behandlung keine verminderte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren im humanen Lungengewebe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der aktuell publizierten Erkenntnisse jedoch nicht gänzlich unerwartet. Der Effekt von RvE1 und anderen n-3 PUFA-Derivaten auf die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren nach Immunstimulation wurde bereits in mehreren *in-vitro* Studien mit zum Teil gegensätzlichen Ergebnissen untersucht (75). So zeigten Hecker et al., dass die präventive Gabe von n-3 PUFA-haltigen Lipidlösungen im Mausmodell vor LPS-Inhalation zur Induktion eines akuten Lungenversagens unter anderem die Konzentration der pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der BALF signifikant reduzierte (75). Auch in isolierten murinen Peritonealmakrophagen reduzierte RvE1 die Expression von TNF- α nach LPS-Stimulation (115). Ebenso untersuchten Waechter et al. (152)(157) die Freisetzung von TNF- α aus Zellkulturüberständen in murinen Makrophagen, welche sich durch präventive Behandlung mit dem RvE1-Vorläufermolekül 18R-HEPE und nachfolgender LPS-Stimulation reduzierte. Im Gegensatz dazu vermeldeten andere Studien konträre Ergebnisse. So berichteten Skuladottir et al. (153) und Hardadottir et al. (154) zum Beispiel über erhöhte TNF- α Spiegel die von murinen Makrophagen *in-vitro* nach LPS-Stimulation produziert wurden, wenn diese mit n-3-PUFAs vorinkubiert wurden.

Bezüglich des Effekts präventiver RvE1-Behandlung auf die Bildung pro-inflammatorischer Mediatoren nach MALP-2 Immunstimulation oder Stimulation mit anderen TLR-2/TLR-6-Agonisten *in-vitro* existieren bisher keine Untersuchungen. Die gewonnenen eigenen Daten sprechen jedoch unter Vorbehalt der im Folgenden diskutierten Limitationen gegen einen direkten anti-inflammatorischen Effekt von RvE1 bei der Produktion von Entzündungsmediatoren in Entzündungszellen nach MALP-2 Stimulation.

6.3 Limitationen des verwendeten *ex-vivo* Modells

Im Unterschied zu klassischen *in-vitro* Versuchsmodellen wird bei der Kultivierung von humanem Lungengewebe *ex-vivo* nicht auf einzelne Zelltypen zurückgegriffen. Durch den Erhalt der strukturellen Integrität des Lungengewebes ist es zwar möglich, komplexe Signalwege und die Kommunikation zwischen Zellen in ihrem ursprünglichen, physiologischen Gewebeverband zu analysieren (132, 155). Gleichzeitig erschwert die simultane Betrachtung unterschiedlicher Zelltypen sowie die höhere Komplexität des Versuchsmodells die Sichtbarmachung etwaiger individueller anti-inflammatorischer Effekte des RvE1 auf einzelne Zellpopulationen und kann zu insgesamt negativen Ergebnissen führen, obwohl gegebenenfalls Einzeleffekte auftreten.

Die Erhaltung der dreidimensionalen Struktur des Lungengewebes ermöglicht zwar die Untersuchung verschiedener Zelltypen der Lunge. Allerdings fehlt die Migration von Zellen der angeborenen Immunität aus dem Blut in das Lungengewebe. Diese ist jedoch im Hinblick auf Untersuchungen von möglichen RvE1-Behandlungseffekten im Rahmen von Entzündungsprozessen besonders wichtig. Zum einen verringert RvE1 die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, welche das entzündete Gewebe infiltrieren (69). Zum anderen erhöht es die Aktivierung und Migration von Monozyten aus dem Blut, welche sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Mittels Efferozytose phagozytieren Makrophagen apoptotische Zellen und Zellerfallsprodukte. Gleichzeitig vermitteln sie den Abtransport dieser Zelltrümmer und tragen somit maßgeblich zur Gewebsnormalisierung bei. Resolutionsfördernde Lipidmediatoren sind an beiden Prozessen entscheidend beteiligt. So erhöht RvE1 nachweislich sowohl die Efferozytoserate von Makrophagen und fördert zudem den Abtransport von mit Zelltrümmern beladenen Makrophagen über das Lymphsystem (90, 156). Zusammengenommen mit der anti-inflammatorischen Wirkung von RvE1 auf neutrophile Granulozyten (85, 92, 108, 109, 111) können diese Prozesse im humanen Lungengewebsmodell nur unzureichend dargestellt werden.

Neben dem Einwandern von Immunzellen fehlt darüber hinaus auch der Zustrom von Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen über die Blutbahn, sodass die Untersuchung dieser Effekte im Rahmen der Entzündungsreaktion nicht möglich ist. Zudem kommt es durch das Fehlen einer konstanten Versorgung mit Sauerstoff zur Gewebehypoxie, welche das verwendete Zellmedium nur kurzfristig kompensieren kann, sodass Zelltod oder Nekrose unabhängig von der Stimulation auftreten (157). Daher ist die Dauer der Kultivierung, sowie der Untersuchungszeitraum begrenzt, was sich nachteilig auf die Untersuchung von Resolutionsprozessen auswirkt.

Auch die Art des Einbringens der stimulatorischen Reize unterscheidet sich im humanen Lungengewebsmodell vom natürlichen Infektionsweg im Tiermodell sowie beim Menschen. Hier wird der Erreger nicht direkt in die Alveolen eingebracht, sondern gelangt durch transnasale Applikation via Tröpfcheninfektion erst nach dem Überwinden von Nasengängen, Trachea und Bronchien in den Alveolarraum.

Vor diesem Hintergrund und um den Einfluss von RvE1 auf murine Zellverbände zu eruieren, wurden zusätzlich zu den *in-vitro* Experimenten weitere Untersuchungen in Mausmodellen *in-vivo* durchgeführt.

6.4 RvE1 und 18R-HEPE entfalten keine Wirkung in akuten Inflammationsmodellen

Das hier verwendete Tiermodell der akuten Pneumokokkenpneumonie wurde in zahlreichen experimentellen Studien der Arbeitsgruppe etabliert und validiert (133, 137, 139, 140). Es bietet die beste Möglichkeit, den Einfluss von RvE1 auf den akuten pulmonalen Inflammationsprozess während einer klinisch relevanten Infektion zu eruieren, um mögliche anti-inflammatorische Effekte einer RvE1-Behandlung zu identifizieren.

Parallel dazu wurde zudem RvE1 im Modell der murinen Influenza-A-Virusinfektion der Lunge untersucht, um mögliche anti-inflammatorische Wirkungen von RvE1 auf die frühe Phase der viral-bedingten Entzündungsreaktion zu beleuchten.

Im Krankheitsmodell der akuten Pneumokokkenpneumonie sowie der pulmonalen Influenzavirusinfektion kommt es im zeitlichen Verlauf der Erkrankung zu unterschiedlich stark ausgeprägten klinischen Symptomen. So induziert die Infektion mit *S. pneumoniae* (Serotyp 3, PN36) bereits nach 48 h eine ausgeprägte Pneumonie mit andauernder Erregervermehrung, anschließendem Übertritt der Pneumokokken in die Blutbahn und weiter progredientem Verlauf (133, 139). Entsprechend kam es erwartungsgemäß im hier untersuchten Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie ebenfalls zu einem hochsignifikanten Abfall der Körpermasse und der Körpertemperatur bei infizierten Mäusen, im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollmäusen. Im Zuge der Influenzavirusinfektion erfolgt jedoch in den ersten Tagen nach der Infektion zunächst die Virusreplikation in der Lunge mit milder Entzündungsreaktion. So zeigte sich auch in der aktuellen Studie 96 h nach Infektion, wie in der Literatur beschrieben, noch kein signifikanter Körpermasseabbau oder eine Hypothermie. Damit decken sich die beobachteten klinischen Parameter zum

Zeitpunkt der Analyse des jeweiligen Modells mit den in der Literatur beschriebenen Krankheitsverläufen (140, 158).

Seki et al. zeigten, dass RvE1 in einem murinen Modell der Aspirationspneumonie mit anschließender *E. coli* Infektion die Erregerlast im Lungengewebe deutlich reduzierte und das Überleben RvE1-behandelter Tiere verbesserte (113).

Entgegen der in der Literatur beschriebenen Effekte hatte eine Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE allerdings in beiden getesteten Modellen keine Effekte auf den Krankheitsverlauf der pulmonalen Infektion. Die mit *S. pneumoniae*-infizierten, RvE1-behandelten Tiere waren vergleichbar hypotherm und verloren ebenso viel Körpermasse wie Kontroll-behandelte, infizierte Tiere. Dabei wurden 48 h Stunden nach Infektion nicht nur eine Erregerinvasion in das bronchoalveoläre Kompartiment und das umliegende Lungengewebe gezeigt, sondern ebenso ein unveränderter Erregerübertritt in die Blutstrombahn nachgewiesen. Hier unterschied sich die Anzahl der Kolonie-bildenden Einheiten in BALF, Lungengewebe und Blut jedoch nicht signifikant zwischen den Gruppen, welche eine RvE1- oder eine Kontroll-Behandlung erhielten.

Als Zeichen der erfolgreichen Infektion mit den Influenzaviren zeigten Mäuse im Modell der Influenzapneumonie vier Tage nach der Infektion eine gegenüber der verabreichten Infektionsdosis (100 PFU) deutlich gestiegene Viruslast (mittlere Erregerlast von $2,34 \times 10^6$ PFU in der Kontroll-behandelten infizierten Gruppe). Dagegen unterschied sich die Erregerlast im Lungengewebe zwischen den Versuchsgruppen, welche eine RvE1-, 18R-HEPE- oder eine Kontroll-Behandlung erhielten, nicht. Direkte therapeutische Effekte von RvE1 auf die Viruslast sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die therapeutische Gabe von Protectin D1 hingegen begünstigte den Krankheitsverlauf in einem murinen Influenzavirusinfektionsmodell mit dem Substamm H7N9 (159). Allerdings wirkte Protectin D1 nicht klassisch resolutionsfördernd, sondern supprimierte die Virusreplikation und entfaltete somit eine direkte antivirale Wirkung (160).

6.4.1 Lokale Entzündungsreaktion

In den durchgeführten *in-vivo* Experimenten wurde zudem der Einfluss von RvE1 auf die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge untersucht. Im Fokus standen dabei mögliche anti-inflammatorische Effekte von RvE1 auf die zelluläre Entzündungsabwehr sowie die Produktion pro-inflammatorischer, anti-

inflammatorischer und infektionsspezifischer Mediatoren während der akuten Phase der Pneumokokkenpneumonie sowie der frühen Influenzavirusinfektion.

In Bezug auf die zelluläre Entzündungsabwehr der Lunge reduzierte RvE1 in verschiedenen murinen Inflammationsmodellen die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an den Ort der Entzündung (69, 82, 122). So wurde nachgewiesen, dass RvE1 die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten vermindert und die Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD18 an der Endotheloberfläche reduziert (112). Gleichzeitig stabilisierte es die Funktion von pulmonalen Makrophagen nach oxidativem Stress und verlängerte somit das Überleben der an der initialen Erregerabwehr beteiligten Alveolarmakrophagen (128). Diese beschriebenen Effekte kommen vor allem in der akuten Entzündungsphase zum Tragen, welche durch einen massiven Einstrom gewebsschädigender neutrophiler Granulozyten bei gleichzeitig hoher Erregerkonzentration am Ort der Entzündung gekennzeichnet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten nicht genauer untersucht. Dagegen erfolgte die Differenzierung von Leukozytensubpopulationen in der BALF im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie. Unter Berücksichtigung möglicher anti-inflammatorischer Effekte auf neutrophile Granulozyten würde eine RvE1-Behandlung indirekt die Einwanderung dieser Zellen in den bronchoalveolären Raum reduzieren. Obwohl die Infektion mit *S. pneumoniae* wie bereits beschrieben (133, 137, 140) eine deutliche Rekrutierung vor allem von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in den bronchoalveolären Raum induzierte, unterschied sich interessanterweise die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der BALF RvE1-behandelter Tieren nicht von Kontroll-behandelten Tieren nach Pneumokokkeninfektion. Auch die Gesamtanzahl der Leukozyten sowie die Anzahl der Alveolarmakrophagen und inflammatorischen Monozyten in der BALF RvE1-behandelter infizierter Tiere war vergleichbar mit der Kontroll-behandelter, infizierter Tiere.

Aufgrund der intrazellulären Replikation von Influenzaviren mit anschließender Lyse der befallenen Wirtszelle und Affektion des benachbarten Zellverbands, wirkt sich bereits eine frühe Influenzavirusinfektion nachteilig auf das Lungengewebe aus und führt zu einer broncho-interstitiellen Pneumonie (11). Es ist daher anzunehmen, dass Effekte von RvE1 demnach zusätzlich zur BALF auch im Lungengewebe nachzuweisen sind. Daher erfolgte eine kombinierte Analyse der Leukozytensubpopulationen in BALF und Lungengewebe. Jedoch reduzierte weder systemisch noch lokal (nach 18R-HEPE-Behandlung) appliziertes RvE1 die durch neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten hervorgerufene zelluläre

Entzündungsreaktion, noch beeinflusste es die Anzahl von Alveolarmakrophagen. Vergleichbare Studien zu den Effekten des RvE1 bei pulmonaler Influenzavirusinfektion fehlen leider bislang. Dagegen führten Wang et al. Untersuchungen zur Wirksamkeit von RvD1 in einem Infektionsmodell durch, bei dem Mäuse einerseits mit Influenzaviren des Subtyps H3N2 und zusätzlich mit *S. pneumoniae* infiziert wurden (161). In diesem Modell reduzierte die RvD1 Applikation die Anzahl der in die Lunge eingewanderten neutrophilen Granulozyten und Monozyten und erleichterte so die Pneumokokken-clearance. Allerdings erfolgte anders als in der vorliegenden Arbeit eine Superinfektion mit *S. pneumoniae*. Somit ist nicht klar abzugrenzen, ob sich die Effekte von RvD1 positiv auf die antivirale Erregerabwehr auswirkten, oder ausschließlich die Resolution der bakteriellen Superinfektion positiv beeinflussten. Darüber hinaus erfolgte die Administration von RvD1 nicht intravenös, sondern transnasal. Obwohl RvD1 und RvE1 beide zu den resolutionsfördernden Lipidmediatoren gehören, werden sie aus unterschiedlichen Vorläuferstufen über unterschiedliche Enzyme synthetisiert (die unterschiedlichen Kontrollmechanismen unterliegen) und wirken zudem auch über andere Rezeptoren (71, 74, 83, 162). Zudem erfolgte im aktuellen Projekt und in der publizierten Studie (158) keine Messung der Konzentration von RvD1 bzw. RvE1 in der Lunge. Daher kann zum aktuellen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass die exogene Behandlung mit dem jeweiligen Lipidmediatoren über zwei verschiedene Applikationsrouten zu unterschiedlich stark erhöhten Lipidmediatorspiegeln am Effektororgan führte. Zudem ist nicht bekannt, ob RvD1 endogen in höherer Konzentration vorliegt als RvE1.

Obgleich die erwarteten anti-inflammatorischen Effekte von RvE1 auf die zelluläre Entzündungsantwort ausblieben, führte eine Infektion mit den Influenzaviren (hier H1N1) bereits in der frühen Phase (4 Tage nach Infektion) zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in den bronchoalveolären Raum und das Lungengewebe im Vergleich zu scheininfizierten Tieren. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Tam et al., die die histologischen Verteilungsmuster von Immunzellen im Verlauf einer Influenzavirusinfektion der Lunge untersuchten (161).

Neben den klassischen pro-inflammatorischen Mediatoren bakterieller Lungeninfektionen wie IL-1 β , IL-6, TNF- α und IL-12p40, welche pathogenetisch auch im murinen Modell der Influenzaviruspneumonie eine Rolle spielen (163-165), wurden zusätzlich Mediatoren wie IFN- α oder IL-18 untersucht, welche direkte antivirale Wirkungen entfalten und vermehrt nach Infektion mit Influenzaviren exprimiert werden (165). Im Zusammenhang mit der anti-inflammatorischen Wirkung spezifischer

Lipidmediatoren auf die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen bei pulmonalen Virusinfektionen fanden Eickmeier et al. (166) signifikant niedrigere Spiegel von IL-1 β , IL-6, und TNF- α in einem Modell der akuten Lungenschädigung nach Behandlung mit RvD1.

Dagegen wurde in der aktuellen Untersuchung die virusinduzierte Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (IFN- γ , IL-1 β , IL-12p40, IL-6, TNF- α) in den bronchoalveolären Raum durch eine Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE nicht beeinflusst. Ferner kam es in Übereinstimmung mit der Literatur (165) nach Influenzavirusinfektion zu einer verstärkten Produktion der antiviralen Zytokine IFN- α und IL-18, die jedoch in allen infizierten Gruppen unabhängig von der Behandlung vergleichbare Level aufwies. Wir konnten insgesamt zeigen, dass eine Behandlung mit RvE1 und 18R-HEPE nicht zu einer vermehrten Produktion antiviraler Zytokine führt. Die in der Literatur beschriebenen antiviralen Eigenschaften spezialisierter Lipidmediatoren werden möglicherweise durch andere Mechanismen, wie zum Beispiel einen verminderten Export von Influenzavirus-RNA durch Protecic D1 (160), vermittelt.

Wang et al. (161) stellten unter RvD1-Behandlung vergleichbar hohe Spiegel an CXCL2 und MCP-1 nach Influenzavirusinfektion und anschließender Superinfektion mit *S. pneumoniae* fest. Im Modell der frühen Influenzapneumonie kam es ebenfalls zu vergleichbaren Spiegeln von Chemokinen wie MCP-1. Unter Berücksichtigung der fehlenden Reduktion der Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen, sowie gleichbleibend hohen Spiegeln pro-inflammatorischer Zytokine kann die von Wang et al. postulierte Hypothese allerdings nicht bestätigt werden. Demnach führten die unverändert hohen Spiegel an Chemokinen, bei gleichzeitig erniedrigten Spiegeln pro-inflammatorischer Zytokine und insgesamt erniedrigtem Einstrom von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, zu einer regional spezifischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Alveolarmakrophagen in proximal gelegene Kompartimente. Durch Aussparung der distalen Alveolen und durch die gezielten anti-inflammatorischen Effekte sei es daher zur schnelleren Erregerabwehr gekommen. Dies steht im Widerspruch zu verschiedenen Untersuchungen, die eine Reduktion der Transmigration von aktivierten neutrophilen Granulozyten als zentralen Mechanismus der anti-inflammatorischen Effekte von RvE1 beschreiben (112, 113). Zusätzlich ist eine Prüfung der Hypothese von Wang et al. in der vorliegenden Arbeit aufgrund der fehlenden zusätzlichen histologischen Untersuchungen in den murinen Infektionsmodellen und des unterschiedlichen Studiendesigns nicht möglich.

Auch im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie reduzierte eine Behandlung mit RvE1 die Freisetzung der untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine INF- γ , IL1- β , IL-12p40, MCP-1, TNF- α in den bronchoalveolären Raum nicht. Dies steht im Kontrast zu publizierten Studien pulmonaler muriner Inflammationsmodelle, welche eine verringerte Produktion von IL-1 β oder TNF- α in der akuten Phase der Infektion nach RvE1-Behandlung, oder Behandlung mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigten (113, 167). Darüber hinaus erhöhte die RvE1-Behandlung übereinstimmend zu Ergebnissen von Seki et al. (113) im aktuellen Modell der Pneumokokkenpneumonie auch nicht die Produktion des anti-inflammatorisch wirksamen Zytokins IL-10.

Zusammenfassend kam es hinsichtlich des therapeutischen Potentials von RvE1 oder 18R-HEPE, entgegen der in der Literatur beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkung von RvE1 (168-170), in der vorliegenden Arbeit in beiden Infektionsmodellen zu keinen Effekten auf die zelluläre und humorale Entzündungsreaktion der Lunge.

6.4.2 Systemische Entzündungsreaktion

Für pulmonale Infektionsmodelle liegen noch keine Untersuchungen des Effekts von RvE1 auf die systemische Entzündungsreaktion vor. Gerade im Rahmen einer progredienten Pneumokokkenpneumonie ist die Analyse von potentiellen Effekten der RvE1-Behandlung auf Zellen der systemischen Entzündungsantwort sinnvoll, da sich im Verlauf der Erkrankung Erreger in die Blutbahn und dann im weiteren Verlauf in weitere Organe ausbreiten (6, 11, 137, 171). Darüber hinaus ist bekannt, dass RvE1 die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten vermindert, die Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD18 an der Endotheloberfläche senkt sowie das Leukozyten-*rolling* in murinen Gefäßen vermindert (112), wodurch insgesamt die Zahl der neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten im Blut indirekt beeinflusst werden könnte. Dagegen ist es ebenso möglich, dass sich die RvE1-induzierte Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut in die Lunge mit anschließender lokaler Ausdifferenzierung zu Makrophagen (128) indirekt auch auf die Anzahl der im Blut verbleibenden Monozyten auswirkt. Nach der Infektion mit *S. pneumoniae* zeigte sich bei allen infizierten Tieren, wie in der Literatur für das Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie beschrieben (133, 140) eine signifikante Lymphozytopenie mit gleichzeitigem signifikantem Anstieg des Anteils der Granulozyten im Blut im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollgruppe. Entgegen der publizierten Effekte wurden in der aktuellen Arbeit allerdings keine Veränderungen in der Zellfraktion der Lymphozyten, Granulozyten oder Monozyten infolge der RvE1-Behandlung beobachtet.

Im Gegensatz zur akuten Pneumokokkenpneumonie mit Translokation der Bakterien ins Blut und deutlichen Veränderungen des Blutbildes im weiteren Verlauf der Erkrankung zeigte sich in der frühen Phase der pulmonalen Infektion mit H1N1 eine lokal auf die Lunge beschränkte milde Entzündungsreaktion. Der Anteil der neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten im Blut blieb unverändert im Vergleich zu den Blutwerten der nicht-infizierten Kontrolltiere. Analog zum Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie blieb die Anzahl neutrophiler Granulozyten und inflammatorischer Monozyten nach RvE1- oder 18R-HEPE-Behandlung unverändert.

Jedoch spielt auch das adaptive Immunsystem, insbesondere die T- und B-Lymphozyten, bei Influenzavirusinfektionen eine wichtige Rolle.

Zur genaueren Betrachtung erfolgte daher zusätzlich eine Differenzierung der Blutlymphozyten in T- und B-Zellen. Diese ergab, dass die Influenzavirusinfektion mit einer tendenziellen Reduktion im Anteil der B-Lymphozyten im Blut einherging, die Fraktion der T-Lymphozyten jedoch unverändert blieb. Die B-Zell Antwort im Zuge von Influenzaviruspneumonien ist hochkomplex. Neben den klassischen B-Zellen, welche spezifische neutralisierende Antikörper gegen bestimmte Antigene produzieren, gibt es auch B-Zellen, welche schon vor Antigenkontakt „natürliche“ Immunglobuline (vor allem IgM) produzieren und eine entscheidende Rolle im frühen Stadium von Influenzaviruspneumonien spielen (172). In Koinfektionsmodellen mit Influenzaviren und anschließender bakterieller Superinfektion mit *S. pneumoniae* kam es zur Depletion und Repression von B-Lymphozyten im Blut, was die Autoren unter anderem auf eine vermehrte Apoptose von B-Zellen in der Milz zurückführten (173, 174) In anderen Untersuchungen kam es zur Reduktion aktivierter B-Zellen und extrafollikulärer Plasmazellen (175).

Bislang existieren keine publizierten Daten zur Beeinflussung des adaptiven Immunsystems durch RvE1. Andere SPM wie zum Beispiel RvD1 inhibierten in *in-vitro* Studien unter Verwendung humaner Spenderblutzellen die Differenzierung CD4⁺-T-Zellen zu T_H1 und T_H17 Zellen und führten dadurch zu einer verminderten Produktion von IL-17 oder IFN- γ . Darüber hinaus förderte RvD1 die Bildung FoxP3-exprimierender regulatorischer T-Zellen aus naiven CD4⁺ T-Lymphozyten und hemmte die Ausschüttung zytotoxischer Moleküle wie TNF- α , IFN- γ sowie IL-2 durch Inhibition von CD8⁺ Effektor-T-Zellen (176). Trotzdem gibt es bislang keine publizierten *in-vivo* Studien in Zusammenhang mit dem möglichen positiven Einfluss von SPM auf das adaptive Immunsystem. Auch in der aktuellen Untersuchung blieb der Anteil der T- und B-Lymphozyten im Blut zwischen infizierten RvE1- und 18R-HEPE-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontroll-behandelten, infizierten Tieren unverändert.

Da sowohl im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie als auch im Mausmodell der pulmonalen Influenzavirusinfektion die Applikation des RvE1 bzw. 18R-HEPE systemisch erfolgte (s.c. bei *S.pn.* und i.v. bei H1N1), konnten zudem mögliche direkte Effekte der verabreichten SPM auf das zelluläre Blutbild durch die Analysen der Blutleukozyten erstmals weitestgehend ausgeschlossen werden.

6.4.3 Barrierestörung

Das klinische Bild einer klassischen Lobärpneumonie des Menschen, wie sie durch eine *S. pneumoniae* Infektion verursacht wird, ist unter anderem auch durch abgrenzbare Konsolidierungen in bildgebenden röntgenologischen Verfahren gekennzeichnet. Diese entstehen durch pulmonale Infiltrate, die auch durch Extravasation von Flüssigkeit und Ödembildung mit verursacht werden (6, 11, 14). Die Extravasation von Proteinen hat dabei einen zentralen mechanistischen Stellenwert in der Ödembildung und trägt zur Ausbildung eines akuten Lungenversagens bei. Im murinen Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie wurde daher auch der Einfluss von RvE1 auf die pulmonale endo-epitheliale Barriere untersucht. Obwohl die Infektion mit *S. pneumoniae* nachweislich eine erhöhte Permeabilität der endo-epithelialen Barriere im Mausmodell induzierte, beeinflusste eine RvE1-Behandlung die pulmonale Schrankenstörung nicht. Dabei unterschied sich der Quotient aus Serumalbumin in BALF und Blutplasma infizierter, RvE1-behandelter Tiere nicht von infizierten, Kontroll-behandelten Tieren. Auch Hecker et al. (77) untersuchten die Integrität der pulmonalen endo-epithelialen Barriere im murinen Modell des LPS-induzierten akuten Lungenversagens 48 h nach LPS Stimulation. Dabei kam es bei Tieren, welche mit einer n-3-PUFA-haltigen Lipidlösung behandelt wurden, allerdings zu einem geringeren Proteinübertritt aus dem Blut in das bronchoalveoläre Kompartiment. Auch Seki et al. (113) beobachteten im Modell der *E.coli*-assoziierten Pneumonie eine geringere Ödembildung in histologischen Analysen von Lungen RvE1-behandelter Mäuse. Eine mögliche Ursache für die fehlenden Effekte von RvE1 auf das Ausmaß der pulmonalen Schrankenstörung im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie stellt die besonders stark ausgeprägte Inflammationsreaktion in der Lunge dar, die eine Infektion mit *S. pneumoniae* hervorruft. Daher ist aktuell nicht auszuschließen, dass die Stimulation der RvE1-vermittelten resolutionsfördernden Signalwege allein nicht ausreicht, um einen biologisch relevanten Effekt auf die Integrität der Blut-Luft-Schranke der Lunge in der akuten Pneumokokkeninfektion zu bewirken.

In einem Großteil der bisher veröffentlichten Studien wurden zunächst die Resolvine appliziert und erst anschließend die entzündliche Reaktion durch Infektions- oder Inflammationsreize induziert (106, 125, 129, 130, 162). Dies spiegelt den klinischen Alltag jedoch nur unzureichend wider, in welchem Patienten mit bereits manifesten Symptomen einer Pneumonie in der Rettungsstelle vorstellig werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse daher erst nach erfolgter Infektion mit *S. pneumoniae* mit RvE1 behandelt. Dadurch wurde versucht, die klinische Praxis besser abzubilden und die Translation der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu erleichtern.

Auch im Kontext viraler Lungeninfektionen ist die Entwicklung neuer therapeutischer Agenzien, welche potente anti-inflammatorische und resolutionsfördernde Wirkungen auch nach stattgehabter Infektion entfalten als Alternative zu etablierten Wirkstoffen wie M2-Ionenkanal- oder Neuraminidase-Hemmern sinnvoll. Aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit und der schnellen metabolischen Inaktivierung ist der Einsatz von SPM allerdings perspektivisch allenfalls im Umfeld der intensivmedizinischen Versorgung vorstellbar (159).

Ähnlich zu bakteriellen Lungeninfektionen kann RvE1 möglicherweise sein volles therapeutisches Potential auch bei viralen Infektionen erst in der Resolutionsphase in Gänze entfalten. Wie im murinen Modell der frühen Influenzapneumonie in der vorliegenden Arbeit verwendeten Tam et al. (158) den Virusstamm H1N1/PR/8/34 in einer ähnlichen Infektionsdosis. Vergleichend hierzu wurden Mäuse aber auch mit dem weniger pathogenen Stämmen (wie z.B. H2N5/X31) infiziert. Während sich die Stadien der Entzündungsreaktion in mit H1N1/PR/8 infizierten Tieren überlagerten, trat bei H2N5/X31 infizierten Mäusen zunächst eine Inflammationsreaktion ein, welche anschließend in eine Resolutionsphase übergang. Interessanter Weise waren bei H1N1/PR/8-infizierten Tieren die EPA-Spiegel in der Resolutionsphase höher als im Laufe der akuten Entzündung, was eine stärkere Bedeutung von EPA-Derivaten in einem späteren Krankheitsstadium, unter resolutionsbegünstigenden Bedingungen oder bei Infektionen mit schwächer pathogenen Influenzastämmen nahelegt.

6.5 RvE1 hat keinen Einfluss auf die Resolution der Pneumokokkenpneumonie nach Antibiotikabehandlung

In der Literatur wird für die Gruppe der Resolvine nicht nur eine anti-inflammatorische Wirkung zur Terminierung inflammatorischer Prozesse beschrieben. Sie induzieren als resolutionsfördernde Lipidmediatoren ebenso die Beseitigung von Zelldetritus zur

Auflösung der Entzündungsreaktion und die Gewebsreparation. Hierbei setzt der Prozess der aktiv-kooordinierten Resolution früh nach Auslösung durch Ereignisse der akuten Entzündungsreaktion ein und beinhaltet die veränderte Produktion intrazellulärer, lokal wirkender Botenstoffe, die Induktion des programmierten Leukozytenzelltods durch Apoptose sowie die Opsonierung und Entfernung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und deren Abtransport über das Lymphgefäßsystem (73, 177-179).

So reduzierten RvD1 und RvD5 aufgrund ihrer resolutionsfördernden Effekte in einem sich selbst limitierenden murinen *E. coli*-Peritonitis-Modell die benötigte Antibiotikadosis und verbesserten die antimikrobiellen Abwehrmechanismen der Tiere (178). In weiteren *in-vivo* Maus-Studien konnten ebenfalls positive Auswirkungen von Lipidmediatoren auf den Verlauf von Gram-negativen Lungeninfektionen durch einen günstigen Einfluss auf resolutionsfördernde Prozesse nachgewiesen werden. So reduzierte RvD1 in murinen Pneumoniemodellen nach *E. coli* und *P. aeruginosa* Infektion die bakterielle Erregerlast durch eine verbesserte Phagozytoseaktivität nicht nur der pro-inflammatorisch sehr aktiven neutrophilen Granulozyten, sondern ebenso der Makrophagen als der in der Resolutionsphase vorherrschenden Zellpopulation (180, 181). Zudem verbesserte RvD1 ebenso die Beseitigung von pro-inflammatorisch aktiven neutrophilen Granulozyten in der Lunge bei gleichzeitiger Reduktion des Lungengewebschadens im Verlauf einer chronischen *P. aeruginosa* Infektion (180). Darüber hinaus verbesserte sich in RvE1-behandelten Tieren neben der Erregerelimination auch die Überlebensrate 3 Tage nach der Aspiration von *E.coli* (113).

Parallel zum murinen Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie stand in unserer Arbeitsgruppe auch ein etabliertes Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung zur Verfügung (133, 140), das nach erfolgreicher Erregerkontrolle infolge der durchgeführten Antibiose auch die Abbildung der Terminierung der Pneumokokken-induzierten Entzündungsreaktion und den Ablauf der Resolutionsprozesse erlaubt. Entgegen der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zu RvD1 hatte eine RvE1- oder 18R-HEPE-Behandlung in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Auswirkungen auf die Krankheitsintensität und deren Verlauf, weder mit noch ohne Antibiose. Analog zu den bereits diskutierten Ergebnissen der Untersuchungen im Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie zeigte sich auch unter Antibiotikatherapie eine vergleichbare Reduktion der Körpermasse bei RvE1- oder 18R-HEPE behandelten Tieren im Vergleich zur infizierten Kontrollgruppe.

Im Fokus des aktuell durchgeführten Experiments standen zudem die Untersuchung der Effekte von RvE1 auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie die Liberation von Entzündungsmediatoren in den bronchoalveolären Raum der Mauslunge als Zeichen für die Terminierung und Auflösung der Entzündungsreaktion im Rahmen der Resolution. Besteht in der akuten Entzündungsphase eine verminderte Rekrutierung sowie eine limitierte Transmigration von neutrophilen Granulozyten durch RvE1, so wird die Anzahl von aktivierten neutrophilen Granulozyten in der späten Resolutionsphase durch andere Mechanismen reduziert. Hierbei spielt die Induktion der Apoptose in Phagozytose-aktiven neutrophilen Granulozyten und ihre Beseitigung durch rekrutierte Monozyten eine essentielle Rolle (119). Im Verlauf der Resolution erhöht sich nicht nur die Zahl der ansässigen Alveolarmakrophagen. Die Anwesenheit resolutionsfördernder Mediatoren begünstigt auch eine funktionelle Veränderung der Makrophagen zum resolutionsfördernden (*pro-resolving*) CD11^{low} Phänotyp. Dieser Phänotyp ist zum einen wichtig für die Beseitigung neutrophiler Granulozyten. Zum anderen verhält er sich indifferent gegenüber mikrobiellen TLR-Liganden, wodurch keine pro-inflammatorischen Mediatoren mehr ausgeschüttet werden (123, 156, 181, 182). Neben der erhöhten Phagozytose durch Makrophagen kommt es auch in neutrophilen Granulozyten selbst zur Induktion veränderter Signalkaskaden. So beschreiben Ariel et al. den bemerkenswerten Befund, dass RvE1 die Expression des Chemokinrezeptors CCR5 (C-C-Motiv-Chemokinrezeptor 5) auf der Zelloberfläche von apoptotischen neutrophilen Granulozyten erhöht und so durch Bindung der Liganden CCL3 (MIP-1 α) und CCL5 (RANTES) ein weiteres pro-inflammatorisches Chemokinsignal unterbindet (109). CCR5-nachgeschaltete Signalwege sind für die Produktion mehrerer pro-inflammatorischer Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β und MIP-2 verantwortlich (183). Das Abfangen pro-inflammatorischer Stimuli durch eine erhöhte Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche von apoptotischen neutrophilen Granulozyten führt zu einem starken Rückgang frei verfügbarer pro-inflammatorischer Chemokine. In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Chemokine größtenteils durch proteolytischen Abbau inaktiviert werden (184). Der CCR5-Abfangmechanismus stellt daher einen neuen Mechanismus für die Terminierung der pro-inflammatorischen Zytokin-Signaltransduktion dar. Die Beobachtung, dass RvE1 die Expression von CCR5 selektiv nur auf späten apoptotischen Zellen hochreguliert, d. h. auf Zellen, die hauptsächlich in der Auflösungsphase der Entzündung auftreten, unterstreicht die spezifische Bedeutung dieses Mediators für die Entzündungsauflösung (109).

Überträgt man die oben genannten publizierten Ergebnisse auf die vorliegende Untersuchung im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung, so ergibt sich die Hypothese, dass die Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE die Anzahl der in den bronchoalveolären Raum rekrutierten

neutrophilen Granulozyten reduziert, die der Makrophagen erhöht und die Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine senkt. Entgegen dieser Erwartung unterschied sich die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der BALF von RvE1- und 18R-HEPE-behandelten Tieren jedoch nicht von Kontroll-behandelten Gruppen. Auch war die Zahl der Alveolarmakrophagen und rekrutierten inflammatorischen Monozyten im bronchoalveolären Raum der RvE1- und 18R-HEPE-behandelten Tiere nach Infektion mit *S. pneumoniae* und Antibiose mit der von infizierten, Ampicillin-behandelten Kontrolltieren vergleichbar. Somit beeinflusste RvE1 auch im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung keine der untersuchten Leukozytensubpopulationen.

Entgegen den in der Literatur beschriebenen resolutionsfördernden Effekten von RvE1 und RvD1 auf die Produktion von Entzündungsmediatoren bei Lungenerkrankungen (69, 113, 116, 119, 166, 181) reduzierte eine Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE die Konzentrationen der pro-inflammatorischer Zytokine TNF- α , INF- γ , IL1- β , IL-12p40, MCP-1 und IL-6 in der BALF infizierter und mit Ampicillin behandelte Tiere im Vergleich zu infizierten und Kontroll-behandelten Tieren unter Antibiose nicht.

Darüber hinaus wurde ebenfalls der Effekt von RvE1 auf das Ausmaß der pulmonalen endo-epithelialen Schrankenstörung in der späten Phase der Pneumokokkenpneumonie nach Antibiotikabehandlung untersucht. Erwartungsgemäß ging die anti-infektive Therapie im Vergleich zum Modell der akuten Pneumokokkenpneumonie ohne Antibiose mit einem niedrigeren Serumalbumin-Quotienten und daher mit einer weniger stark ausgeprägten endo-epithelialen Schrankenstörung einher. Im Gegensatz zur Studie von Seki et al. (113), in der die histologische Analyse von Mauslungen nach *E.coli*-Aspirationspneumonie eine Verminderung der Ödembildung durch eine präventive RvE1 Behandlung nachweisen konnte, bewirkte die Behandlung von infizierten Tieren mit RvE1 oder 18R-HEPE nach Antibiotikaapplikation in der aktuellen Arbeit jedoch keine Verbesserung der Integrität der endo-epithelialen Lungenbarriere. Dabei ist die Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse zum aktuellen Zeitpunkt schwer zu evaluieren, da neben möglichen direkten Effekten persistierender Erreger auf das Lungenepi- und -endothel, auch andere Ursachen, wie zum Beispiel eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und pro-inflammatorischen Zytokinen, Störungen der Na⁺/K⁺-ATPase und mitochondriale Dysfunktionen, zur Schädigung der alveolo-epithelialen Barriere beitragen (185), auf die die RvE1-Behandlung möglicherweise keinen Einfluss hat.

Wie bei den Untersuchungen im Mausmodell der akuten Pneumokokkenpneumonie stand auch im Modell der Pneumokokkenpneumonie mit Antibiotikabehandlung die

Übertragbarkeit der aus dem Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den klinischen Alltag im Vordergrund der Überlegungen. So hatte die anti-infektive Therapie nicht nur das Ziel, ein erregerarmes Milieu zu schaffen, um mögliche Effekte einer Behandlung mit RvE1 oder 18R-HEPE auf die Phase der Resolution der Entzündung in diesem Modell abzubilden. Darüber hinaus sollte zusätzlich das Potential von RvE1 als adjuvante Maßnahme zur Antibiotikatherapie der Pneumokokkenpneumonie evaluiert werden. Es hatte aber weder die systemische Behandlung mit RvE1 noch lokales RvE1 nach 18R-HEPE-Applikation einen Einfluss auf den Entzündungsprozess im Verlauf der Antibiotikatherapie. Die Behandlung hatte weder Auswirkungen auf die klinischen Parameter, die lokale oder systemische Entzündungsantwort, noch führte sie zu einer reduzierten pulmonalen Schrankenstörung.

6.6 Limitationen der murinen Infektionsmodelle und der Studie

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie sind bis dato die ersten *in-vivo* Versuche, welche die Effekte von exogenem zugeführtem RvE1 in zwei klinisch relevanten Pneumoniemodellen nach Infektion mit einem Gram-positiven Erreger wie *S. pneumoniae* untersuchen. Auch zur Auswirkung von RvE1 auf eine Infektion mit *Influenza-A-Viren* existierten bislang keine Daten.

Sowohl für die humanen *ex-vivo* Stimulationsmodelle als auch die murinen *in-vivo* Infektionsmodelle mit verschieden ausgeprägter Entzündung wurde auf bereits etablierte und validierte Versuchsmodelle zurückgegriffen. Entsprechend zeigten die Tiermodelle die zu erwartenden pathologischen Effekte infolge der Infektionen bzw. Stimulationen (133, 137-140, 186). Darüber hinaus konnten jedoch in der aktuellen Arbeit keine Effekte der RvE1 Behandlung, weder direkt durch Applikation von RvE1 noch indirekt durch Verabreichung der Vorläuferfettsäure 18R-HEPE, auf die akute Entzündungsreaktion nach Infektion der Lunge mit *S. pneumoniae* oder Influenzavirus A/H1N1/PR/8/34 und die Resolution der Inflammation in der Pneumokokkenpneumonie nachgewiesen werden. Es zeigten sich auch keine Effekte auf die Erregerelimination oder den klinischen Verlauf der Lungeninfektionen.

Sowohl das verwendete RvE1 als auch das 18R-HEPE wurden kommerziell als Reinsubstanz synthetisch hergestellt bezogen (Hersteller: Cayman Chemicals; RvE1: Cay10007848-50 und Cay10007848-50-200 bezogen über BIOMOL GmbH; 18R-HEPE: CAY-32840-250 bezogen über BIOMOL GmbH). Einsatz und Lagerung beider Produkte in unserer Einrichtung erfolgten streng nach Herstellerangaben. Etablierte *in-vitro* Tests der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Konstantin

Mayer, Justus-Liebig-Universität Gießen, belegten zudem, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete RvE1 und 18R-HEPE eine vergleichbare biologische Aktivität wie das von der Arbeitsgruppe Mayer erfolgreich in *in-vitro* und *in-vivo* Untersuchungen (167, 187, 188) eingesetzte RvE1 und 18R-HEPE aufwiesen. So wurde nachgewiesen, dass das von uns verwendete RvE1 und 18R-HEPE in TNF- α -stimulierten humanen Blutleukozyten (PBMC = *peripheral blood mononuclear cells*) die Freisetzung von IL-8 deutlich reduzierte und die mitochondriale Atmung verbesserte (unpublizierte Daten, n=1). Des Weiteren zeigen die immunhistologischen Analysen, dass die Zielrezeptoren BLT-1 und ChemR23, mit welchen RvE1 selektiv interagiert (84, 170), sowohl in humanen Lungengewebeproben (siehe Abb. 11) als auch in murinem Lungengewebe (P. M. Krause et al., bisher unpubliziert, persönliche Mitteilung) vorhanden sind. Zudem belegen Untersuchungen von Philipp Krause im Rahmen seiner Dissertationsarbeit in unserer Arbeitsgruppe, dass beide Rezeptoren auch im Verlauf der murinen Pneumokokkeninfektion reguliert werden (noch unpubliziert).

Ungeklärt ist bisher jedoch, ob genügend 18R-HEPE bzw. RvE1 appliziert wurde, um eine ausreichend hohe Konzentration an RvE1 im Lungengewebe zu erhalten und inwieweit unterschiedliche Applikationsrouten die Gewebekonzentrationen von RvE1 im Zielorgan beeinflussen. Weiterführende Untersuchungen zur Pharmakokinetik der Lipidmediatoren könnten hier zielführend sein, auch wenn diese technisch anspruchsvoll und kostenintensiv sind. In verschiedenen Tiermodellen muriner Lungenerkrankungen wurde RvE1 bisher auf unterschiedlichen Wegen verabreicht. Neben der intravenösen Applikation über die Schwanzvene (113, 130), wurde RvE1 auch intraperitoneal appliziert (117, 119). Trotz der unterschiedlichen Applikationsrouten wirkte sich eine RvE1-Behandlung in diesen publizierten Studien jedoch positiv auf die jeweils untersuchten Versuchsmodelle aus. In der vorliegenden Arbeit wurde RvE1 dagegen zunächst subkutan injiziert, blieb jedoch ohne Effekte gegenüber kontrollbehandelten infizierten Tieren. Da nicht bekannt ist, welcher Anteil des subkutan verabreichten RvE1 am Applikationsort bzw. nach Resorption in die Blutbahn bereits abgebaut wird und wieviel aktives RvE1 die Lunge als Zielorgan letztendlich erreicht, wurde in der nachfolgenden Untersuchung in der frühen Influenzavirusinfektion die Administrationsroute geändert. Die RvE1-Applikation erfolgte intravenös direkt in die Blutbahn, um die Wahrscheinlichkeit von vorzeitigen Abbauprozessen zu reduzieren und das RvE1 schneller und effektiver zum Zielorgan Lunge zu bringen. Durch die Einführung einer 18R-HEPE-Versuchsgruppe wurde darüber hinaus versucht, eine höhere Zielkonzentration von bioaktiv wirksamem RvE1 am Ort der Entzündung zu erreichen, da eine Umwandlung des Vorläufermoleküls 18R-HEPE zu RvE1 vor allem durch die 5-Lipoxygenase (5-LOX) aktiver neutrophiler

Granulozyten und damit direkt am Ort des Entzündungsgeschehens erfolgt (69, 85, 86). Allerdings zeigten in der aktuellen Arbeit weder die subkutane noch die intravenöse Applikation von RvE1 oder die Behandlung mit 18R-HEPE einen positiven Effekt auf die entzündlichen Prozesse in den verschiedenen Infektionsmodellen.

Allgemein gelten resolutionsfördernde Lipidmediatoren als sich schnell bildende, aber auch schnell inaktivierte Autakoide mit starken autokrinen und parakrinen Effekten (83). Die chemischen Abbaureaktionen von RvE1 im Lungengewebe wurden bereits in anderen Arbeiten untersucht. Dabei stellten sich 18-oxo-RvE1 und 20-hydroxy-RvE1 als vermutlich inaktive Abbauprodukte heraus (91, 92). Unklar bleibt jedoch bisher, welches Abbauprodukt bevorzugt im Lungengewebe gebildet wird. Zudem existieren derzeit keine Erkenntnisse über die Abbaukinetik der flüchtigen resolutionsfördernden Lipidmediatoren. Belegt wurde bislang nur, dass das Ausmaß der RvE1-Metabolisierung durch neutrophile Granulozyten in murinen Inflammationsmodellen mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion korreliert (91). Weiterführende Untersuchungen zur Pharmakokinetik der RvE1 Behandlung werden zu genaueren Kenntnissen hinsichtlich optimaler Applikationsroute, Resorption, Verteilung und Metabolisierung führen und Rückschlüsse über die optimale Applikationsart und das nötige Applikationsintervall von RvE1 erlauben. Daher ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen, dass das in der vorliegenden Arbeit angewandte Applikationsintervall und die RvE1-Konzentration nicht ausreichend waren. Allerdings erhielten die Tiere in der vorliegenden Arbeit vergleichbare Konzentrationen an RvE1 (1 µg/Maus) bzw. 18R-HEPE (2 µg/Maus) wie in bereits publizierten Arbeiten (117, 119, 122, 130, 158, 161, 180). Das Applikationsintervall war darüber hinaus jedoch gegenüber früheren Studien (113, 119, 158, 161) bereits verkürzt. Eine weitere Erhöhung der verabreichten RvE1-Menge bzw. Verkürzung des Behandlungsintervalls ist daher nur begrenzt möglich, da toxische Effekte durch das notwendige lipophile Lösungsmittel (hier Ethanol) zu vermeiden sind. Eine Lösung von RvE1 oder 18R-HEPE in hydrophilen Substanzen ist aufgrund der Lipophilität (XLogP3-AA=2,4 (189) (195)) nicht möglich (190).

6.7 Ausblick

Überschießende Inflammationsprozesse können zu einer Lungengewebsschädigung führen und somit die Pathophysiologie einer Pneumonie entscheidend beeinflussen. Prognostisch spielt neben der Pathogenität des ursächlichen Erregers, daher auch der Ausprägungsgrad der pulmonalen Inflammationsreaktion eine wichtige Rolle (49).

Speziell während Infektionen mit dem pandemischen Influenzavirus A/H1N1 kommt es als Ausdruck der Überreaktion des Immunsystems zu Zytokinstürmen mit konsekutivem Multiorganversagen und potentiell tödlichen Folgen (62, 63). Daher bleibt der Bedarf zur Identifizierung alternativer Wirkstoffe für eine adjunktive Therapie der schweren Pneumonie und Sepsis des Menschen weiter bestehen.

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert eine Vielzahl an Übersichtsarbeiten, welche sich mit den Eigenschaften von SPM beschäftigen (67, 68, 71, 74, 83, 168, 177). Außer den bereits beschriebenen Wirkungsmechanismen von RvE1 sind seit 2015 allerdings keine neuen Originalpublikationen zur *in-vivo* Anwendung von RvE1 bei pulmonalen Erkrankungen erschienen. Bereits 2008 wurde die Rolle von RvE1 (RX-10001) und RvE1-Analoga (RX-10045) der Firma Resolvyx Pharmaceuticals in klinischen Studien untersucht. Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es jedoch erst eine klinische Studie der Phase II, welche sich mit der Anwendung eines RvE1-Analogons bei Konjunktivitis beschäftigt (191). Andere klinische Studien wurden während der Phase I eingestellt oder in Bezug auf pulmonale Erkrankungen gar nicht erst initiiert. Auch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit scheint die biologische Wirksamkeit von RvE1 in Modellen molekular hochkomplexer Lungeninfektionen begrenzt. Die strukturelle Instabilität von Lipidmediatoren, ihre schnelle Inaktivierung im Entzündungsmilieu und der komplizierte Nachweis von Substanzen, welche im nanomolaren Bereich nachweisbar sein müssen, erschweren die Untersuchung resolutionsfördernder Lipidmediatoren im tierexperimentellen Kontext. Trotz extensiver Untersuchung in verschiedenen Modellen pulmonaler Entzündungsreaktionen konnte keiner der in der Literatur beschriebenen Effekte von RvE1 in den Modellen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Einen interessanten Ansatzpunkt stellt möglicherweise die Entwicklung und Verwendung stabiler Analoga von RvE1 dar. Um einen vorzeitigen Abbau durch ω -Oxidation und die Inaktivierung durch Eicosanoid-Oxireduktasen (EOR) zu verhindern, entwarfen Arita et al. ein stabiles RvE1-Analogon (19-(p-fluorphenoxy)-RvE1-methylester), welches vergleichbare anti-inflammatorische Eigenschaften wie RvE1 in murinen Inflammationsmodellen zeigte (92). Allerdings verhält sich das RvE1-Analogon durch die Veresterung noch lipophiler als RvE1. Dies könnte sich negativ auf die biologische Verfügbarkeit in der Lunge auswirken. In Bezug auf andere Lipidmediatoren ist die Entwicklung stabiler Analoga weiter vorangeschritten. Auch RvD1 unterliegt einer Dehydrierung über EOR am ^{17}C -Kohlenstoffatom zu inaktivem 17-oxo-RvD1. Durch Aspirin entstandenes RvD1, AT-RvD1, widersetzt sich einem schnellen Abbau über EOR und wurde in murinen pulmonalen Infektionsmodellen bereits erfolgreich erprobt (161, 168, 192). Neben AT-RvD1 steht mit BDA-RvD1

(*benzo-diacetylenic-17R-RvD1-methyl ester*) ein weiteres stabiles RvD1-Analogon zur Verfügung, welches zum einen den ischämisch-reperfusionisch-bedingten Lungenschaden im murinen Modell erfolgreich reduzierte und im Gegensatz zu RvD1 und AT-RvD1 in weniger Reaktionsschritten synthetisiert werden konnte (193). Eine Entwicklung weiterer stabiler Analoga von RvE1 könnte den Anwendungsbereich von RvE1 in pulmonalen Inflammationsmodellen, vor allem in Infektionsmodellen mit stark ausgeprägter Entzündungsreaktion wie bei einer *S. pneumoniae* Infektion, somit erweitern. Schließlich erscheint es erfolgversprechend den Effekt strukturverwandter SPM, wie zum Beispiel dem aus DHA gebildeten RvD1, und Kombinationen verschiedener potentiell wirksamer SPM auf den Verlauf der entzündlichen Prozesse einer Pneumokokkenpneumonie oder Influenzavirusinfektion zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

1. Pletz MW, Ewig S, Lange C, Welte T, Höffken G. [Update pneumonia 2012]. Dtsch Med Wochenschr. 2012;137(44):2265-80; quiz 81-4.
2. WHO. Top 10 causes of death 2018 [Available from: https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/].
3. Welte T, Köhnlein T. Global and Local Epidemiology of Community-Acquired Pneumonia: The Experience of the CAPNETZ Network. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2009;30(02):127-35.
4. Schnoor M, Hedicke J, Dalhoff K, Raspe H, Schäfer T. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. J Infect. 2007;55(3):233-9.
5. WHO. Pneumonia. 2019, 2 August.
6. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. The Lancet. 2009;374(9700):1543-56.
7. Feldman C, Anderson R. The Role of Streptococcus pneumoniae in Community-Acquired Pneumonia. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2020;41(04):455-69.
8. Torres A, Peetermans WE, Viegi G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: A literature review. Thorax. 2013;68(11):1057-65.
9. Ewig S, Höffken G, Kern W, Rohde G, Flick H, Krause R, Ott S, Bauer T, Dalhoff K, Gattermann S, Kolditz M, Krüger S, Lorenz J, Pletz M, De Roux A, Schaaf B, Schaberg T, Schütte H, Welte T. Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016. Pneumologie. 2016;70(03):151-200.
10. Torres A, Blasi F, Peetermans WE, Viegi G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2014;33(7):1065-79.
11. Suttorp N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Harrison TR, Charité - Universitätsmedizin B. Harrisons Innere Medizin.Reg: Pneumonie. 19. Auflage ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2016 2016.
12. Bauer TT, Ewig S, Rodloff AC, Muller EE. Acute Respiratory Distress Syndrome and Pneumonia: A Comprehensive Review of Clinical Data. Clinical Infectious Diseases. 2006;43(6):748-56.
13. Welte T, Torres A, Nathwani D. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe. Thorax. 2012;67(1):71-9.
14. Musher DM, Thorner AR. Community-Acquired Pneumonia. New England Journal of Medicine. 2014;371(17):1619-28.
15. Pletz MW. [Pneumococcal vaccine: protection of adults and reduction of antibiotic resistance by vaccination of children with a conjugated vaccine]. Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten. 2011;34(6):201-5.
16. RKI. Empfehlungen der STIKO.
17. RKI. Epidemiologisches Bulletin. 2018.
18. Pilishvili T, Bennett NM. Pneumococcal Disease Prevention Among Adults: Strategies for the Use of Pneumococcal Vaccines. American Journal of Preventive Medicine. 2015;49(6):S383-S90.
19. Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR. Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine. The Journal of Infectious Diseases. 2009;201(1):32-41.
20. RKI. Impfungen A - Z - Saisonale Influenzaimpfung: Häufig gestellte Fragen und Antworten.
21. Modrow S. Molekulare Virologie. 3. Aufl. ed. Heidelberg: Spektrum, AkadVerl; 2010 2010.

22. Anne M. Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *The New England Journal of Medicine*. 2005;11.
23. WHO. Influenza (Seasonal). 2018.
24. Lynch JP, Zhanel GG. Streptococcus pneumoniae: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2010;1-.
25. Ewig S, Birkner N, Strauss R, Schaefer E, Pauletzki J, Bischoff H, Schraeder P, Welte T, Hoeffken G. New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax*. 2009;64(12):1062-9.
26. Metersky ML, Waterer G, Nsa W, Bratzler DW. Predictors of In-Hospital vs Postdischarge Mortality in Pneumonia. *Chest*. 2012;142(2):476-81.
27. Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(4):288-301.
28. Weiser JN. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *Journal of Molecular Medicine*. 2010;88(2):97-102.
29. Bogaert D, De Groot R, Hermans PWM. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease. Elsevier; 2004. p. 144-54.
30. Athlin S, Kaltoft M, Slotved H-C, Herrmann B, Holmberg H, Konradsen HB, Strálin K. Association between Serotype-Specific Antibody Response and Serotype Characteristics in Patients with Pneumococcal Pneumonia, with Special Reference to Degree of Encapsulation and Invasive Potential. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2014;21(11):1541-9.
31. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, Vandepol S. Mutation Rates of RNA Viruses Rapid Evolution of RNA Genomes. 1982.
32. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid Evolution of RNA Viruses. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41(1):409-31.
33. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses: American Society for Microbiology (ASM); 1992 1992/03//.
34. Compans RW, Oldstone MBA. Influenza Pathogenesis and Control - Volume I: Springer International Publishing; 2014 2014.
35. Belser JA, Maines TR, Tumpey TM, Katz JM. Influenza A virus transmission: contributing factors and clinical implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2010;12.
36. Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(3):196-205.
37. Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, Nolting J, Swayne DE, Runstadler JA, Happ GM, Senne DA, Wang R, Slemons RD, Holmes EC, Taubenberger JK. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS pathogens*. 2008;4(5):e1000076-e.
38. Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008;26 Suppl 4(Suppl 4):D49-53.
39. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*. 2012;337(6091):199-204.
40. Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens. *European Respiratory Society*; 2004. p. 327-33.
41. Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunological reviews*. 2000;173:27-38.
42. Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttrop N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia - Molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *BioMed Central*; 2006. p. 97-.
43. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunological reviews*. 2000;173:39-51.

44. Welsch U, Deller T, Kummer W. Lehrbuch Histologie: mit 49 Tabellen / Welsch. Unter Mitarb. von Thomas Deller und Wolfgang Kummer. 4. Aufl. ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2014 2014. x+699 p.
45. Andreeva AV, Kutuzov MA, Voyno-Yasenetskaya TA. Regulation of surfactant secretion in alveolar type II cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2007;293(2):L259-L71.
46. Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory research*. 2001;2(1):33-46.
47. Leiva-Juárez MM, Kolls JK, Evans SE. Lung epithelial cells: therapeutically inducible effectors of antimicrobial defense. *Mucosal Immunology*. 2018;11(1):21-34.
48. Ward HE, Nicholas TE. Alveolar type I and type II cells. *Aust N Z J Med*. 1984;14(5 Suppl 3):731-4.
49. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *The New England journal of medicine*. 2008;358(7):716-27.
50. Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *The European respiratory journal Supplement*. 2003;42(42 suppl):10s-4s.
51. Chaplin DD. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S3-S23.
52. Murphy K, Weaver C. Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. In: Murphy K, Weaver C, editors. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 377-440.
53. Murphy K, Weaver C. Die angeborene Immunität. In: Murphy K, Weaver C, editors. *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018. p. 47-93.
54. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2014;1843(11):2563-82.
55. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(6):699-705.
56. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*. 2018;281(1):8-27.
57. Van Snick J. Interleukin-6: an overview. *Annual review of immunology*. 1990;8(1):253-78.
58. Shahangian A, Chow EK, Tian X, Kang JR, Ghaffari A, Liu SY, Belperio JA, Cheng G, Deng JC. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2009;119(7):1910-20.
59. García-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5775):879-82.
60. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, Function and Inhibition of Chemokines *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2002;42(1):469-99.
61. Wienhold S-M. Untersuchung einer potenziell immunmodulatorischen Wirkung von Moxifloxacin in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie. Berlin: Mensch-und-Buch-Verl; 2015 2015. 120 p.
62. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJD, Chau TNB, Hoang DM, Chau NVV, Khanh TH, Dong VC, Qui PT, Cam BV, Ha DQ, Guan Y, Peiris JSM, Chinh NT, Hien TT, Farrar J. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nature Medicine*. 2006;12(10):1203-7.
63. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*. 2009;459(7249):931-9.
64. Liu Q, Zhou Y-h, Yang Z-q. The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016;13(1):3-10.
65. Meijvis SCA, Garde EMWvd, Rijkers GT, Bos WJW. Treatment with anti-inflammatory drugs in community-acquired pneumonia. *Journal of Internal Medicine*. 2012;272(1):25-35.
66. Wunderink RG, Mandell L. Adjunctive Therapy in Community-Acquired Pneumonia. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2012;33(3):311-8.

67. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 2014;510(7503):92-101.
68. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Seminars in Immunology*. 2015;27(3):200-15.
69. Serhan CN, Hong S, Gronert K, Colgan SP, Devchand PR, Mirick G, Moussignac R-L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(8):1025-37.
70. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633-52.
71. Qu Q, Xuan W, Fan GH. Roles of resolvins in the resolution of acute inflammation. 2015. p. 3-22.
72. Maderna P, Godson C. Lipoxins: revolutionary road. *British journal of pharmacology*. 2009;158(4):947-59.
73. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: The beginning programs the end. *Nature Publishing Group*; 2005. p. 1191-7.
74. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61.
75. Hecker M, Ott J, Sondermann C, Schaefer MB, Obert M, Hecker A, Morty RE, Vadasz I, Herold S, Rosengarten B, Witzenrath M, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by fish-oil containing lipid emulsions in murine acute respiratory distress syndrome. *Critical Care*. 2014;18(2):R85-R.
76. Mayer K, Kiessling A, Ott J, Schaefer MB, Hecker M, Henneke I, Schulz R, Günther A, Wang J, Wu L, Roth J, Seeger W, Kang JX. Acute Lung Injury Is Reduced in *fat-1* Mice Endogenously Synthesizing n-3 Fatty Acids. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2009;179(6):474-83.
77. Mayer K, Seeger W. Fish oil in critical illness. 2008. p. 121-7.
78. Schaefer MB, Ott J, Mohr A, Bi MH, Grosz A, Weissmann N, Ishii S, Grimminger F, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by n-3- versus n-6-rich lipid emulsions in murine acute lung injury--role of platelet-activating factor receptor. *Critical care medicine*. 2007;35(2):544-54.
79. Basil MC, Levy BD. Acute inflammation is a vital response to infection that is initiated within seconds of pathogen detection. *Nature Publishing Group*. 2015;16.
80. Haworth O, Levy BD. Endogenous lipid mediators in the resolution of airway inflammation. *The European respiratory journal*. 2007;30(5):980-92.
81. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:279-312.
82. Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(8):1197-204.
83. Uddin M, Levy BD. Resolvins: natural agonists for resolution of pulmonary inflammation. *Progress in lipid research*. 2011;50(1):75-88.
84. Arita CNS, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Serhan CN. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. *J Immunol References The Journal of Immunology*. 2005;174:4345-55.
85. Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(5):713-22.
86. Arita M, Yoshida M, Hong S, Tjonahen E, Glickman JN, Petasis NA, Blumberg RS, Serhan CN. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(21):7671-6.

87. Fukunaga K, Kohli P, Bonnans C, Fredenburgh LE, Levy BD. Cyclooxygenase 2 Plays a Pivotal Role in the Resolution of Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*. 2005;174(8):5033-9.
88. Stables MJ, Gilroy DW. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*. 2011;50(1):35-51.
89. Werz O, Bürkert EVA, Fischer L, Szellas D, Dishart D, Samuelsson B, RÅDmark O, Steinhilber D. Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes. *The FASEB Journal*. 2002;16(11):1441-3.
90. Schwab JM, Chiang N, Arita M, Serhan CN. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature*. 2007;447(7146):869-74.
91. Hong S, Porter TF, Lu Y, Oh SF, Pillai PS, Serhan CN. Resolvin E1 Metabolome in Local Inactivation during Inflammation-Resolution. *The Journal of Immunology*. 2008;180(5):3512-9.
92. Arita M, Oh SF, Chonan T, Hong S, Elangovan S, Sun YP, Uddin J, Petasis NA, Serhan CN. Metabolic inactivation of resolvin E1 and stabilization of its anti-inflammatory actions. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(32):22847-54.
93. Bondue B, De Henau O, Luangsay S, Devosse T, de Nadaï P, Springael J-Y, Parmentier M, Vosters O. The chemerin/ChemR23 system does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo. *PLoS one*. 2012;7(6):e40043-e.
94. Wittamer V, Franssen J-D, Vulcano M, Mirjolet J-F, Le Poul E, Migeotte I, Brézillon S, Tyldesley R, Blanpain C, Detheux M, Mantovani A, Sozzani S, Vassart G, Parmentier M, Communi D. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(7):977-85.
95. Chiang N, Serhan CN, Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B 4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation 1. *J Immunol References The Journal of Immunology*. 2007;178:3912-7.
96. Goldman DW, Goetzl EJ. Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B4. Identification of a subset of high affinity receptors that transduce the chemotactic response. *Journal of Experimental Medicine*. 1984;159(4):1027-41.
97. Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 1987;237(4819):1171-6.
98. Tager AM, Bromley SK, Medoff BD, Islam SA, Bercury SD, Friedrich EB, Carafone AD, Gerszten RE, Luster AD. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nature Immunology*. 2003;4(10):982-90.
99. Yokomizo T, Izumi T, Chang K, Takawa Y, Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature*. 1997;387(6633):620-4.
100. Arita M, Ohira T, Sun Y-P, Elangovan S, Chiang N, Serhan CN. Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2007;178(6):3912-7.
101. Wan M, Godson C, Guiry PJ, Agerberth B, Haeggström JZ. Leukotriene B 4 /antimicrobial peptide LL-37 proinflammatory circuits are mediated by BLT1 and FPR2/ALX and are counterregulated by lipoxin A 4 and resolvin E1. *The FASEB Journal*. 2011;25(5):1697-705.
102. Grigg JM, Silverman M, Savill JS, Sarraf C, Haslett C. Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *The Lancet*. 1991;338(8769):720-2.
103. Nathan C, Ding A. Nonresolving Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.
104. Fialkow L, Wang Y, Downey GP. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):153-64.
105. Haslett C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation: American Thoracic Society New York, NY; 1999 1999/11//. S5–S11 p.

106. Seki H, Tani Y, Arita M. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1. Elsevier; 2009. p. 126-30.
107. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *The Lancet*. 1999;354(9177):447-55.
108. Gronert K, Kantarci A, Levy BD, Clish CB, Odparlik S, Hasturk H, Badwey JA, Colgan SP, Van Dyke TE, Serhan CN. A molecular defect in intracellular lipid signaling in human neutrophils in localized aggressive periodontal tissue damage. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(3):1856-61.
109. Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, Serhan CN. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature Immunology*. 2006;7(11):1209-16.
110. Ohira T, Arita M, Omori K, Recchiuti A, Van Dyke TE, Serhan CN. Resolvin E1 receptor activation signals phosphorylation and phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(5):3451-61.
111. Campbell EL, Louis NA, Tomassetti SE, Canny GO, Arita M, Serhan CN, Colgan SP. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. *The FASEB Journal*. 2007;21(12):3162-70.
112. Dona M, Fredman G, Schwab JM, Chiang N, Arita M, Goodarzi A, Cheng G, Von Andrian UH, Serhan CN. Resolvin E1, an EPA-derived mediator in whole blood, selectively counterregulates leukocytes and platelets. *Blood*. 2008;112(3):848-55.
113. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, Miyasho T, Takamiya R, Asano K, Ishizaka A, Takeda J, Levy BD. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;184(2):836-43.
114. Haas-Stapleton EJ, Lu Y, Hong S, Arita M, Favoreto S, Nigam S, Serhan CN, Agabian N. *Candida albicans* Modulates Host Defense by Biosynthesizing the Pro-Resolving Mediator Resolvin E1. *PLoS ONE*. 2007;2(12):e1316-e.
115. Ishida T, Yoshida M, Arita M, Nishitani Y, Nishiumi S, Masuda A, Mizuno S, Takagawa T, Morita Y, Kutsumi H, Inokuchi H, Serhan CN, Blumberg RS, Azuma T. Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2010;16(1):87-95.
116. Campbell EL, MacManus CF, Kominsky DJ, Keely S, Glover LE, Bowers BE, Scully M, Bruyninckx WJ, Colgan SP. Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(32):14298-303.
117. Flesher RP, Herbert C, Kumar RK. Resolvin E1 promotes resolution of inflammation in a mouse model of an acute exacerbation of allergic asthma. *Clinical Science*. 2014;126:805-14.
118. Rossi AG, Hallett JM, Sawatzky DA, Teixeira MM, Haslett C. Modulation of granulocyte apoptosis can influence the resolution of inflammation. *Biochemical Society transactions*. 2007;35(Pt 2):288-91.
119. El Kebir D, Gjorstrup P, Filep JG. Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(37):14983-8.
120. Qu X, Zhang X, Yao J, Song J, Nikolic-Paterson DJ, Li J. Resolvins E1 and D1 inhibit interstitial fibrosis in the obstructed kidney via inhibition of local fibroblast proliferation. *The Journal of Pathology*. 2012;228(4):506-19.
121. Merched AJ, Ko K, Gotlinger KH, Serhan CN, Chan L. Atherosclerosis: evidence for impairment of resolution of vascular inflammation governed by specific lipid mediators. *The FASEB Journal*. 2008;22(10):3595-606.
122. Oh SF, Pillai PS, Recchiuti A, Yang R, Serhan CN. Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(2):569-81.

123. Schif-Zuck S, Gross N, Assi S, Rostoker R, Serhan CN, Ariel A. Saturated-efferocytosis generates pro-resolving CD11b^{low} macrophages: Modulation by resolvins and glucocorticoids. *European Journal of Immunology*. 2011;41(2):366-79.
124. Navarro-Xavier RA, Newson J, Silveira VLF, Farrow SN, Gilroy DW, Bystrom J. A new strategy for the identification of novel molecules with targeted proresolution of inflammation properties. *J Immunol*. 2010;184(3):1516-25.
125. Hsiao H-M, Sapinoro RE, Thatcher TH, Croasdell A, Levy EP, Fulton RA, Olsen KC, Pollock SJ, Serhan CN, Phipps RP, Sime PJ. A Novel Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Role for Resolvin D1 in Acute Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation. *PLoS ONE*. 2013;8(3).
126. Aoki H, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Koga Y, Sunaga N, Nakakura T, Okajima F, Dobashi K, Mori M. Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2010;400(1):128-33.
127. Shirey KA, Lai W, Pletneva LM, Karp CL, Divanovic S, Blanco JCG, Vogel SN. Role of the lipoxygenase pathway in RSV-induced alternatively activated macrophages leading to resolution of lung pathology. *Mucosal Immunology*. 2014;7(3):549-57.
128. Takamiya R, Fukunaga K, Arita M, Miyata J, Seki H, Minematsu N, Suematsu M, Asano K. Resolvin E1 maintains macrophage function under cigarette smoke-induced oxidative stress. *FEBS Open Bio*. 2012;2:328-33.
129. Haworth O, Cernadas M, Yang R, Serhan CN, Levy BD. Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation. *Nature Immunology*. 2008;9(8):873-9.
130. Haworth O, Cernadas M, Levy BD. NK Cells Are Effectors for Resolvin E1 in the Timely Resolution of Allergic Airway Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2011;186(11):6129-35.
131. Yang J, Eiserich JP, Cross CE, Morrissey BM, Hammock BD. Metabolomic profiling of regulatory lipid mediators in sputum from adult cystic fibrosis patients. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012;53(1):160-71.
132. Szymanski KV, Toennies M, Becher A, Fatykhova D, N'Guessan PD, Gutbier B, Klauschen F, Neuschaefer-Rube F, Schneider P, Rueckert J, Neudecker J, Bauer TT, Dalhoff K, Drömann D, Gruber AD, Kershaw O, Temmesfeld-Wollbrueck B, Suttorp N, Hippenstiel S, Hocke AC. *Streptococcus pneumoniae*-induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *European Respiratory Journal*. 2012;40(6):1458-67.
133. Müller-Redetzky HC, Wienhold SM, Berg J, Hocke AC, Hippenstiel S, Hellwig K, Gutbier B, Opitz B, Neudecker J, Rückert J, Gruber AD, Kershaw O, Mayer K, Suttorp N, Witzernath M. Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(3):830-40.
134. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
135. Parolini S, Santoro A, Marcenaro E, Luini W, Massardi L, Facchetti F, Communi D, Parmentier M, Majorana A, Sironi M, Tabellini G, Moretta A, Sozzani S. The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues. *Blood*. 2007;109(9):3625-32.
136. Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Human lung ex vivo infection models. 2017. p. 511-24.
137. Witzernath M, Schmeck B, Doehn J, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler J, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti V, Suttorp N, Rosseau S. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia*. *Critical Care Medicine*. 2009;37(2):642-9.
138. Witzernath M, Gutbier B, Hocke A, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell T, Toyos Jdl, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Critical Care Medicine*. 2006;34(7):1947-54.

139. Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, Fischetti VA, Löffler J, Suttorp N, Hippenstiel S, Witzentrath M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(9):2111-7.
140. Reppe K, Radünzel P, Dietert K, Tschernig T, Wolff T, Hammerschmidt S, Gruber AD, Suttorp N, Witzentrath M. Pulmonary immunostimulation with MALP-2 in influenza virus-infected mice increases survival after pneumococcal superinfection. *Infection and Immunity*. 2015;83(12):4617-29.
141. Camp JV, Jonsson CB. A role for neutrophils in viral respiratory disease. *Frontiers Media SA*; 2017. p. 550-.
142. Samson M, Edinger AL, Stordeur P, Rucker J, Verhasselt V, Sharron M, Govaerts C, Mollereau C, Vassart G, Doms RW, Parmentier M. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur J Immunol*. 1998;28(5):1689-700.
143. Luangsay S, Wittamer V, Bondue B, De Henau O, Rouger L, Brait M, Franssen JD, de Nadai P, Huaux F, Parmentier M. Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model. *The Journal of Immunology*. 2009;183(10):6489-99.
144. Islam SA, Thomas SY, Hess C, Medoff BD, Means TK, Brander C, Lilly CM, Tager AM, Luster AD. The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood*. 2006;107(2):444-53.
145. Runarsson G, Liu A, Mahshid Y, Feltenmark S, Pettersson A, Klein E, Björkholm M, Claesson H-E. Leukotriene B4 plays a pivotal role in CD40-dependent activation of chronic B lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 2005;105(3):1274-9.
146. Pettersson A, Richter J, Owman C. Flow cytometric mapping of the leukotriene B4 receptor, BLT1, in human bone marrow and peripheral blood using specific monoclonal antibodies. *International Immunopharmacology*. 2003;3(10):1467-75.
147. Gaudreault E, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2005;75(1):25-34.
148. Yamawaki H, Kameshima S, Usui T, Okada M, Hara Y. A novel adipocytokine, chemerin exerts anti-inflammatory roles in human vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;423(1):152-7.
149. Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. *Virulence*. 2014;5(1):213-8.
150. Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, Ferracin F, Nieto C, Espinosa M, Landmann R. Toll-Like Receptor 2 Deficiency Delays Pneumococcal Phagocytosis and Impairs Oxidative Killing by Granulocytes. *Infection and Immunity*. 2005;73(12):8397-401.
151. Qiu H, Johansson A-S, Sjöström M, Wan M, Schröder O, Palmblad J, Haeggström JZ. Differential induction of BLT receptor expression on human endothelial cells by lipopolysaccharide, cytokines, and leukotriene B4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(18):6913-8.
152. Wächter SF. Effects of omega-3 fatty acids docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid and their metabolites in acute inflammation. 2012.
153. Skuladottir IH, Petursdottir DH, Hardardottir I. The effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on TNF- α and IL-10 secretion by murine peritoneal cells in vitro. *Lipids*. 2007;42(8):699-706.
154. Hardardottir I, Kinsella JE. Tumor necrosis factor production by murine resident peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1991;1095(3):187-95.
155. Weinheimer VK, Becher A, Tönnies M, Holland G, Knepper J, Bauer TT, Schneider P, Neudecker J, Rückert JC, Szymanski K, Temmesfeld-Wollbrueck B, Gruber AD, Bannert N, Suttorp N, Hippenstiel S, Wolff T, Hocke AC. Influenza A Viruses Target Type II Pneumocytes in the Human Lung. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012;206(11):1685-94.

156. Dalli J, Serhan CN. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood*. 2012;120(15):e60-e72.
157. Middleton AM, Keig P, Wilson R. In vitro models of infection I--human respiratory tissue organ culture. *Methods Mol Med*. 2003;71:277-95.
158. Tam VC, Quehenberger O, Oshansky CM, Suen R, Armando AM, Treuting PM, Thomas PG, Dennis EA, Aderem A. Lipidomic profiling of influenza infection identifies mediators that induce and resolve inflammation. *Cell*. 2013;154(1):213-27.
159. Imai Y. Role of omega-3 PUFA-derived mediators, the protectins, in influenza virus infection. 2015. p. 496-502.
160. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanebe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, Kadowaki A, Ohto T, Nakanishi H, Taguchi R, Nakaya T, Murakami M, Yoneda Y, Arai H, Kawaoka Y, Penninger Josef M, Arita M, Imai Y. The Lipid Mediator Protectin D1 Inhibits Influenza Virus Replication and Improves Severe Influenza. *Cell*. 2013;153(1):112-25.
161. Wang H, Anthony D, Yatmaz S, Wijburg O, Satzke C, Levy B, Vlahos R, Bozinovski S. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces pneumococcal lung infection and inflammation in a viral and bacterial coinfection pneumonia model. *Clinical Science*. 2017;131(18):2347-62.
162. Levy BD. Resolvins and protectins: Natural pharmacophores for resolution biology. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2010;82(4-6):327-32.
163. Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods*. 2014;0:60-79.
164. Srivastava B, Błazejewska P, Hessmann M, Bruder D, Geffers R, Mauel S, Gruber AD, Schughart K. Host genetic background strongly influences the response to influenza a virus infections. *PloS One*. 2009;4(3):e4857.
165. Sládková T, Kostolanský F. The role of cytokines in the immune response to influenza A virus infection. *Acta Virol*. 2006;50(3):151-62.
166. Eickmeier O, Seki H, Haworth O, Hilberath JN, Gao F, Uddin M, Croze RH, Carlo T, Pfeffer MA, Levy BD. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury. *Mucosal Immunology*. 2013;6(2):256-66.
167. Hecker M, Linder T, Ott J, Walmrath H-DD, Lohmeyer J, Vadász I, Marsh LM, Herold S, Reichert M, Buchbinder A, Morty RE, Bausch B, Fischer T, Schulz R, Grimminger F, Witzernath M, Barnes M, Seeger W, Mayer K, Morty ER, Bausch B, Fischer T, Schulz R, Grimminger F, Witzernath M, Barnes M, Seeger W, Mayer K. Immunomodulation by lipid emulsions in pulmonary inflammation: A randomized controlled trial. *Critical Care*. 2015;19(1):226-.
168. Basil MC, Levy BD. Specialized pro-resolving mediators: Endogenous regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(1):51-67.
169. Serhan CN, Chiang N, editors. *Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: A new pharmacologic genus* 2008 2008/03//: Wiley-Blackwell.
170. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. *Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators*. 2007.
171. 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. Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie – Update 2009. *Pneumologie*. 2009;63(10):e1-e68.
172. Waffarn EE, Baumgarth N. Protective B cell responses to flu – no fluke! *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(7):3823-9.
173. Wolf AI, Strauman MC, Mozdzanowska K, Whittle JRR, Williams KL, Sharpe AH, Weiser JN, Caton AJ, Hensley SE, Erikson J. Coinfection with *Streptococcus pneumoniae* Modulates the B Cell Response to Influenza Virus. *Journal of Virology*. 2014;88(20):11995-2005.

174. Xiang L, Zhou TJ, Zhou LL, Luo J, Qin Z, You JZ, Jian J, Zhao ZY, Zhou YS, Ye YC, Wang HR, Wang BN, Li MY. Influenza a virus and Streptococcus pneumonia coinfection potentially promotes bacterial colonization and enhances B lymphocyte depression and reduction. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019;33(5):1437-49.
175. Wu Y, Tu W, Lam K-T, Chow K-H, Ho P-L, Guan Y, Peiris JSM, Lau Y-L. Lethal Coinfection of Influenza Virus and Streptococcus pneumoniae Lowers Antibody Response to Influenza Virus in Lung and Reduces Numbers of Germinal Center B Cells, T Follicular Helper Cells, and Plasma Cells in Mediastinal Lymph Node. *Journal of Virology*. 2014;89(4):2013-23.
176. Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med*. 2016;8(353):353ra111.
177. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature*. 2002;420(6917):846.
178. Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, Serhan CN. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. 2012.
179. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(10):787.
180. Codagnone M, Cianci E, Lamolinara A, Mari VC, Nespola A, Isopi E, Mattoscio D, Arita M, Bragonzi A, Iezzi M, Romano M, Recchiuti A. Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Mucosal Immunology*. 2018;11(1):35-49.
181. Elie Abdulnour RE, Pan Sham H, Douda DN, Colas RA, Dalli J, Bai Y, Ai X, Serhan CN, Levy BD. Aspirin-triggered resolvin D1 is produced during self-resolving gram-negative bacterial pneumonia and regulates host immune responses for the resolution of lung inflammation HHS Public Access. *Mucosal Immunol*. 2016;9(5):1278-87.
182. Rostoker R, Yaseen H, Schif-Zuck S, Lichtenstein RG, Rabinovich GA, Ariel A. Galectin-1 induces 12/15-lipoxygenase expression in murine macrophages and favors their conversion toward a pro-resolving phenotype. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2013;107:85-94.
183. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annual Review of Immunology*. 2004;22(1):891-928.
184. Campbell E, MacManus C, Kominsky D, Keely S, Glover L, Bowers B, Scully M, Bruyninckx W, Colgan S. Resolvin E1-induced intestinal alkaline phosphatase promotes resolution of inflammation through LPS detoxification. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017;17(suppl_1):S13-S.
185. Matthay MA. Resolution of pulmonary edema thirty years of progress. *American Thoracic Society*; 2014. p. 1301-8.
186. Bannenberg GL, Chiang N, Ariel A, Arita M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular Circuits of Resolution: Formation and Actions of Resolvins and Protectins. *The Journal of Immunology*. 2005;174(7):4345-55.
187. Hecker M, Sommer N, Foch S, Hecker A, Hackstein H, Witzentrath M, Weissmann N, Seeger W, Mayer K. Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2018;1863(9):1016-28.
188. Mayer K, Sommer N, Hache K, Hecker A, Reiche S, Schneck E, Weissmann N, Seeger W, Hecker M. Resolvin E1 Improves Mitochondrial Function in Human Alveolar Epithelial Cells during Severe Inflammation. *Lipids*. 2019;54(1):53-65.
189. PubChem. Resolvin E1.
190. Resolvin E1 (CAS 552830-51-0) | Cayman Chemical.
191. Efficacy and Safety of RX-10045 Ophthalmic Solution for Ocular Inflammation and Pain in Cataract Surgery 2014 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02329743>].

192. Croasdell A, Lacy SH, Thatcher TH, Sime PJ, Phipps RP. Resolvin D1 Dampens Pulmonary Inflammation and Promotes Clearance of Nontypeable Haemophilus influenzae. *The Journal of Immunology*. 2016;196(6):2742-52.
193. Orr SK, Colas RA, Dalli J, Chiang N, Serhan CN. Proresolving actions of a new resolvin D1 analog mimetic qualifies as an immunoresolvent. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308(9):L904-L11.

8 Anhang

8.1 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Moritz Müller-Plathe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale Entzündungsreaktion in verschiedenen Pneumoniemodellen 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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Moritz Müller-Plathe

8.2 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in Form eines Abstracts im Rahmen eines Workshops vorab veröffentlicht:

1. Reppe K, **Müller-Plathe M**, Krause PM, Wienhold SM, Dietert K, Gurtner C, Gutbier B, Nouailles G, Müller-Redetzky HC, Gruber A, Hocke A, Mayer K, und Witzenrath M. **„Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale Entzündungsreaktion in verschiedenen Pneumoniemodellen“**. 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Dresden 14.03. – 17.03. 2018, 27. Workshop des Arbeitskreises „Respiratorisches System“. Pneumologie 2018; 72(07): 536-537, DOI: 10.1055/s-0038-1660919

Beitrag im Einzelnen:

1) Die Konzeption der aus dieser Arbeit verwendeten Teilexperimente erfolgte in Zusammenarbeit von M-P.M, R.K. und W.M. Die Planung und Koordinierung der aus dieser Arbeit verwendeten Teilexperimente erfolgte durch M-P.M und R.K.

Prof. Dr. med. Martin Witzenrath

Moritz Müller-Plathe

8.3 Lebenslauf

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

8.4 Publikationsliste

1. Reppe K, **Müller-Plathe M**, Krause PM, Wienhold SM, Dietert K, Gurtner C, Gutbier B, Nouailles G, Müller-Redetzky HC, Gruber A, Hocke A, Mayer K, und Witzernath M. **„Einfluss von Resolvin E1 auf die pulmonale Entzündungsreaktion in verschiedenen Pneumoniemodellen“**. 59. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Dresden 14.03. – 17.03. 2018, 27. Workshop des Arbeitskreises „Respiratorisches System“. Pneumologie 2018; 72(07): 536-537, DOI: 10.1055/s-0038-1660919

8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Martin Witzzenrath, Leiter des Arbeitsbereichs Pulmonale Inflammation, Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, für das Überlassen des interessanten Promotionsthemas, die Bereitstellung der Ressourcen und die engagierte Betreuung.

Meiner Mentorin Frau Dr. Katrin Reppe, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie danke ich in besonderem Maße für die ausführliche Einarbeitung in die verwendeten Methoden, die häufigen Gespräche und Diskussionen, die unermüdliche Beantwortung der vielen Fragen, sowie für die tatkräftige Unterstützung bei den Experimenten, sowie bei der Korrektur der Dissertation.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Andreas Hocke, Frau Dr. Birgit Gutbier, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie danke ich für Ihren Einsatz bei der Herstellung und Beurteilung der histologischen Präparate im Rahmen dieser Arbeit.

Frau Dr. Sandra Wienhold, Charité Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie möchte ich für ihre Unterstützung bei den Experimenten mit humanen Lungengewebebeobachten danken.

Der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Herrn Univ.-Prof. Konstantin Mayer, Justus-Liebig-Universität Gießen, Medizinische Klinik und Poliklinik II, danke ich für die Durchführung von Referenzuntersuchungen der Wirksamkeit der verwendeten Lipidmediatoren.

Das freundliche, familiäre Arbeitsklima, der Zusammenhalt des Laborteams, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Daher möchte ich mich beim gesamten Laborteam herzlich für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und Großeltern, an welche ich mich jederzeit wenden konnte und welche mir auch in schwierigen Zeiten mit Ratschlägen sowohl moralisch als auch inhaltlich zur Seite standen. Zudem danke ich Ihnen für die fachlichen Gespräche und geteilten Erfahrungen, die wesentlich dazu beigetragen haben, mich für diesen Berufsweg zu entscheiden.