

Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
Direktor: Professor Dr. med. Norbert Suttrop

HABILITATIONSSCHRIFT

Pneumokokkenpneumonie: Experimentelle Untersuchungen zu Pathophysiologie und Interventionsmöglichkeiten.

zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Martin Witzernath
geboren am 05.06.1974 in Bietigheim-Bissingen

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 19.04.2010

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Lohmeyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Welte

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	4
1 Einleitung	6
1.1 Die Lunge	6
1.2 Pulmonale Immunmechanismen	7
1.3 Pneumonie	9
1.3.1 Epidemiologie der Pneumonie	9
1.3.2 Ätiologie der Pneumonie	10
1.3.3 Klinisches Bild der Pneumonie	10
1.3.3 Therapie der Pneumonie	11
1.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
1.4.1 Pneumokokken als Infektionserreger	13
1.4.2 Pneumolysin	14
1.5 Akutes Lungenversagen	15
1.5.1 Pathophysiologie des Akuten Lungenversagens	19
1.5.2 Therapie bei Akutem Lungenversagen	21
1.5.3 Experimentelle Therapieansätze bei Akutem Lungenversagen	23
2 Ergebnisse	24
2.1 Prävention der Pneumokokkenpneumonie	24
2.1.1 Immunstimulation mit Makrophagen-aktivierendem Lipopeptid-2 erhöht das Überleben bei der Pneumokokkenpneumonie der Maus	24
2.2 Akutes Lungenversagen bei Pneumokokkenpneumonie	25
2.2.1 Die Bedeutung des Pneumolysin für die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie	25
2.2.2 Die Rolle des Plättchen-aktivierenden Faktors bei Pneumolysin-induziertem Akuten Lungenversagen	26
2.2.3 Angiopietin sensibilisiert Endothelzellen für TNF- α und spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Inflammation	27
2.2.4 Tumornekrosefaktor- α abhängige Expression der Phosphodiesterase 2: Rolle bei endothelialer Permeabilität	28
2.2.5 Die Inhibition der Phosphodiesterase 2 vermindert das Akute Lungenversagen bei muriner Pneumokokkenpneumonie	29

2.3	<i>Antimikrobielle Therapie der Pneumokokkenpneumonie</i>	30
2.3.1	Systemische Gabe des Endolysin Cpl-1 rettet Mäuse mit tödlicher Pneumokokkenpneumonie.....	30
3	Diskussion	31
3.1	<i>Prävention der Pneumokokkenpneumonie</i>	32
3.2	<i>Entwicklung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie</i>	33
3.2.1	Die Bedeutung des Pneumolysin für die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie.....	33
3.2.2	Angiopietin-2 beeinflusst endotheliale Inflammation.....	36
3.2.3	Die Rolle der Phosphodiesterase 2 bei der Entstehung des akuten Lungenversagens	38
3.3	<i>Therapie der Pneumokokkenpneumonie mit lytischem Phagenenzym</i>	39
3.4	<i>Ausblick</i>	42
4	Literatur	43
	Danksagung.....	54
	Eidesstattliche Erklärung.....	55

ZUSAMMENFASSUNG

Die Pneumonie ist weltweit die häufigste Infektionskrankheit. Ihre sehr hohe Letalität konnte durch Einführung der antibiotischen Therapie deutlich reduziert werden, beträgt seitdem jedoch bei schwerer Pneumonie unverändert 10-14%. Mehrere Ansätze zur Reduktion der Pneumonieletalität konnten identifiziert und experimentell evaluiert werden.

Beeinträchtigungen der angeborenen pulmonalen Immunabwehr begünstigen die Entstehung und einen schweren Verlauf der Pneumonie, jedoch sind bisher keine geeigneten medikamentösen Präventionsmaßnahmen verfügbar. In der aktuellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die präventive Stimulation des Mustererkennungsrezeptors TLR-2 die Letalität der nachfolgenden Pneumokokkenpneumonie in der Maus dramatisch senken kann.

Bei ungünstigem Verlauf der Pneumonie kann trotz des Einsatzes wirksamer Antibiotika ein akutes Lungenversagen entstehen. Pneumoniekranke mit hohem Letalitätsrisiko können zwar frühzeitig identifiziert werden, jedoch ist aktuell keine Interventionsmöglichkeit etabliert, die den Progress zum Akuten Lungenversagen verhindert. Da eine inadäquate Pathogen-Wirt-Interaktion maßgeblich zur Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumonie beiträgt, wurde die Rolle des bakteriellen Pathogenitätsfaktors Pneumolysin untersucht und ein wesentlicher Beitrag des Exotoxins zu Hyperpermeabilität und pulmonaler Hypertonie beobachtet. Hierbei kam dem Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) eine wesentliche Mediatorrolle zu, so dass PAF sich möglicherweise als therapeutisches Ziel eignen könnte. Ferner wurde erstmals beschrieben, dass Angiotensin-2 durch Sensibilisierung von Endothelzellen gegenüber Tumornekrosefaktor- (TNF-) α eine Schlüsselrolle bei endothelialer Inflammation einnimmt. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise therapeutisch beeinflusst werden. Eine weitere geeignete Interventionsmöglichkeit könnte die Inhibition der Phosphodiesterase (PDE) 2 darstellen. Phosphodiesterasen vermindern intrazelluläre zyklische Nucleotide und beeinträchtigen so die endotheliale Barrierefunktion. PDE2-Expression und -Aktivität stiegen bei Inflammation und insbesondere bei experimenteller Pneumonie, und die Inhibition der PDE2 verhinderte die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie in der Maus.

Von zentraler Bedeutung für den Verlauf der Pneumonie ist der Einsatz eines wirksamen Antibiotikums, jedoch wird die Therapie durch zunehmende Entwicklung

bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika erschwert. Das kürzlich isolierte und aufgereinigte Bakteriophagenenzym Cpl-1 lysiert Pneumokokken schnell und spezifisch. In der aktuellen Studie überlebten Mäuse mit unbehandelt tödlich verlaufender Pneumokokkenpneumonie durch systemische Gabe des lytischen Bakteriophagenenzym. Cpl-1 könnte daher eine neue Perspektive für die Behandlung der Pneumokokkenpneumonie bieten.

1 EINLEITUNG

1.1 Die Lunge

Eine wesentliche Aufgabe der Lunge besteht im ausreichenden Gasaustausch zwischen Organismus und Umgebungsluft. Um diesen zu gewährleisten, weist die Lunge eine grazile mikroskopische Struktur mit engster Nachbarschaft von Alveolen und Kapillaren auf, deren Integrität von größter Bedeutung ist. Neben ausreichender Zufuhr von sauerstoffreicher Luft, Ableitung von kohlendioxidreicher Luft, und Perfusion der Lungengefäße sind eine genügende Diffusionskapazität und eine sauerstoffgesteuerte Anpassung des Gefäßwiderstandes in der Lungenstrombahn (von Euler-Liljestrand Mechanismus) für die Erhaltung der Gasaustauschfunktion nötig.

Die Atemwege der Lunge werden von mehrreihigem oder mehrschichtigem tracheobronchialen Epithel ausgekleidet, das aus zilientragenden Zellen, sekretorischen Becherzellen und Zellen mit Mikrovilli besteht und die mukoziliäre Reinigungsfunktion sicherstellt. Die Bronchiolen werden von kuboidalem Epithel und sekretorischen Clara-Zellen ausgekleidet, während das Alveolarepithel aus Typ I- und Typ II-Zellen besteht. Etwa 95 % der internen Lungenoberfläche besteht aus Alveolar-Typ I-Zellen. Sie bilden mit Endothelzellen der Alveolarkapillaren eine gemeinsame Basalmembran und somit die Gasaustauschbarriere. Alveoläre Typ II-Zellen erfüllen eine Vielzahl an Funktionen, etwa die Steuerung des pulmonalen Surfactant-Systems¹ und des alveolären Flüssigkeitsgehalts². Außerdem ersetzen sie die Typ I-Zellen³.

Die pulmonale Barriere steht mit einer sehr großen Oberfläche von etwa 200 m² in ständigem Kontakt mit unserer Umwelt, so dass eine fortwährende Exposition dieser empfindlichen Grenzfläche gegenüber Gasen, Aerosolen und Partikeln verschiedener Größe besteht, die Allergene, Noxen und Pathogene sein können. Angeborene und erworbene Immunmechanismen müssen verhindern, dass exogene Substanzen Schaden verursachen⁴. An den Schutzmechanismen sind zahlreiche Zellpopulationen beteiligt, einschließlich unterschiedlich differenzierter Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, ortständigen Makrophagen und dendritischen Zellen, sowie einwandernden Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, welche in enger Nachbarschaft zueinander lokalisiert sind⁵ (Abb. 1). Versagen die

Schutzmechanismen, dann kann unter anderem eine Störung der alveolokapillären Schranke mit Verminderung der Gasaustauschfunktion resultieren.

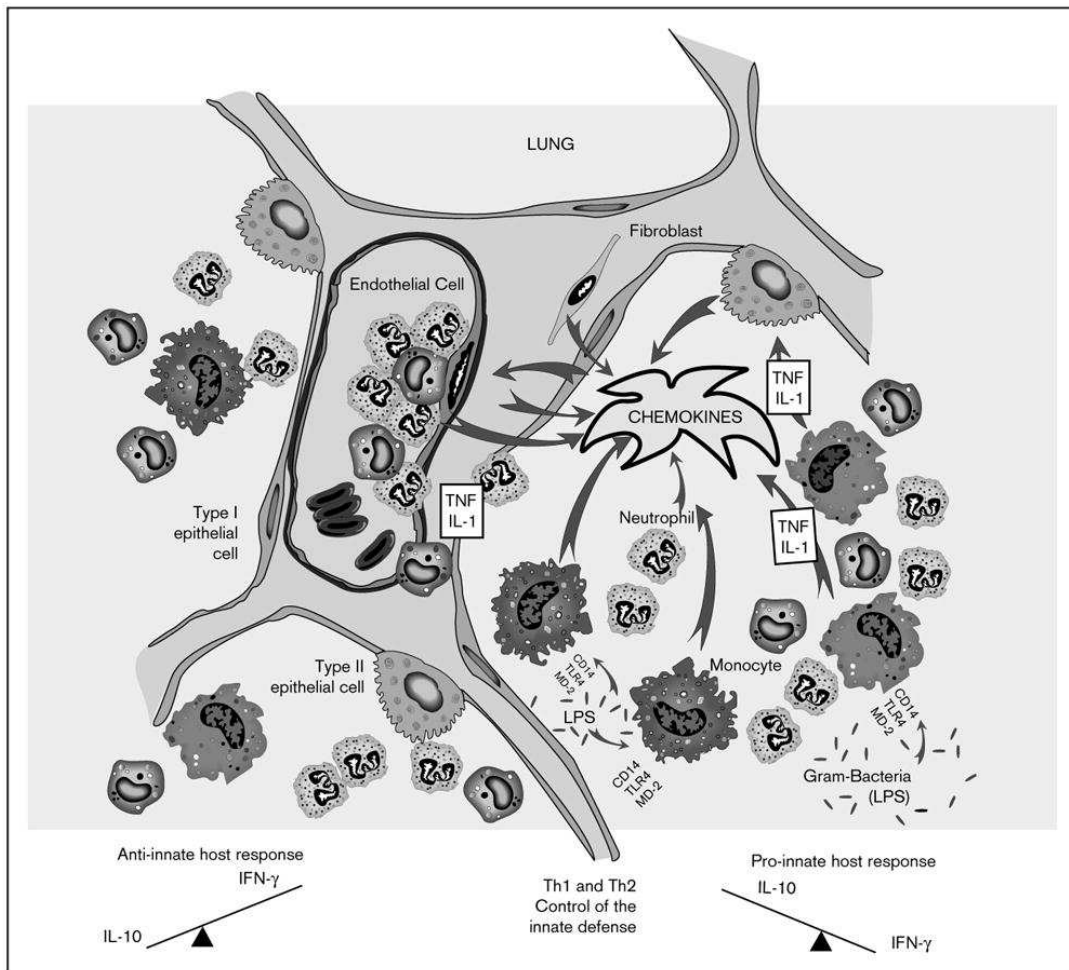


Abb. 1: Die angeborene Infektabwehr in der Lunge. (Quelle: Ref.⁴)

1.2 Pulmonale Immunmechanismen

Die Grenzfläche zwischen Umwelt und Wirtsorganismus wird durch Atemwegs- und Lungenepithel gebildet und stellt die erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunität dar. Das Epithel dient sowohl als mechanische Barriere, als auch zur Erkennung von Pathogenen und zur Initiierung einer Immunantwort⁴ (Abb. 1).

In die Atemwege eindringende Mikroorganismen werden von Wirtszellen erkannt, weil sie an ihrer Oberfläche molekulare Muster („pathogen associated molecular patterns, PAMPs) präsentieren, welche sie von anderen Pathogenen und vom Wirt unterscheiden⁶. Dem Wirt dienen zur Erkennung und Unterscheidung der PAMPs phylogenetisch konservierte Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs). Zu diesen Rezeptoren zählen die Familie der 11 transmembranär auf der Zelloberfläche oder endosomal lokalisierten „Toll-like“-Rezeptoren (TLR)^{7;8}, sowie zytosolische

„nucleotide oligomerization domain“ (NOD)-like Rezeptoren (NLR)^{9;10}. TLR2 erkennt z. B. Oberflächenmuster von grampositiven Bakterien, TLR4 erkennt u.a. das Lipopolysaccharid gramnegativer Keime und Pneumolysin, und TLR3, 7, 8 und 9 erkennen Nukleinsäuren⁶. Neben den TLR und den NLR ist bei der Pneumokokkeninfektion der Rezeptor für „Plättchen aktivierenden Faktor“ (PAF) für die Interaktion der Pneumokokken mit der Wirtszelle und für die Infektiosität von zentraler Bedeutung¹¹.

PRRs aktivieren nach der Erkennung von Mikroorganismen intrazelluläre Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren^{12;13}. Diese Signalwege bestehen in der Regel aus drei bis vier in Abfolge durch Phosphorylierung aktivierte Kinasen, die nach ihrem jeweils zentralen Mitglied unterschieden werden: u.a. p38-, p42/44-, JNK und ERK5 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen¹⁴. Ein zentraler proinflammatorischer Transkriptionsfaktor ist der nukleäre Faktor kB (NF-kB), der sowohl über seine zytosolische oder nukleäre Lokalisation, als auch über posttranslationelle Modifikationen reguliert wird¹⁵. Eine Aktivierung führt zur Bildung und Freisetzung von Mediatoren^{4;12;16}. Zur vollständigen Aktivierung der Wirtsabwehr erfolgt die Freisetzung spezifischer Zytokinmuster⁴. Frühe Zytokine amplifizieren das Signal der Pathogenerkennung und binden weitere Zellen in die Immunantwort ein¹⁶. Insbesondere die Rekrutierung von Leukozyten durch chemotaktische Botenstoffe an den Ort der Infektion ist von besonderer Bedeutung für die Eindämmung der bakteriellen Invasion¹⁷. Neutrophile Granulozyten können beispielsweise mittels Phagozytose und Bildung extrazellulärer Netze Mikroben töten und durch Zytokinproduktion das immunologische Umfeld beeinflussen und die Immunantwort wesentlich mitgestalten¹⁸. Die Verstärkung der Immunantwort kann für den Wirtsorganismus somit von Vorteil sein, jedoch kann sie auch negative Effekte haben, und insbesondere zur Schädigung der alveolokapillären Gasaustauschbarriere beitragen¹⁸.

1.3 Pneumonie

Die Pneumonie ist eine entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms, die durch eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen ausgelöst wird.

1.3.1 Epidemiologie der Pneumonie

Die Pneumonie ist weltweit die dritthäufigste Todesursache. In den Entwicklungsländern sterben pro Jahr etwa 2 Millionen Kinder an einer Lungenentzündung¹⁹. In den Industrieländern hat die Pneumonie eine Inzidenz von etwa 1 % und stellt unter den Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache dar. Obgleich Menschen jeden Alters an einer Pneumonie erkranken können, sind insbesondere Kinder und ältere Menschen betroffen. Aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland wird hier die Inzidenz der Pneumonie voraussichtlich weiter ansteigen.

Jährlich erkranken in Deutschland etwa 740.000 Menschen an einer ambulant erworbenen Pneumonie (community acquired pneumonia; CAP). Ein überwiegender Teil der Patienten mit CAP wird ambulant behandelt und die Mortalität dieser Patienten liegt in Industrieländern in der Regel unter 1 %²⁰. Jedoch müssen etwa 33% der Patienten mit CAP stationär behandelt werden. Laut Statistischem Bundesamt wurden z.B. 2004 in Deutschland 238.659 Patienten aufgrund einer Pneumonie in ein Krankenhaus eingewiesen, und somit deutlich mehr als beispielsweise aufgrund von Myokardinfarkten (132.501) oder Schlaganfällen (161.758). Bei den stationär behandelten Patienten beträgt die Mortalität über 12 %²¹. Dabei wird die Letalität wesentlich durch Komorbiditäten, wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, oder sonstige Risikofaktoren, wie ein hohes Lebensalter mitbestimmt²⁰.

Die nosokomial erworbene Pneumonie hat im Vergleich zur ambulant erworbenen Pneumonie eine noch höhere Mortalität von ca. 30 %²² und macht etwa 15 % aller Krankenhausinfektionen aus²³. Insbesondere die Beatmungstherapie prädisponiert für die Entstehung nosokomialer Pneumonien. Beatmungsassoziierte Pneumonien treten bei bis zu 47 % aller Beatmungspatienten auf, verlängern die Liegedauer der Patienten deutlich und haben besonders häufig schwere Verläufe mit hoher Mortalität²³.

Pneumonien verursachen eine bedeutende Belastung der öffentlichen Gesundheitssysteme²⁴. Beispielsweise führt die ambulant erworbene Pneumonie in

den USA zu jährlich 10 Millionen Arztkontakten, 64 Millionen Krankheitstagen und 500.000 Krankenhausaufnahmen und verursacht Kosten in Höhe von 20 Milliarden US\$ pro Jahr, während in Deutschland jährlich Kosten in Höhe von etwa 500 Millionen Euro verursacht werden²⁵.

1.3.2 Ätiologie der Pneumonie

Die CAP wird am häufigsten durch *Streptococcus pneumoniae* ausgelöst, gefolgt von *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, Viren (Influenza-A- und -B-, Parainfluenza-, Adenoviren und Respiratory Syncytial Virus), *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella* spp., *Moraxella catarrhalis* und *Staphylococcus aureus*. Bei einer nosokomialen Pneumonie, die mehr als 5 Tage nach stationärer Aufnahme erworben wurde („late onset“), sind darüber hinaus Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.), *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter*, Anaerobier und andere Bakterien, sowie Pilze (*Aspergillus* spp., *Candida* spp.) als Ursache in Betracht zu ziehen. Bei immunkompromittierten Patienten können zusätzlich *Nocardia* spp., atypische Mykobakterien, *Rhodococcus equi*, *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jiroveci*, Zytomegalievirus, Herpes simplex Virus und Varizella Zoster Virus ursächlich beteiligt sein. Die beatmungsassoziierte Pneumonie („ventilator associated pneumonia“, VAP) wird überwiegend durch gramnegative Erreger verursacht, wie multiresistente Enterobacteriaceae (*E. coli*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) und *Pseudomonas* spp., und durch *S. aureus*.

1.3.3 Klinisches Bild der Pneumonie

Die „klassischen“ Symptome der Pneumonie umfassen Fieber, Schüttelfrost, Husten mit mukopurulentem Sputum, Dyspnoe und Abgeschlagenheit. Zeichen der Hypoxämie (Zyanose, Verwirrtheit) und der Pleuritis (Brustschmerzen, schmerzbedingte Schonatmung) können das klinische Bild ergänzen. Insbesondere bei Patienten höheren Alters können die Symptome jedoch unspezifisch sein.

Bei der körperlichen Untersuchung fallen ferner ein gedämpfter Klopfeschall und ein verstärkter Stimmfremitus über infiltrierten Arealen der Lunge auf. Auskultatorisch können feinblasige Rasselgeräusche nachweisbar sein. Eine Tachykardie ist häufig, jedoch kann insbesondere bei Pneumonien durch Viren, Mykoplasmen, Chlamydien oder Legionellen eine relative Bradykardie vorliegen.

Die Diagnose der Pneumonie wird radiologisch durch Nachweis eines oder mehrerer Infiltrate gesichert (Abb. 2). Ausnahme stellen Pneumonien bei Patienten mit Neutropenie dar, da diese oftmals kein Infiltrat ausbilden. In der Blutgasanalyse können Zeichen der Hypoxämie auftreten, und sonographisch kann mitunter eine Rechtsherzbelastung nachgewiesen werden. Laborchemisch können eine Leukozytose und eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins sowie gegebenenfalls des Procalcitonin auffallen. Elektrolyte, Harnstoff und Kreatinin sollten zur therapeutischen und prognostischen Einschätzung bestimmt werden.

Unter stationären Bedingungen sollte noch vor Beginn einer kalkulierten Antibiotikatherapie Bronchialsekret gewonnen werden, um daraus eine mikrobiologische Erregerbestimmung durchzuführen. Ferner kann im Urin Pneumokokken- und Legionellenantigen nachgewiesen werden.

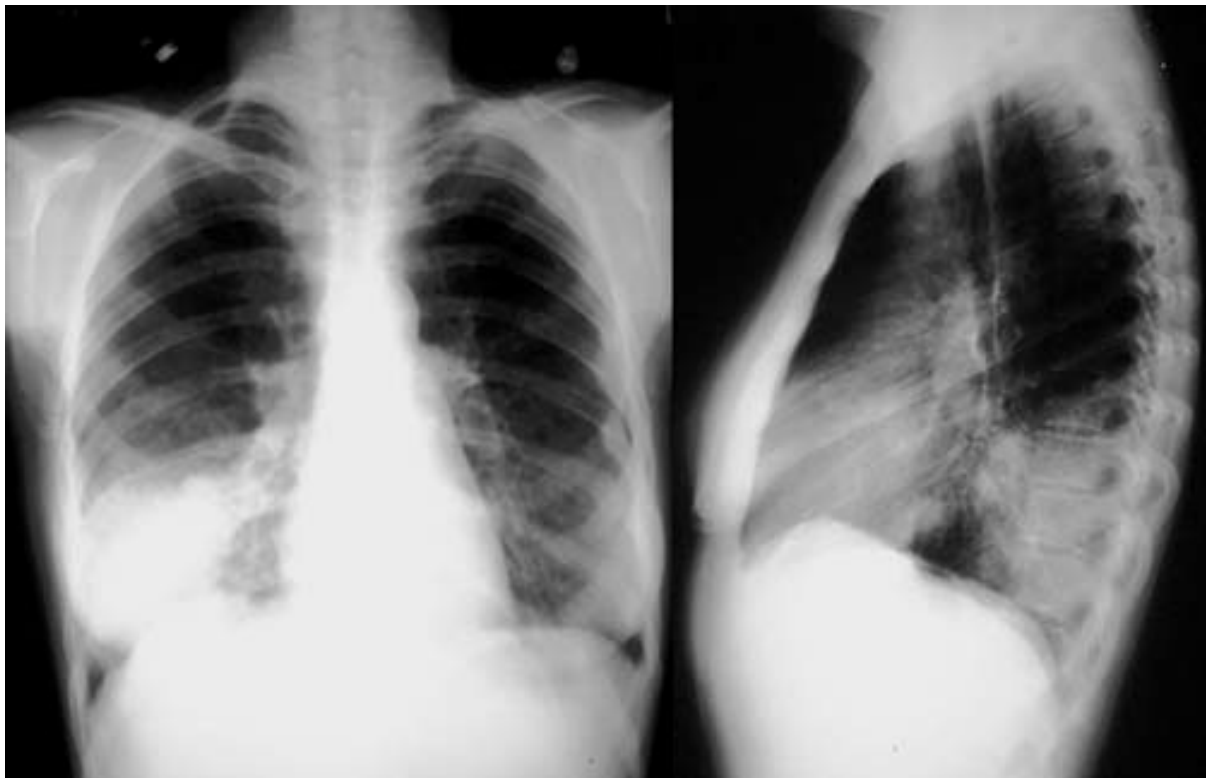


Abb. 2: Konventionelle Röntgenaufnahme des Thorax in zwei Ebenen: Pneumonisches Infiltrat im rechten Unterlappen. (aus: www.medvarsity.com)

1.3.3 Therapie der Pneumonie

In die Entscheidungsfindung, ob ein Patient mit Pneumonie ambulant, normal- oder intensivstationär behandelt wird, sollte maßgeblich die objektive Schweregradeinteilung mittels CRB-65 bzw. CURB-Index²⁶ oder mittels "pneumonia severity index" (PSI)²⁷ einfließen.

Die kalkulierte antibiotische Therapie sollte möglichst rasch nach der Diagnosestellung initiiert werden und richtet sich nach Anamnese und Klinik, und nach der damit verbundenen Wahrscheinlichkeit für bestimmte Erregerspektren. Nach Erhalt mikrobiologischer Erkenntnisse zum ursächlichen Erreger der Pneumonie muss die Therapie adaptiert werden.

Detaillierte Handlungsanweisungen zu Diagnostik und Therapie der ambulant erworbenen Pneumonie geben die „Vorgaben der S3-Leitlinie zum Management der ambulant erworbenen Pneumonie“ (Thieme, 2007; ISBN: 9783131346919).

1.4 Streptococcus pneumoniae

Ungefähr 30 - 45 % der ambulant erworbenen Pneumonien werden in Deutschland und weltweit durch *S. pneumoniae* verursacht. Die Pneumokokken wurden 1881 zeitgleich von G. Sternberg (USA) und L. Pasteur (Frankreich) entdeckt. Es handelt sich um grampositive α -hämolyisierende Streptokokken, die in der Gramfärbung des Sputums als Diplokokken, und während der Vermehrung im flüssigen Wachstumsmedium in Ketten vorkommen (Abb. 3). Ihre Identifizierung erfolgt anhand der α -Hämolyse auf Blutagar-Platten, dem Fehlen von Katalase und der Hemmung ihres Wachstums durch Optochin und Galle.

Klinisch relevante Pneumokokkenstämme verfügen über eine Kapsel, deren Kapselstärke bei enger Interaktion mit Epithelzellen reduziert wird, ein Vorgang der als Phasenvariation bezeichnet wird²⁸. Die Kapsel besteht aus Polysacchariden, die im Zytoplasma als Oligosaccharide synthetisiert, polymerisiert und an der Oberfläche durch kovalente Bindungen in der Zellwand verankert werden. Die unterschiedlichen Antigeneigenschaften der Polysaccharide determinieren den Serotyp der Pneumokokken. Die Serotypen werden nach der US-amerikanischen Nomenklatur in der Reihenfolge ihrer Entdeckung (1 bis 90) unterschieden. Nach der dänischen Nomenklatur werden 21 Serogruppen unterschieden, die jeweils 2-5 verwandte Serotypen enthalten. In den Serogruppen finden sich 65 der insgesamt 90 Serotypen, die restlichen 25 werden einzeln geführt.

Neben der Kapsel besitzen Pneumokokken eine Zellwand aus Peptidoglykan und Teichonsäure (C-Substanz). Ferner werden zahlreiche Proteine als Pathogenitätsfaktoren beschrieben, u.a. Hyaluronsäure, Neuraminidase A und B²⁹, cholinbindendes Protein A³⁰, Pneumokokken-Oberflächenantigen A³¹,

Pneumokokken-Oberflächenprotein A³² auf der Zellwand, sowie Pneumolysin³³ im Zytoplasma.

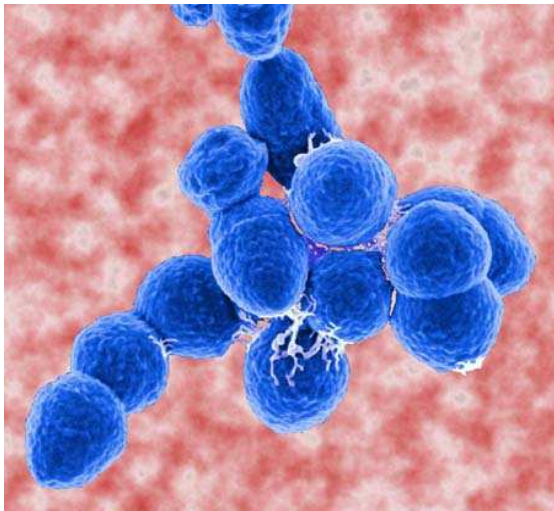


Abb. 3: Kettenbildende *S. pneumoniae* mit einer Größe von 0,5- 1,25 µm.
Quelle: <http://img.sci-lib.com>

1.4.1 Pneumokokken als Infektionserreger

Weltweit verursacht *S. pneumoniae* eine hohe Morbidität und Mortalität²⁴. Entzündungen der Atemwege, des Mittelohrs und der Meningen, sowie Bakteriämien sind die häufigsten Manifestationen einer Pneumokokkeninfektion²¹. Allein in den USA werden jährlich 7 Millionen Fälle von *S. pneumoniae*-bedingter Otitis media und 500.000 Pneumoniefälle registriert³⁴. Zwar können alle Altersgruppen betroffen sein, jedoch treten die Infektionen am häufigsten bei Kindern oder älteren Menschen auf. Darüber hinaus sind Menschen mit chronischen Erkrankungen oder Immundefizienz besonders gefährdet²⁰. Auch in Entwicklungsländern sind Pneumokokken wichtige Erreger von Atemwegsinfektionen, die ca. 1 Million Todesfälle jährlich verursachen²¹. Die Übertragung der Pneumokokken erfolgt überwiegend durch direkten Kontakt mit dem Nasensekret von erkrankten oder gesunden, besiedelten Personen. Meist führt eine solche Pneumokokkenexposition nur zur transienten Besiedlung. Bei für den jeweiligen Serotyp empfindlichen Individuen kann eine Ausbreitung in die Sinus, das Mittelohr, die Atemwege oder sogar in die Blutbahn erfolgen.

Die Inzidenz der Pneumokokkenpneumonie beträgt in Europa und den USA etwa 100 von 100.000 Erwachsenen, während sie für febrile Bakteriämien durch Pneumokokken 15-19 und für Meningitiden 1-2 von 100.000 Erwachsenen beträgt³⁴. Auch in diesen wirtschaftlich hochentwickelten Ländern ist die Mortalität invasiver Pneumokokkeninfektionen hoch. Die Pneumonie ist die mit Abstand häufigste Ursache für Bakteriämie und Tod durch Pneumokokkeninfektionen²¹. Während die

Mortalität einer Pneumokokkenbakteriämie in der präantibiotischen Ära fast 80 % betrug³⁵, beträgt sie heute für Erwachsene ca. 20 %, in Risikogruppen über 50 %²¹. Wichtige unabhängige Risikofaktoren bei Erwachsenen sind Asplenie, aktiver oder passiver Nikotinkonsum, Alkoholismus, sowie Herz- und Lungenerkrankungen. Ferner haben HIV-infizierte Patienten ein bis zu 100-fach erhöhtes Risiko für eine Pneumokokkenpneumonie und -bakteriämie³⁶.

Insbesondere Menschen mit unabhängigen Risikofaktoren, sowie ältere Menschen können von einer Pneumokokken-Schutzimpfung profitieren. Aktuell verfügbare Impfstoffe rufen die Bildung serotypspezifischer Antikörper gegen 23 häufige der 90 bekannten Serotypen von *S. pneumoniae* hervor, die etwa 90% der invasiven Infektionen verursachen. Unter immunkompetenten Erwachsenen beträgt die Effektivität der Impfung 50-80 %²¹, während sie bei immunkompromittierten Patienten, einschließlich HIV-infizierten, deutlich niedriger liegt. Zur Impfung von Kleinkindern kommt ein proteingekoppelter Impfstoff zum Einsatz³⁷. Allerdings ist es bisher nicht gelungen, mehr als 11 der bekannten 90 Serotypen mit diesem Impfstoff abzudecken, was die Möglichkeit eines Serotypwechsels aufgrund von Selektionsdruck erhöht. Eine vermehrte Besiedelung durch nicht abgedeckte Serotypen wurde bereits beobachtet³⁸. Zudem sind Pneumokokken natürlich transformierbar³⁹ und wechseln nicht selten ihre Kapseleigenschaften⁴⁰.

In der Vergangenheit erfolgte ein Wechsel der Erkrankungen verursachenden Serotypen. Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Serotypen 1, 2 und 3 mehr als 75% der schweren Pneumokokkeninfektionen verursachten, sind heute in den Industrieländern bei Erwachsenen die Serotypen 1, 3, 4, 6A/B und 14 für etwa 40 % der invasiven Infektionen verantwortlich²¹, während bei Kindern hauptsächlich die Serotypen 6, 14, 18, 19 und 23 vorkommen⁴¹. Eine Ursache für den Wechsel der vorherrschenden Serotypen könnte eine Änderung des typischen Infektionsweges sein: Früher überwogen epidemische Ausbrüche hochimmunogener Serotypen, während heute für die Verbreitung des Keimes häufig Kleinkinder und andere Menschen mit Trägerstatus verantwortlich sind, so dass weniger immunogene Stämme einen Selektionsvorteil genießen⁴².

Die Therapie der Pneumokokkeninfektionen erfolgt mittels antibiotisch wirksamer Substanzen. Ein zentrales Problem besteht jedoch in zunehmenden Resistenzen gegen pneumokokkenwirksame Antibiotika wie Penicilline, Makrolide,

Cephalosporine und Fluorchinolone. Sogar gegen Vancomycin wurde bereits Toleranz beobachtet⁴³. In den 1970er Jahren wurden erste einzelne penicillinresistente Isolate aus Südafrika und Spanien beschrieben. Heute sind weltweit 20-30 % der Pneumokokken gegen 3 oder mehr Antibiotika resistent⁴³. In den USA sind etwa 40 % der *S. pneumoniae*-Isolate penicillinresistent, in Spanien etwa 50 %, in Hongkong 69 %⁴³. Einzelne resistente Klone konnten sich weltweit pandemisch ausbreiten⁴³.

Wenngleich die *in vitro* beobachtete Entwicklung der Resistenzen zweifellos begründeten Anlass zur Sorge gibt und tatsächlich weltweit von Behandlungsversagen berichtet wird, ist die klinische Bedeutung der Resistenzen bis heute schwer einschätzbar. Besonders die Makrolidresistenz ist offenbar von klinischer Bedeutung. Bei schweren Pneumokokkeninfektionen wird in vielen Leitlinien eine Kombinationstherapie von Betalactamantibiotika, Makroliden und ggf. Vancomycin empfohlen⁴³.

1.4.2 Pneumolysin

Pneumolysin kommt in allen klinisch relevanten Pneumokokkenstämmen vor und ist von besonderer Bedeutung für die Pathogenität. Es handelt sich um ein Cholesterol-abhängiges, Poren bildendes Toxin (Zytolysin) der Pneumokokken, dessen zytolytischen Effekten ein relevanter Beitrag zur Entstehung des Lungenversagens und der neuronalen Schädigung zugeschrieben wird. Das 53 kDa große Protein enthält 471 Aminosäuren und 4 Strukturdomänen. Nach Bindung an Cholesterol verursacht Pneumolysin eine Oligomerisierung und die Bildung von Membranporen⁴⁴. Pneumolysin wirkt begünstigend auf die intraalveoläre Replikation von Pneumokokken und die Ausbreitung in das Lungengewebe und den Blutstrom⁴⁵. Darüber hinaus spielt Pneumolysin eine zentrale Rolle für die Immunantwort auf Pneumokokken. Das Toxin wird durch Toll-like Rezeptor 4 erkannt, und es aktiviert zahlreiche Gene teilweise mittels epigenetischer Modifikation, sowie T-Zellen, den klassischen Weg der Komplementkaskade und weitere inflammatorische Signaltransduktionskaskaden. Während Pneumolysin im Krankheitsverlauf schädigend wirken kann, wird zunehmend deutlich, dass die Erkennung des Pneumolysin durch den Wirtsorganismus auch von zentraler Bedeutung für die Immunantwort und die bakterielle Clearance ist^{46;47}.

1.5 Akutes Lungenversagen

Das Akute Lungenversagen (acute lung injury, ALI) und seine extreme Manifestation, das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) sind durch akuten Beginn einer refraktären Hypoxämie, verbunden mit bilateralen radiologischen Infiltraten charakterisiert. Eine durch Herzinsuffizienz bedingte hydrostatische Ursache muss ausgeschlossen sein. Der Quotient aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstofffraktion ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ist beim ALI < 300 und beim ARDS < 200 .

Die Inzidenz des Akuten Lungenversagens liegt ungefähr zwischen 30 und 74 je 100.000 Einwohner^{48;49}. Häufigste Auslöser für ALI und ARDS sind Pneumonie und pneumogene Sepsis, gefolgt von Sepsis anderen Ursprungs. Lungenkontusion, Polytrauma, Massentransfusionen, Fettembolie, Reperfusion, Inhalationstrauma und Magensaftaspiration können ebenfalls ein ALI auslösen⁵⁰.

Das Syndrom verläuft meist progressiv in mehreren Stadien unterschiedlicher klinischer, histopathologischer und radiologischer Manifestation. In der akuten oder exsudativen Phase (Abb. 4 und 5) finden sich diffuse Alveolarschäden mit Schädigung von Endo- und Epithel, zellulärem Influx von Neutrophilen, Makrophagen und Erythrozyten, sowie proteinreicher Ödemflüssigkeit im alveolären Kompartiment und Ausbildung hyaliner Membranen^{51;52}. (Abb. 6 A-B). Häufig tritt eine akute pulmonalvaskuläre Widerstandserhöhung ein⁵³. Während bei manchen Patienten eine restitutio ad integrum erfolgt, wird in zahlreichen Fällen die exsudative Phase von einer fibrosierenden Alveolitis (Abb. 6 C-E) mit persistierender Hypoxämie und weiter abfallender Lungencompliance abgelöst^{51;52}. Eine folgende Obliteration des pulmonalen Kapillarbettes kann eine schwere pulmonale Hypertonie mit konsekutivem Rechtsherzversagen verursachen⁵³. In der Rückbildungsphase ist die Hypoxämie bei steigender Lungencompliance rückläufig und radiologische Veränderungen verschwinden oftmals vollständig.



Abb. 4: Radiologisches Bild der Entwicklung eines ARDS bei Pneumonie innerhalb von 12 Tagen
Quelle: www.mevis-research.de.



Abb. 5: CT während der Akuten Phase des ARDS. Die bilateralen, alveolären Verschattungen sind dichter in den abhängigen, dorsalen Lungenzonen, während die anterioren Lungfelder ausgespart bleiben. Die Pfeile markieren verdickte interlobuläre Septen i.S. eines Lungenödems. Die bilateralen Pleuraergüsse sind typisch^{54;55}
Quelle: Ref.⁵⁶

Die Mortalität des ARDS liegt bei 40-60 %⁵³. Sepsis, hohes Alter, nichtpulmonales Organversagen und chronische Leberinsuffizienz sind negative Prädiktoren zum Zeitpunkt der ALI – Diagnosestellung, während der initiale Oxygenierungsindex keinen Rückschluss auf die Prognose zulässt. Ein Ausbleiben einer Besserung der Lungenfunktion innerhalb der ersten Woche nach Beginn der Behandlung ist jedoch prognostisch ungünstig. Bei den meisten Überlebenden eines ARDS bleiben 6-12 Monate nach der akuten Erkrankung nur asymptomatische Einschränkungen der Lungenfunktion zurück^{57;58}. Dennoch wird bei Überlebenden eine reduzierte Lebensqualität beobachtet^{59;60}.

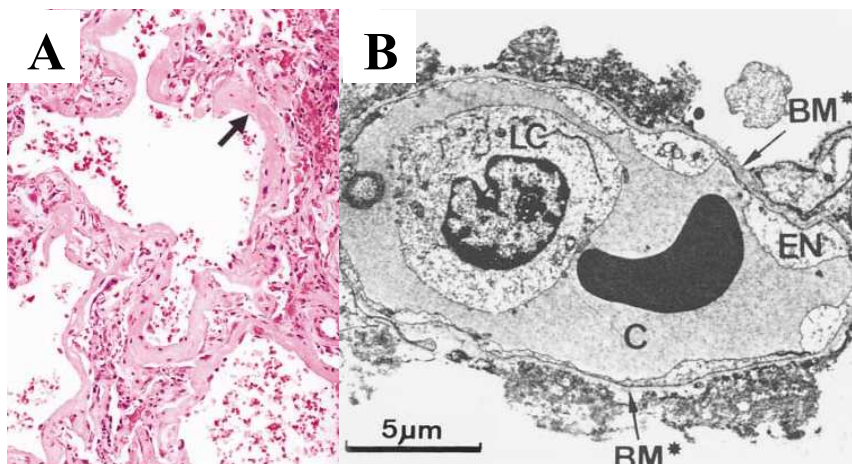


Abb. 6. A+B: Exsudative Phase

A: Lungenbiopsie eines Patienten zwei Tage nach Beginn eines ARDS nach Magensaft-Aspiration. Charakteristische hyaline Membranen (Pfeil), intraalveoläre Erythrozyten und

Neutrophile Granulozyten als Zeichen diffuser Alveolarschädigung. (Haematoxylin und Eosin).

B: Lungengewebe eines Patienten, der vier Tage nach Beginn eines ARDS verstarb. Kapilläres (C) Endothel (EN) und Alveolarepithel sind geschädigt. Vakuolisierung und Schwellung des Endothels, sowie Verlust von Alveolarepithel mit Bildung hyaliner Membranen auf der epithelialen Seite der Basalmembran (BM) fallen auf.

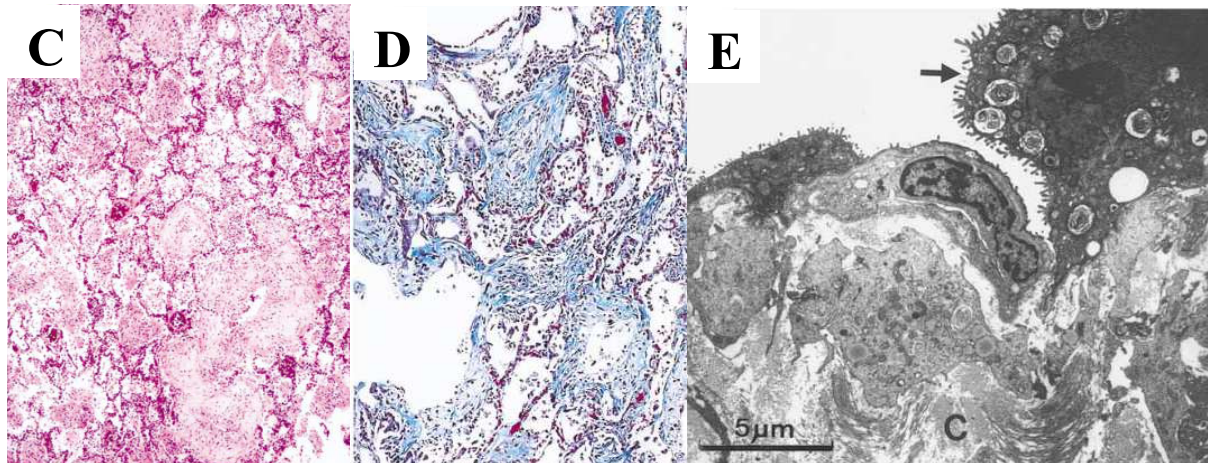


Abb. 6. C-E: Proliferative Phase

C+D: Lungenbiopsie 14 Tage nach Beginn eines ARDS. (C) Granulationsgewebe mit chronischem inflammatorischem Zellinfiltrat (H/E). (D) Trichrom-Färbung zeigt Kollagen-Ablagerungen im Granulationsgewebe passend zur Deposition extrazellulärer Matrix im alveolären Kompartiment.

E: Phase der fibrosierenden Alveolitis mit Reepithelialisierung der epithelialen Barriere mit Alveolarepithel Typ II Zellen. Der Pfeil deutet auf eine Typ II Zelle mit Mikrovilli und Surfactant-gefüllten Lamellarkörperchen. Die daran angrenzende Zelle ist in Umwandlung in eine Typ I Zelle begriffen, mit Verlust von Lamellarkörperchen und Mikrovilli, verdicktem Interstitium und Kollagenablagerung.

1.5.1 Pathophysiologie des Akuten Lungenversagens

Die akute Phase des Akuten Lungenversagens ist durch den Übertritt proteinreicher Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem in das Alveolarlumen gekennzeichnet (Abb. 7). Ursache ist ein Anstieg der Permeabilität der alveolokapillären Barriere, die aus mikrovaskulärem Endothel und Alveolarepithel besteht⁶¹. Das Alveolarepithel besteht zu 90 % aus flachen Typ I Zellen und zu 10 % aus kuboiden Typ II Zellen, die gegenüber Schädigung resistenter sind als Typ I Zellen und deren Funktionen Surfactantproduktion, Ionentransport und Differenzierung in Typ I Zellen beinhaltet. Unter physiologischen Bedingungen ist die epitheliale Barriere deutlich weniger permeabel, als die endotheliale Barriere⁶².

Epitheliale Schädigung führt daher zu Alveolarödem, und außerdem wird die Möglichkeit, Flüssigkeit aus dem Alveolarraum zu transportieren eingeschränkt. Ferner ist die Surfactantproduktion reduziert⁶³, bakterielle Translokation tritt gehäuft auf⁶⁴, und epitheliale Reparaturvorgänge können zu Fibrose führen⁶⁵.

Histologische Studien zeigten eine Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Frühphase des ALI, und neutrophilen Granulozyten wird eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des Akuten Lungenversagens beigemessen^{52;66}. Allerdings kann ein ARDS auch bei Neutropenie entstehen⁶⁷. Die tatsächliche Bedeutung der neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung des ARDS ist nicht abschliessend geklärt.

Eine besondere Rolle spielt offenbar die Dysbalance pro- und antiinflammatorischer Zytokine, die lokal von inflammatorischen Zellen, Epithelzellen oder Fibroblasten gebildet werden.

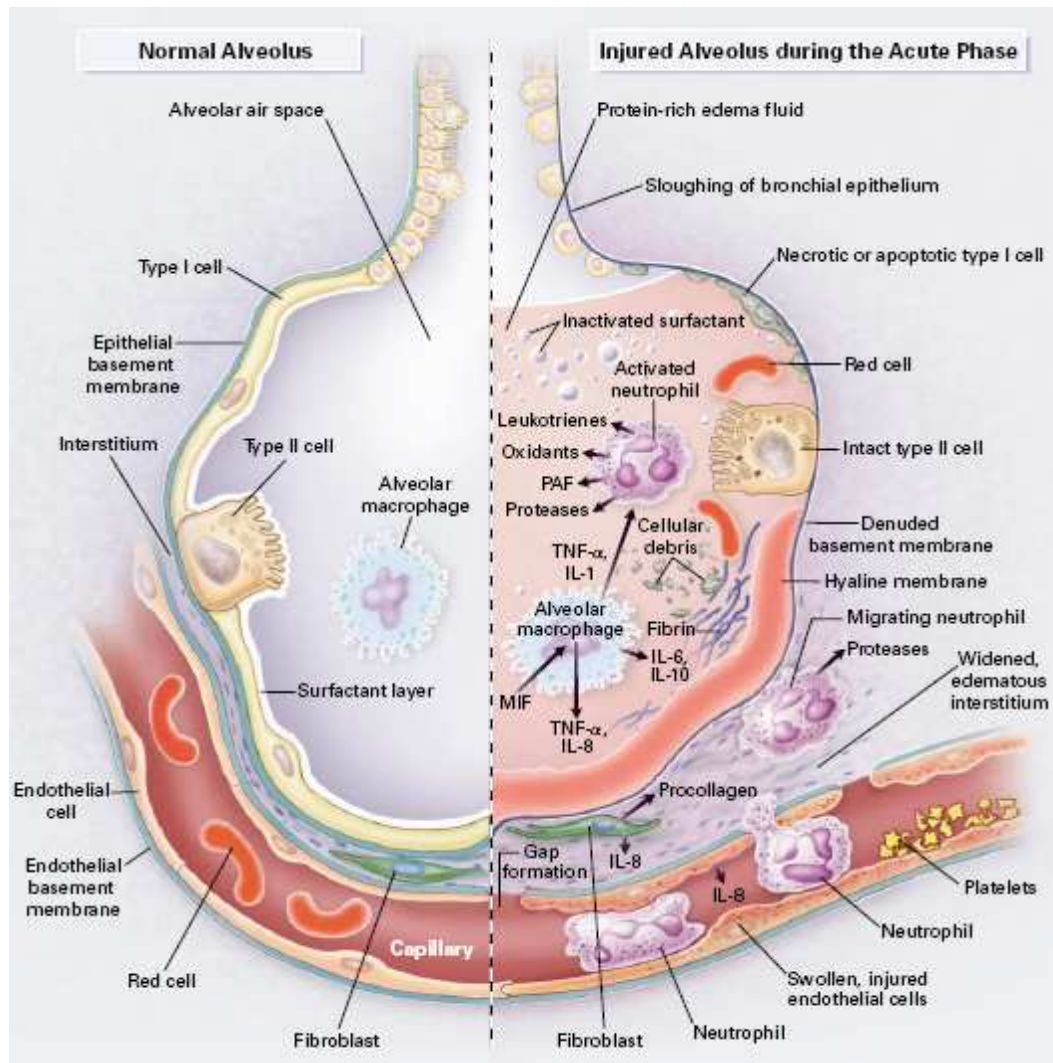


Abb. 7: Normaler Alveolus (links) und Alveolus in der Akuten Phase des ALI und ARDS (rechts). In der akuten Phase kommt es zu Abstossung bronchialer und alveolärer Epithelzellen mit Ausbildung proteinreicher, hyaliner Membranen auf der denudierten Basalmembran. Neutrophile Granulozyten adhäreren am Kapillarendothel und wandern durch das Interstitium in den Alveolarraum, der mit proteinreicher Ödemflüssigkeit gefüllt ist. In der Alveole sezernieren Makrophagen Zytokine (IL-1, -6, -8, -10, TNF α u.a.), die lokal Chemotaxis stimulieren und Neutrophile aktivieren. Interleukin-1 kann ferner die Produktion extrazellulärer Matrix durch Fibroblasten stimulieren. Neutrophile können Oxidantien, Proteasen, Leukotriene und andere proinflammatorische Moleküle, wie Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) freisetzen. Auch antiinflammatorische Mediatoren sind im alveolären Milieu vorhanden, wie Interleukin-1-Rezeptor Antagonist, löslicher Tumornekrosefaktor Rezeptor, Autoantikörper gegen Interleukin-8, und Zytokine wie Interleukin-10 und 11. Quelle: Ref. ⁵³.

1.5.2 Therapie bei Akutem Lungenversagen

Eine zentrale Säule der Behandlung von Patienten mit Akutem Lungenversagen stellt neben der Sauerstoffgabe die Beatmungstherapie dar. Jedoch kann Überdruckbeatmung *per se* beatmungsassoziierten Lungenschaden hervorrufen. Hinsichtlich der Behandlung bei Akutem Lungenversagen war die Beobachtung einer großen, multizentrischen, randomisierten und kontrollierten Studie bedeutend, dass die Reduktion des Tidalvolumens auf 6 ml/kg Körpergewicht im Vergleich zur Beatmung mit 12 ml/kg Körpergewicht zur Reduktion der Mortalität bei ALI und ARDS von 40 % auf 31 % führte⁶⁸. Die Anwendung eines höheren oder niedrigeren endexpiratorischen Druckes führte hingegen zu keinem Unterschied⁶⁹.

Aufgrund der mikrovaskulären Schrankenstörung kommt es bei ALI und ARDS zum Lungenödem. Daher könnte theoretisch eine restriktive Flüssigkeitszufuhr mit entsprechend niedrigerem hydrostatischem Druck im pulmonalen Gefäßbett die Schwere des Lungenödems reduzieren, und diese Theorie wurde im Tierversuch belegt⁷⁰. Ferner ist vermehrtes extravaskuläres Lungenwasser bei ARDS mit erhöhter Mortalität assoziiert⁷¹ und ein niedrigerer Wedge Druck mit besserem Überleben⁷². Andererseits führt restriktive Flüssigkeitszufuhr unter Umständen zu verminderter Organperfusion. In einer großen multizentrischen Studie des „Acute Respiratory Distress Syndrome Network“ wurden Patienten mit ALI entweder einer „konservativen“ Flüssigkeits-Management Strategie zugeführt (keine Nettoflüssigkeitszunahme während der ersten 7 Tage), oder einer „liberalen“ (ca. 1l Positivbilanz / d)⁷³. Tatsächlich hatten Patienten mit „konservativer“ Flüssigkeitszufuhr mehr beatmungsfreie Tage, einen kürzeren intensivstationären Aufenthalt und eine um 2,9 % gebesserte 60-Tage Überlebensrate (nicht signifikant). Allerdings wurden Patienten mit Schock, Katecholamintherapie oder Dialyse nicht in die Studie eingeschlossen.

Seit vielen Jahren wird in der intensivmedizinischen Literatur die Debatte geführt, ob kristalloide oder kolloidale Lösungen bei kritisch kranken Patienten mit ALI eingesetzt werden sollten. Kleinere Studien und Metaanalysen erbrachten keine klare Aussage^{74;75}. Eine 7000 Patienten einschließende, randomisierte und kontrollierte Studie zeigte, dass Albumin gegenüber isotonen Lösungen keinen Benefit bringt⁷⁶. Allerdings verbesserte eine Kombination aus Albumin und Furosemid bei Patienten mit Hypoproteinämie und ALI Oxygenierung und Hämodynamik im Vergleich zu Plazebo⁷⁷ oder Furosemid-Monotherapie⁷⁸. Weitere Studien mit größeren

Patientenzahlen sind nötig, um Aussagen über einen möglichen Überlebensvorteil in dieser speziellen Patientengruppe treffen zu können.

Isovoläme Hämofiltration bewirkt eine Reduktion zirkulierender proinflammatorischer Mediatoren und hatte einen positiven Einfluss auf den Verlauf des ALI in verschiedenen Tiermodellen. Erste klinische Studien erbrachten diesbezüglich keine eindeutigen Ergebnisse, und weitere werden aktuell durchgeführt⁷⁹.

Zahlreiche pharmakologische Therapieansätze wurden in den vergangenen Jahren bei ALI geprüft.

Mehrere Studien belegen, dass eine Therapie mit exogenem Surfactant bei adulten Patienten mit ALI keinen Überlebensvorteil hervorruft⁸⁰⁻⁸². Bei pädiatrischen Patienten mit ALI hingegen verbesserte exogenes Surfactant Oxygenierung und Überleben⁸³.

Die inhalative Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) führt selektiv zu pulmonaler Vasodilatation und dadurch zur Reduktion des Ventilations-Perfusions-Mismatch. Während NO bei ALI akut die Oxygenierung und die Hämodynamik verbessert⁸⁴⁻⁸⁶, hält dieser Effekt meist nur 1-2 Tage an und hat keinen Einfluss auf die Mortalität. NO wird daher nur als „Rescue-Therapie“ bei besonders schwer zu oxygenierenden Patienten eingesetzt.

Ein präventiver oder therapeutischer Einsatz von Corticosteroiden könnte aufgrund der antiinflammatorischen und antifibrotischen Eigenschaften von Nutzen sein. Zahlreiche klinische Studien belegten jedoch einen fehlenden Einfluss auf die Mortalität⁸⁷⁻⁹⁰.

Aktiviertes Protein C (APC) reduziert die Mortalität bei Patienten mit schwerer Sepsis⁹¹. Gestörte Koagulation und Fibrinolyse spielen auch in der Pathogenese des Akuten Lungenversagens eine Rolle^{92;93}, und ALI-Patienten mit niedrigem APC – Spiegel haben eine schlechtere Prognose⁹⁴. Ferner reduziert APC die pulmonale Inflammation bei Gesunden nach Endotoxin-Exposition^{95;96}. Eine klinische Phase II Studie konnte allerdings keinen positiven Einfluss von APC auf die Parameter „beatmungsfreie Tage“ oder „60-Tage-Mortalität“ bei akutem Lungenversagen feststellen⁹⁷. Ausschlusskriterien waren bei dieser Studie u.a. das Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines APACHE II Wertes von größer als 25.

Zusammenfassend beeinflussen eine Beatmung mit niedrigem Tidalvolumen und eine „konservative“ Flüssigkeitszufuhr den Verlauf des ALI positiv, während für

alle anderen, in großen klinischen Studien untersuchten Therapiestrategien bisher kein Nutzen demonstriert werden konnte.

1.5.3 Experimentelle Therapieansätze bei Akutem Lungenversagen

Da aktuell keine pharmakologischen Therapiemöglichkeiten bei ALI zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung und Prüfung innovativer Therapiestrategien von besonderer Bedeutung. Aktuell werden folgende experimentelle Ansätze einer klinischen Prüfung unterzogen.

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ist für die Entwicklung und Homöostase von Alveolarmakrophagen von Bedeutung und reduziert Apoptose des Alveolarepithels. Im Tiermodell⁹⁸ und bei 10 Patienten mit ALI⁹⁹ verbesserte GM-CSF die Oxygenierung, und aktuell wird eine randomisierte, kontrollierte klinische Studie zur Evaluierung der Therapie mit GM-CSF hinsichtlich Oxygenierung und Mortalität bei ALI durchgeführt, deren Ergebnisse voraussichtlich gegen Ende des Jahres 2009 vorliegen werden.

Die Reduktion der alveolären Flüssigkeit stellt einen wesentlichen Bestandteil der Restitution bei ALI dar. Beta-Agonisten steigern den Flüssigkeitsübertritt aus dem alveolären Kompartiment^{100;101} und reduzieren darüber hinaus die pulmonale Inflammation nach Inhalation von Lipopolysaccharid beim Menschen¹⁰². Eine kleine, randomisierte, kontrollierte Studie demonstrierte den Rückgang extravaskulären Lungenwassers durch intravenöse Therapie mit Albuterol¹⁰³ und stellt die Grundlage zur Durchführung einer multizentrischen randomisierten und kontrollierten Studie zur Wirksamkeit aerosolierter Betaagonisten bei Patienten mit ALI und ARDS dar, deren Ergebnisse für das Jahr 2011 erwartet werden.

2 ERGEBNISSE

2.1 Prävention der Pneumokokkenpneumonie

2.1.1 Immunstimulation mit Makrophagen-aktivierendem Lipopeptid-2 erhöht das Überleben bei der Pneumokokkenpneumonie der Maus

Immunostimulation with Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Increased Survival in Murine Pneumonia .

Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzernath M. *Am J Resp Cell Mol Biol.* Vol 40. pp 474–481, 2009

Die Pathogenerkennung und eine adäquate Immunantwort spielen eine bedeutende Rolle für den Pneumonieverlauf. Beeinträchtigungen der angeborenen pulmonalen Immunabwehr begünstigen die Entstehung einer Pneumonie. Pneumokokken werden durch Toll-like receptor (TLR)-2 erkannt. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss der pulmonalen TLR-2-vermittelten Immunstimulation durch MALP-2 auf den Verlauf der schweren Pneumokokkenpneumonie der Maus untersucht.

Die intratracheale Applikation von MALP-2 bewirkte eine Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, TNF- α , IL-10, CCL5, KC, MCP-1) und die Rekrutierung von Leukozyten in den Alveolarraum von nicht infizierten Wildtyptieren, nicht jedoch von TLR-2-defizienten Tieren. MALP-2-behandelte, infizierte Tiere zeigten im Vergleich zu unbehandelten und infizierten Tieren dosisabhängig eine erhöhte Überlebensrate, mildere Hypothermie und geringere Körpergewichtsverluste, sowie weniger Bakteriämie. Interessanterweise steigerte MALP-2 die Expression von TLR-2 auf mRNA- und Proteinebene sowohl in der Mauslunge, als auch in humanen Epithelzellen in vitro. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren fanden sich bei MALP-2 vorbehandelten Tieren nach der Infektion mit *S. pneumoniae* mehr CCL5, weniger antiinflammatorisches IL-10 und mehr Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage.

Zusammengefasst deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 vor Infektion mit *S. pneumoniae* durch Optimierung der lokalen Immunabwehr die Überlebensrate bei Pneumokokkenpneumonie in der Maus erhöhte.

2.2 Akutes Lungenversagen bei Pneumokokkenpneumonie

2.2.1 Die Bedeutung des Pneumolysin für die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia

Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. *Crit Care Med.* 2006 Jul;34(7):1947-54.

Das Akute Lungenversagen stellt eine relevante Komplikation der schweren Pneumokokkenpneumonie dar. In einem Mausmodell beobachteten wir einen frühen Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität nach pulmonaler Pneumokokkeninfektion und vermuteten, dass der wichtige Virulenzfaktor Pneumolysin ursächlich daran beteiligt ist.

In einer experimentellen, kontrollierten in vivo, ex vivo und in vitro Studie wurden 8-12 Wochen alte, weibliche Mäuse untersucht. Ventilierte und blutfrei perfundierte Mauslungen wurden mit rekombinantem Pneumolysin über die Atemwege und über das Gefäßbett stimuliert. Ferner untersuchten wir den Einfluss von Pneumolysin auf den elektrischen Widerstand und die hydraulische Konduktivität von Monolayern humaner, umbilikalvenöser Endothelzellen (HUVEC) und Alveolarepithelzellen (A549).

Aerosolisiertes Pneumolysin erhöhte dosisabhängig die kapilläre Permeabilität und führte zur Ausbildung eines schweren Lungenödems, erhöhte jedoch nicht den pulmonalvaskulären Widerstand. Intravaskuläres Pneumolysin verursachte einen eindrucksvollen dosisabhängigen Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes und der mikrovaskulären Permeabilität der Lunge. Immunhistochemisch wurde Pneumolysin hauptsächlich in Endothelzellen pulmonalarterieller Gefäße detektiert, die gleichzeitig eine deutliche Vasokonstriktion zeigten. Darüber hinaus erhöhte Pneumolysin die Permeabilität von HUVEC und A549 Monolayern. Interessanterweise zeigten Immunfluoreszenzuntersuchungen an Endothelzellen, dass subzytolytische Mengen Pneumolysin die Bildung interzellulärer Poren und intrazellulärer Stressfasern verursacht.

Wir schlussfolgern, dass Pneumolysin eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Akuten Lungenversagens im Rahmen der schweren Pneumokokkenpneumonie spielen könnte, indem es eine Störung der mikrovaskulären Barrierefunktion, sowie schwere pulmonale Hypertonie auslöst.

2.2.2 Die Rolle des Plättchen-aktivierenden Faktors bei Pneumolysin- induziertem Akuten Lungenversagen

Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. Witzenrath M, Gutbier B, Owen JS, Schmeck B, Mitchell TJ, Mayer K, Thomas MJ, Ishii S, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. *Crit Care Med.* 2007; Jul. 35(7):1756-62.

Das akute Lungenversagen stellt eine der wesentlichen Komplikationen der schweren Pneumokokkenpneumonie dar und ist durch Beeinträchtigung der mikrovaskulären Barrierefunktion und pulmonale Hypertonie charakterisiert. Beides kann durch den für *Streptococcus pneumoniae* wichtigen Pathogenitätsfaktor Pneumolysin (PLY) hervorgerufen werden. Wir vermuteten, dass Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und assoziierte Signaltransduktionswege eine Rolle bei der PLY-induzierten Entwicklung des akuten Lungenversagens spielen.

Ventilierte und blutfrei perfundierte Lungen von Wildtyp- und PAF-Rezeptor defizienten Mäusen wurden mit rekombinantem PLY stimuliert. Der pulmonalarterielle Druck wurde kontinuierlich aufgezeichnet und mikrovaskuläres „leakage“ gemessen. PAF wurde in Lungenhomogenat mittels HPLC und Tandem-Massenspektrometrie quantifiziert.

Intravaskuläres PLY, jedoch nicht das Pneumolysoid Pd-B, verursachte einen ausgeprägten dosisabhängigen Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes und des PAF-Gehaltes in Lungen. Die Druckantwort war in Lungen PAF-Rezeptor defizienter Mäuse, sowie nach PAF-Rezeptor Blockade mit BN50730 reduziert. Sowohl PLY, als auch exogenes PAF steigerten den Thromboxan B2-Gehalt des Lungeneffluates, und Thromboxanrezeptor-Inhibition reduzierte die PLY-induzierte Druckantwort. Die Hemmung einzelner Signaltransduktionsschritte deutete auf einen wesentlichen Beitrag der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PC-PLC) und der Proteinkinase C (PKC), sowie des Rho/Rho-kinase Weges zur PLY-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion hin. Unabhängig von der pulmonalarteriellen Druckantwort war außerdem die durch PLY hervorgerufene mikrovaskuläre Schrankenstörung in Lungen PAF-Rezeptor defizienter Mäuse vermindert.

Die Daten demonstrieren, dass PAF eine wesentliche Bedeutung für die PLY-induzierte Schädigung der Mauslunge hat. Die Signaltransduktion der PAF-vermittelten Druckantwort auf PLY erfolgt über Thromboxan, sowie PC-PLC, PKC und Rho-kinase.

2.2.3 Angiopoietin sensibilisiert Endothelzellen für TNF- α und spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Inflammation

Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation.

Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzenrath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):235-9.

Die Angiopoietine Ang-1 und Ang-2 wurden als Liganden der Rezeptor Tyrosinkinase Tie-2 identifiziert. Parakrine Ang-1- vermittelte Aktivierung von Tie-2 reguliert die Gefäßreifung und reduziert vaskuläre Aktivität. Im Gegensatz dazu wirkt der antagonistische Ligand Ang-2 durch einen autokrinen Mechanismus und wird in endothelialen Weibel-Palade Körperchen gespeichert, von wo aus Ang-2 nach Stimulation rasch freigesetzt werden kann. Die rasche Freisetzung von Ang-2 impliziert Funktionen des Ang- Tie Systems jenseits seiner bekannten Rolle in der vaskulären Morphogenese als Regulator schneller vaskulärer Antworten.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass Ang-2 defiziente Mäuse (codiert durch das Gen *Angpt2*) in Thioglycollat- induzierter oder *Staphylococcus aureus*- induzierter Peritonitis, oder im Modell der dorsalen Hautfaltenkammer keine inflammatorische Antwort auslösen können. Rekombinantes Ang-2 stellt die Fähigkeit zur Inflammation in *Angpt2*^(-/-) Mäusen wieder her. Intravitale Mikroskopie zeigte normales TNF- α -induziertes Leukozyten-“rolling” in Gefäßen von *Angpt2*^(-/-) Mäusen, aber die rollenden Zellen adhärten nicht am aktivierten Endothel. Zellexperimente zeigten, dass Ang-2 die Adhäsion durch Sensibilisierung des Endothels gegenüber TNF- α und Modulation TNF- α - induzierter Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen hervorruft. Zusammengefasst identifizierten diese Ergebnisse Ang-2 als einen autokrinen Regulator endothelialer Inflammation. Ang-2 agiert als Schalter für die vaskuläre Empfindlichkeit und ruft Permissivität gegenüber proinflammatorischen Zytokinen hervor.

2.2.4 Tumornekrosefaktor- α abhängige Expression der Phosphodiesterase 2: Rolle bei endothelialer Permeabilität

Tumor necrosis factor- α -dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability

Seybold J, Thomas D, Witzernath M, Boral S, Hocke AC, Bürger A, Hatzelmann A, Tenor H, Schudt C, Krüll M, Schütte H, Hippenstiel S, Suttorp N. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3569-76.

Bei Sepsis erhöhen Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Thrombin die endotheliale Permeabilität. Die Bedeutung intrazellulärer zyklischer Nukleotide für die Erhaltung der endothelialen Barrierefunktion wurde durch zahlreiche Studien belegt. Die Aktivität von Zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) und Zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) wird durch spezielle Phosphodiesterasen (PDEs) terminiert. In der aktuellen Studie wurde die Hypothese geprüft, dass TNF- α PDE-Aktivität in Endothelzellen reguliert und so die endotheliale Barrierefunktion stört. In humanen umbilikalvenösen Endothelzellen (HUVECs) beobachteten wir einen dramatischen Anstieg der PDE2 Aktivität nach Stimulation mit TNF- α , während die Aktivität der PDE3 und PDE4 unverändert war. Abgesehen von PDE2-, 3- und 4-Aktivität wurde keine signifikante PDE-Aktivität detektiert. Die Erhöhung der PDE2-Expression durch TNF- α war abhängig von der p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK).

Die endotheliale Barrierefunktion wurde in HUVECs und in isoliert perfundierten Mauslungen untersucht. Eine selektive Erhöhung der PDE2-Expression sensibilisierte HUVECs gegenüber Thrombin und führte zu verstärktem Permeabilitätsanstieg. In isolierten Mauslungen zeigten wir, dass PDE2-Inhibition die Entstehung eines Thrombin-induzierten Lungenödems durch Reduktion der Permeabilität verhindern kann.

Unsere Beobachtungen deuten darauf hin, dass die TNF- α -vermittelte Erhöhung der PDE2-Expression und -Aktivität die endotheliale Barriere bei Sepsis destabilisieren kann. Die Hemmung der PDE2 könnte daher bei Sepsis und Akutem Lungenversagen therapeutisches Potential haben.

2.2.5 Die Inhibition der Phosphodiesterase 2 vermindert das Akute Lungenversagen bei muriner Pneumokokkenpneumonie

Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia

Witzenrath M, Gutbier B, Schmeck B, Tenor H, Seybold J, Kuelzer R, Grentzmann G, Hatzelmann A, van Laak V, Tschernig T, Mitchell TJ, Schudt C, Rosseau S, Suttorp N, Schütte H. *Crit Care Med.* 2009 Feb;37(2):584-90

Die schwere Pneumokokkenpneumonie führt häufig zu Lungenversagen. Sowohl Pathogenitätsfaktoren des Erregers, als auch eine unkontrollierte Wirtsantwort können durch Störung der mikrovaskulären Barriere zur Entstehung des Akuten Lungenversagens beitragen. Die Rolle der Phosphodiesterase 2 (PDE2) bei Pneumonie-induzierter mikrovaskulärer Hyperpermeabilität wurde in einer kontrollierten experimentellen Studie untersucht, die in vivo, ex vivo und in vitro durchgeführt wurde. Humane umbilikalvenöse Endothelzellen (HUVECs) und isolierte Mauslungen wurden mit dem Pneumokokken-Exotoxin Pneumolysin in An- oder Abwesenheit des selektiven PDE2 Inhibitors 9-(6-phenyl-2-oxohex-3-yl)-2-(3,4-dimethoxybenzyl)-purin-6one (PDP) oder hydroxy-PDP stimuliert. In vitro wurde der transzelluläre elektrische Widerstand und ex vivo der Übertritt von humanem Serumalbumin aus dem Gefäßbett in das alveoläre Kompartiment in der bronchoalveolären Lavage gemessen. Außerdem induzierten wir in Mäusen eine Pneumokokkenpneumonie und behandelten kontinuierlich mit hydroxy-PDP über subkutane osmotische Pumpen. Der Übertritt von humanem Serumalbumin in die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wurde 48 Stunden nach transnasaler Infektion quantifiziert, und Lungenproben wurden mittels TaqMan Polymerasekettenreaktion und Western Blot hinsichtlich PDE2-Gen- und Proteinexpression untersucht.

In isoliert perfundierten Mauslungen und HUVECs reduzierte die selektive Inhibition der PDE2 deutlich die Pneumolysin-induzierte Hyperpermeabilität. Ferner war die pulmonale PDE2-mRNA und -proteinexpression in der murinen Pneumokokkenpneumonie signifikant erhöht, und Pneumonie-induzierte vaskuläre Permeabilität wurde durch PDE2-Inhibition deutlich vermindert.

Zusammengefasst verbesserte PDE2-Inhibition die mikrovaskuläre Barrierefunktion bei Pneumokokkenpneumonie, und die pulmonale Erhöhung der PDE2-Expression bei Pneumokokkenpneumonie könnte relevante Bedeutung haben. Selektive PDE2-Inhibitoren könnten daher einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz bei schwerer Pneumokokkenpneumonie bieten.

2.3 Antimikrobielle Therapie der Pneumokokkenpneumonie

2.3.1 Systemische Gabe des Endolysin Cpl-1 rettet Mäuse mit tödlicher Pneumokokkenpneumonie

Systemic Use of the Endolysin Cpl-1 Rescues Mice with Fatal Pneumococcal Pneumonia.

Witzenrath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller HC, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S. *Crit Care Med.* 2009 Feb;37(2):642-49.

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP) ist eine häufige Infektionskrankheit und hat eine hohe Morbidität und Mortalität. *S. pneumoniae* ist der häufigste Erreger der CAP und Pneumokokken sind zunehmend resistent gegenüber zahlreichen Antibiotika. Das kürzlich isolierte und aufgereinigte Bakteriophagenenzym Cpl-1 lysiert Pneumokokken schnell und spezifisch. In der aktuellen Studie sollte das therapeutische Potenzial von Cpl-1 bei schwerer Pneumokokkenpneumonie untersucht werden.

C57/Bl6 Mäuse wurden transnasal mit Pneumokokken infiziert und mittels intraperitonealer Injektionen von Cpl-1 therapiert. Die Therapie begann 24 h nach Infektion und weitere 5 Injektionen erfolgten im Abstand von jeweils 12 h. Gemessen an klinischem Erscheinungsbild, Gewichtsverlust, Dyspnoe, Reduktion von Lungencompliance und paO_2/FiO_2 -ratio, sowie morphologischen Veränderungen der Lungen, waren die Mäuse zu Beginn der Therapie an einer schweren Pneumonie erkrankt. Wenn die Therapie 24 h nach Infektion begonnen wurde, überlebten 100% der Cpl-1 behandelten und 86% der Amoxicillin behandelten Tiere die tödliche Pneumonie und zeigten eine rasche Genesung. Wenn die Therapie 48 h nach der Infektion begonnen wurde, hatten die Mäuse bereits eine Bakteriämie, und 3/7 (42%) der Cpl-1 behandelten und 5/7 (71%) der Amoxicillin behandelten Tiere überlebten. Cpl-1 reduzierte deutlich die pulmonale Bakterienlast und verhinderte die Ausbildung von Bakteriämie, systemischer Hypotonie und Laktatanstieg, wenn die Therapie 24 h nach Infektion begonnen wurde.

Die antimikrobielle Wirksamkeit des Cpl-1 war in vivo mit der von Amoxicillin bei Penicillin-empfindlichen Pneumokokken vergleichbar. Die inflammatorische Reaktion war in Cpl-1 und in Amoxicillin behandelten Mäusen geringer als in unbehandelten. In humanen Epithelzellkulturen verursachten lysierte Pneumokokken deutlich weniger Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Zelltod, als lebende. Das lytische Bakteriophagenenzym Cpl-1 könnte daher eine neue Perspektive für die Behandlung der Pneumokokkenpneumonie bieten.

3 DISKUSSION

Die Entstehung und der Verlauf einer Pneumonie werden vielfältig beeinflusst. Menschen mit geschwächter pulmonaler Immunabwehr haben ein erhöhtes Risiko, an einer Pneumonie zu erkranken, einschließlich beatmete Patienten¹⁰⁴, Patienten mit schweren viralen Lungeninfektionen^{105;106} oder Sepsis-assoziiertes Immunparalyse^{105;107}. Für den Verlauf der Pneumonie ist der Einsatz eines wirksamen Antibiotikums von wesentlicher Bedeutung, und die Entwicklung bakterieller Resistenzen gegenüber Antibiotika erschwert zunehmend die Therapie. Bei ungünstigem Verlauf der Pneumonie kann trotz des Einsatzes von Antibiotika ein akutes Lungenversagen entstehen und aktuell ist keine Interventionsmöglichkeit etabliert, die den Progress zum Akuten Lungenversagen verhindert.

Die vorliegenden experimentellen Arbeiten untersuchten pathophysiologische Zusammenhänge, sowie mögliche präventive und therapeutische Strategien bei Pneumokokkenpneumonie. Ziel der Untersuchungen war es, Grundlagen für die Entwicklung neuer Interventionsmöglichkeiten bei Pneumonie und Pneumonie-assoziiertem akutem Lungenversagen zu schaffen, die nach Möglichkeit eine Perspektive zur Reduktion der Mortalität eröffnen sollen.

Die Mortalität der bakteriämischen Pneumonie lag in der präantibiotischen Ära bei ca. 50% und sank nach Einführung der Antibiotikatherapie auf ca. 10%³⁵. Auch heute versterben noch ca. 10-14% der hospitalisierten Pneumoniepatienten trotz wirksamer antibiotischer Therapie, und insbesondere die häufige Pneumokokkenpneumonie verläuft oft sehr schwer¹⁰⁸. Eine diskordante antibiotische Therapie erhöht die Mortalität der Pneumonie zwar deutlich¹⁰⁹, und eine Verzögerung der ersten Antibiotika-Gabe nach Diagnosestellung hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Mortalität¹¹⁰. Jedoch sind diese Faktoren im klinischen Alltag nicht allein verantwortlich für die weiterhin hohe Mortalität der Pneumonie¹¹¹, und insbesondere Patienten mit schwerer Pneumonie könnten von einer Therapie zusätzlich zur antibiotischen Therapie profitieren¹¹². Da gezeigt werden konnte, dass eine inadäquate Interaktion zwischen Wirt und Pathogen entscheidend die Entstehung des akuten Lungenversagens und die Mortalität der Pneumonie beeinflusst¹¹¹, kommt dem Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion bei Pneumonie in Hinblick auf die Entwicklung neuer Interventionsstrategien eine besondere Bedeutung zu.

Für die vorliegenden Arbeiten wurde ein Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie etabliert. Nach intranasaler Applikation von *S. pneumoniae* entwickeln die Mäuse

klinische Symptome der schweren Pneumonie, einschließlich Dyspnoe, Hypothermie, Abnahme des Körpergewichtes. Im Lungenparenchym können *S. pneumoniae* und kolokalisierte neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Die Infektion führt zur Störung der mikrovaskulären Schrankenfunktion der Lunge und zum Lungenödem mit Abfall der Lungencompliance, des Oxygenierungsindex und der peripheren Sauerstoffsättigung des Blutes. Im weiteren Verlauf resultiert eine Bakteriämie und nachfolgend eine Sepsis mit Anstieg des Laktatspiegels im Serum und Abfall des systemischen Blutdruckes. In Abhängigkeit von der Infektionsdosis überleben die Mäuse die Erkrankung oder versterben nach ca. 60 – 120 Stunden.

Als weiteres Modell mit zentraler Bedeutung für die vorliegende Arbeit wurde die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge eingesetzt. Das Organ wird unabhängig von humoralen, zentralnervösen oder metabolischen Einflüssen blutfrei mit sterilem Medium perfundiert und in einer Kammer mit Unterdruck ventiliert. Für die aktuellen Fragestellungen wurde ein Modell der Pneumolysin-induzierten Lungenschädigung etabliert.

3.1 Prävention der Pneumokokkenpneumonie

Wenn Bakterien in den Respirationstrakt eindringen, werden molekulare Merkmale auf ihrer Oberfläche von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Eine Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) auf der Zelloberfläche und in Endosomen, sowie der zytosolischen Nucleotide Oligomerization Domain (NOD) – like Rezeptoren (NLR) führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung des Immunsystems. TLR-2 erkennt mikrobielle Bestandteile wie Peptidoglykan und Lipoteichonsäure Gram-positiver Bakterien, sowie Lipopeptide diverser Pathogene¹¹³. Bei Pneumokokkeninfektionen spielt TLR-2 eine besondere Rolle für die Induktion der Immunantwort^{114;115}, und *S. pneumoniae* erhöht die TLR-2 Expression in vitro⁷ und in vivo¹¹⁴. Eine Aktivierung des Immunsystems vor bakterieller Exposition kann einen positiven Einfluss auf den Verlauf der nachfolgenden Erkrankung haben¹⁰⁷. In der vorliegenden Arbeit (s. 2.2.1) wurde daher eine lokale Stimulation des pulmonalen Immunsystems mit dem TLR-2 Liganden Malp-2 in der Maus durchgeführt. Die Immunantwort und der Erkrankungsverlauf der nachfolgend induzierten Pneumonie waren verbessert, und die Mortalität reduziert. Da die TLR-2 Aktivierung auch zum Einstrom neutrophiler Granulozyten führte, liegt die Vermutung nahe, dass diese eingewanderten Zellen eine zusätzliche Schädigung der mikrovaskulären Schranke verursachen könnten. Hierfür gaben die aktuelle Untersuchung und die Literatur jedoch

keinen Anhalt, und interessanterweise führt TLR-2 Aktivierung in der humanen Lunge in vivo zu einem Einstrom von Granulozyten, die nicht aktiviert sind, während beispielsweise TLR-4 Stimulation zum Einstrom aktivierter Granulozyten führt (Prof. T. van der Poll, Academic Medical Center, Amsterdam, unveröffentlicht). Es könnte also sein, dass die nach TLR-2 Stimulation eingewanderten Granulozyten nur lokal bei Konfrontation mit Bakterien aktiviert werden. Hierfür gibt es bisher jedoch keine ausreichende Evidenz. Zukünftige Studien müssen darüber hinaus klären, ob ein klinischer Einsatz des Malp-2 zur Prävention bei Patienten mit besonders hohem Risiko für eine Pneumonie möglich ist. Insbesondere könnte eine längerfristige repetitive inhalative Anwendung der Substanz auch zu Inflammations-assoziierten negativen Effekten führen.

3.2 Entwicklung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

Das individuelle Risiko, bei Pneumonie im weiteren Verlauf trotz adäquater antimikrobieller Therapie ein Akutes Lungenversagen zu entwickeln kann bei der Diagnosestellung mittels CRB-65 bzw. CURB-Index²⁶ oder mittels "pneumonia severity index" (PSI)²⁷ abgeschätzt werden. Die Dauer zwischen der Diagnosestellung „Pneumonie“ und der Ausbildung eines Akuten Lungenversagens beträgt bei ca. 50% der Patienten bis zu 60 Stunden, bei weiteren 45-50% bis zu 120 Stunden (Dr. O. Gajic, Mayo-Clinic, Rochester/USA, unpubliziert). In diesem Zeitraum könnte die Entwicklung eines Akuten Lungenversagens therapeutisch beeinflusst werden. Jedoch steht hierfür bisher keine Therapieoption zur Verfügung. Ferner sind die zum Akuten Lungenversagen führenden Mechanismen nicht ausreichend bekannt, um gezielte Therapieansätze zu entwickeln.

3.2.1 Die Bedeutung des Pneumolysin für die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

Im Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie war eine Schrankenstörung bereits vor dem Einstrom neutrophiler Granulozyten zu beobachten. Dieser Befund deutete darauf hin, dass die frühe Schrankenstörung unabhängig vom Einstrom der neutrophilen Granulozyten verursacht wurde, und es lag die Vermutung nahe, dass ursächlich ein Pathogenitätsfaktor der Pneumokokken beteiligt sein könnte. Die bisher bekannten Pathogenitätsfaktoren der Pneumokokken sind teilweise gut charakterisiert^{116;117}. Eine zentrale Rolle bei der Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie wurde bereits in früheren Untersuchungen Pneumolysin

zugeschrieben, da neutralisierende Pneumolysin-spezifische Antikörper die Entwicklung des Lungenversagens verhindern konnten¹¹⁸ und Pneumolysin-defiziente Pneumokokken weniger virulent sind als Wildtyp-Pneumokokken¹¹⁹. Pneumolysin ist ein porenbildendes Toxin, und frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass rekombinantes Pneumolysin Endothel- und Epithelzellen lysieren und Permeabilität induzieren kann^{120;121}. Jedoch waren in diesen Studien größere Mengen des Toxins eingesetzt worden. In den aktuellen Untersuchungen wurden Toxinmengen eingesetzt, die bei Pneumonie lokal in der Lunge vorkommen könnten. Zwar ist die exakte Toxinkonzentration bei der Pneumokokkenpneumonie bisher nicht bekannt. Jedoch konnte aus Daten zu Pneumokokkenzahl und Pneumolysinkonzentration im Liquor bei Meningitis¹²², sowie eigenen Messungen der Freisetzung von Pneumolysin aus Pneumokokken und Quantifizierung der Pneumokokkenzahl bei der Pneumonie im Mausmodell ein ungefährender Konzentrationsbereich für die Pneumonie in der Maus abgeschätzt werden. In diesem Konzentrationsbereich induzierte Pneumolysin in vitro endotheliale und epitheliale Permeabilität, ohne Zytolyse zu verursachen. Darüber hinaus war die Permeabilität endothelialer Monolayer nach Stimulation mit geringen Pneumolysinkonzentrationen rasch regredient, und es konnte eine Degradation des tight junction Proteins VE-Cadherin mit temporärer interzellulärer Porenbildung beobachtet werden. Dies deutete auf regulatorische Vorgänge bei der Permeabilitätsinduktion hin. In isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen führte Pneumolysin zu den zentralen Veränderungen des akuten Lungenversagens, nämlich zu Permeabilitätserhöhung und zum Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes mit Kontraktion von pulmonalen Arterien, an deren Endothel Pneumolysin immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Das Modell der isolierten Lunge bietet die Möglichkeit, das intakte Organ unabhängig von zentralnervösen, humoralen oder metabolischen Einflüssen zu untersuchen. Insbesondere ist eine Rekrutierung von Entzündungszellen nicht möglich. Die Induktion von mikrovaskulärer Schrankenstörung und pulmonalvaskulärer Widerstandserhöhung bedurfte also nicht des Einstroms neutrophiler Granulozyten, was von Maus et al. in vivo bestätigt wurde¹²³.

Wahrscheinlich sind die Mechanismen vielschichtig, über die Pneumolysin zur Entstehung des Akuten Lungenversagens beiträgt. Arbeiten der eigenen und anderer Gruppen deuten auf eine Beteiligung der Erkennung von Pneumolysin durch TLR-4¹²⁴, der Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten^{125;126}, der Bildung von Membranporen⁴⁴ und der Beteiligung zytosolischer Rezeptoren (unpubliziert) hin. Ferner konnte gezeigt

werden, dass die Freisetzung von Plättchen-aktivierendem Faktor eine wichtige Rolle spielt¹²⁷.

Exotoxine verschiedener Pathogene einschließlich *Escherichia coli* Hämolyysin, *Staphylococcus aureus* alpha-toxin und Lipopolysaccharid erhöhen die Synthese von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) in Endothelzellen¹²⁸⁻¹³⁰. PAF ist ein potenter Mediator, der bei zahlreichen inflammatorischen Erkrankungen einschließlich ARDS und Sepsis eine zentrale Rolle einnimmt¹³¹. Der PAF-Rezeptor, über den PAF seine Effekte exklusiv vermittelt, ist in der Lunge exprimiert¹³². Exogenes PAF kann in der Lunge sowohl vaskuläre Hyperpermeabilität, als auch Vasokonstriktion auslösen^{131;133}.

Die aktuellen Untersuchungen konnten zeigen, dass Pneumolysin ebenfalls die PAF-Synthese in der isolierten Lunge steigert, und Pneumolysin verursachte in Lungen PAF-Rezeptor defizienter Mäuse weniger Permeabilität und pulmonale Hypertonie als in Wildtyp-Mäusen. Auch eine pharmakologische Inhibition des PAF-Rezeptors oder nachfolgender Signaltransduktionsschritte reduzierte die Pneumolysin-induzierte Druckantwort, während die pharmakologische Inhibition zahlreicher anderer vasoaktiver Mediatoren einschließlich Angiotensin, Endothelin und Serotonin keine Reduktion des pulmonalarteriellen Druckanstieges verursachte (unpubliziert).

Zusammengefasst deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass PAF eine Schlüsselrolle bei Pneumolysin-induziertem Lungenversagen spielt. Dementsprechend könnte der PAF-Rezeptor einen Angriffspunkt für zukünftige Strategien darstellen, die eine Entwicklung des Akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie verhindern sollen. Obwohl bereits klinische Studien zeigten, dass eine Inhibition des PAF-Rezeptors bei Sepsis keinen Überlebensvorteil bewirkt¹³⁴, könnten weitere Untersuchungen gerechtfertigt sein, die den möglichen Benefit des PAF-Rezeptor Antagonismus bei schwerer Pneumokokkenpneumonie untersuchen. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass der PAF-Rezeptor in der Pneumokokkenpneumonie in vivo eine weitere herausragende Bedeutung hat. Für Pneumokokken stellt er eine wichtige Bindungsstelle dar¹³⁵, und PAF-Rezeptor defiziente Mäuse waren gegenüber einer pulmonalen Pneumokokkeninfektion resistenter, als Wildtyp-Mäuse¹³⁶. Unter inflammatorischen Bedingungen ist der PAF-Rezeptor verstärkt exprimiert¹³⁷. Unter anderem führt die Infektion mit Influenza-Viren im Mausmodell zur Regulation des PAF-Rezeptors und zu erhöhter Suszeptibilität für Pneumokokken¹³⁸, allerdings ist die klinische Bedeutung dieser Beobachtung umstritten^{139;140}.

3.2.2 Angiopoietin-2 beeinflusst endotheliale Inflammation

Das System aus Angiopoietin-1 (Ang-1), Ang-2 und Tie-2 spielt eine wichtige und gut etablierte Rolle bei der Angiogenese¹⁴⁰. Ang-1 wird konstitutiv von Perizyten freigesetzt und bewirkt einen fortwährenden, geringgradigen Agonismus am endothelialen Rezeptor Tie-2, der durch Aktivierung von Signalwegen des Zellüberlebens (PI(3)K - Akt Signalweg) zur Ausreifung und Stabilisierung von Gefäßen führt¹⁴¹. Hingegen wird Ang-2 aus Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen freigesetzt und bewirkt autokrin eine Inhibition des Rezeptors Tie-2¹⁴². Im Zusammenspiel mit VEGF (vascular endothelial growth factor) führt Ang-2 so zu Angiogenese¹⁴². Neben seiner Rolle bei der Angiogenese hat Ang-1 durch Aktivierung von Tie-2 antiinflammatorische Wirkung^{143;144}. Ang-1 kann also als parakriner Schalter des Endothels angesehen werden, der den Übergang von inflammatorischem oder angiogenetischem Endothel zu ruhendem Endothel bewirkt (Abb. 8). Die Rolle des Ang-2 bei Inflammation war bisher nicht bekannt.

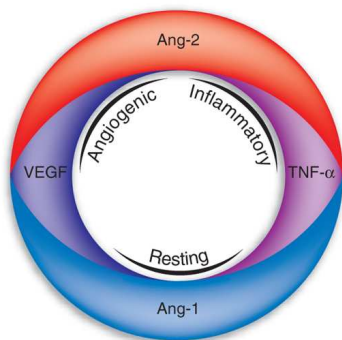


Abb. 8 A

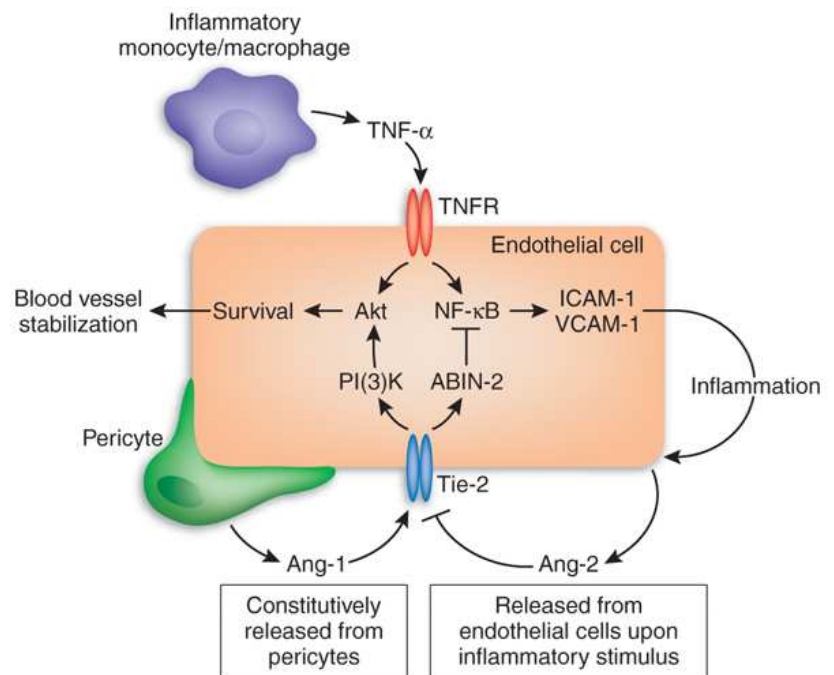


Abb. 8 B

Abb. 8: Schematische Darstellung der Interaktion des Ang1/Ang2-Tie2-Systems mit TNF- α hinsichtlich Inflammation und Angiogenese im Endothel. Quelle:¹⁴²

Die Pathogen-Wirt-Interaktion führt zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, die Endothelzellen aktivieren und Leukozyten anlocken. Nachfolgend rollen Leukozyten zunächst am aktivierten Endothel, dann bleiben sie haften und schließlich

durchwandern sie die Gefäßwand¹⁴⁵. Diese Ereignisse werden unter anderem durch TNF- α gesteuert, das eine Regulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 verursacht, die dann mit leukozytären Integrinen interagieren. Da jedoch in der frühen Phase der Inflammation die lokalen TNF- α Konzentrationen eher gering sind, ist die Existenz von Amplifikationsmechanismen wahrscheinlich.

Die aktuelle Arbeit konnte zeigen, dass Ang-2 Endothelzellen für verschiedene inflammatorische Stimuli sensibilisiert, indem die Leukozytenadhäsion reguliert wird. Während beispielsweise Ang-2 defiziente Mäuse bei Peritonitis weniger Leukozyten rekrutierten als Wildtyp-Mäuse, führte Ang-2 in Gegenwart von niedrigen TNF- α Konzentrationen zur endothelialen Regulation von ICAM-1 und VCAM-1. Suppression von Ang-2 mittels siRNA, sowie exogenes Ang-1 reduzierten wiederum die Expression von ICAM-1.

Bei Pneumokokkenpneumonie zeigten Ang-2 defiziente Mäuse in der aktuellen Arbeit allerdings keine verringerte pulmonale Leukozytenrekrutierung, was der Tatsache geschuldet sein könnte, dass endotheliale Adhäsionsmoleküle postkapillärer Venolen in vielen Organen an der Leukozytenrekrutierung entscheidend beteiligt sind, jedoch nicht in der Lunge¹⁴⁶. Die pulmonale Granulozytenrekrutierung wird maßgeblich durch eine Chemokin-induzierte Verringerung der Verformbarkeit der Granulozyten in den Kapillaren beeinflusst, so dass die Zellen im Gefäßlumen stecken bleiben, bevor sie dem chemotaktischen Reiz folgend die Gefäßwand passieren.

Dennoch beeinflusst Ang-2 möglicherweise die Entstehung des Akuten Lungenversagens bei Sepsis und Pneumonie. Patienten mit Sepsis haben erhöhte Ang-2 Spiegel im Serum, und die Höhe der Spiegel korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung^{147;148}. Eine besonders enge Korrelation besteht zwischen der Höhe des Ang-2 Serumspiegels und dem Auftreten von Akutem Lungenversagen¹⁴⁸. Das Serum von Sepsispatienten induzierte endotheliale Permeabilität *in vitro*¹⁴⁷, wobei die Höhe der Permeabilität mit der Ang-2 Konzentration im Serum korrelierte und Ang-1 den Einfluss des Patientenserums auf die Permeabilität verringerte. Ferner induzierte Ang-2 endotheliale Permeabilität *in vitro* und *in vivo*¹⁴⁷. LPS-induziertes ALI kann durch eine Erhöhung der Ang-1 Expression vermindert werden¹⁴⁹. Darüber hinaus nimmt Ang-2 offenbar eine Schlüsselrolle bei experimentellem, Hyperoxie-induziertem Lungenversagen ein. Bei Pneumonie wurden erhöhte Ang-2 Konzentrationen im Pleuraerguss im Vergleich zu Pleuraergüssen anderer Genese gemessen¹⁵⁰. Die experimentelle Pneumokokkenpneumonie führt in der Maus zu einer Verminderung der

pulmonalen Ang-1 Expression bei erhöhter Ang-2 Expression (unpubliziert) und damit zu einer für den Nettoeffekt entscheidenden Veränderung der Ang-1/Ang-2 Ratio¹⁵¹.

Zusammenfassend könnte also das Ang-1/Ang-2 – Tie-2 System durch inflammatorische Endothelsensibilisierung und Erhöhung der Permeabilität auch bei Pneumonie zur Entstehung des Akuten Lungenversagens beitragen. Zukünftige Studien, die teilweise in unserer Arbeitsgruppe bereits initiiert wurden, könnten zeigen, ob ein auf Ang-2 ausgerichteter therapeutischer Ansatz bei Pneumonie von Nutzen ist.

3.2.3 Die Rolle der Phosphodiesterase 2 bei der Entstehung des akuten Lungenversagens

Eine weitere Möglichkeit zur Senkung endothelialer Permeabilität besteht darin, die lokale Konzentration zyklischer Nukleotide zu erhöhen¹⁵²⁻¹⁵⁴. Hohe intrazelluläre Konzentrationen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) können durch Aktivierung der Adenylyl- bzw. der Guanylylzyklase oder durch Inhibition von Phosphodiesterasen (PDE) erzielt werden, die zyklische Nukleotide degradieren. Da 11 unterschiedliche Familien von Phosphodiesterasen bekannt sind, wurde in der aktuellen Arbeit¹⁵⁵ zunächst diejenige Phosphodiesterase identifiziert, deren Aktivität bei Inflammation ansteigt. In humanen umbilikalvenösen Endothelzellen stieg unter Stimulation mit TNF- α ausschließlich die Aktivität der PDE2 an, während die Aktivität anderer Phosphodiesterasen konstant blieb. In vitro induzierte Thrombin mehr endotheliale Permeabilität, wenn die Endothelzellen PDE2 überexprimierten und weniger Permeabilität, wenn die PDE2 inhibiert wurde. In isoliert perfundierten und ventilierten Mauslungen reduzierte PDE2-Inhibition die Entstehung von Lungenödem und Permeabilität nach Stimulation mit Thrombin¹⁵⁵. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die PDE2-Inhibition auch bei Pneumokokkenpneumonie untersucht¹⁵⁶. PDE2-Inhibition reduzierte Pneumolysin-induzierte Permeabilität in vitro und in isoliert perfundierten Mauslungen. Im Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie stieg die pulmonale Expression der PDE2, während die Expression anderer PDE konstant blieb oder sank. Die kontinuierliche Infusion eines PDE2-Inhibitors reduzierte die Permeabilität bei Pneumokokkenpneumonie drastisch¹⁵⁶.

Weitere in vivo Studien sind notwendig, die einerseits einen therapeutischen Ansatz untersuchen (Beginn der Behandlung nach Infektion), und andererseits die vorliegenden Daten in anderen Spezies und bei Pneumonie durch andere Erreger bestätigen. Ferner sollte ein Einfluss auf die Mortalität der experimentellen Pneumonie

gezeigt werden. Sollten die Ergebnisse derartiger Studien die vorliegenden Daten unterstützen und die Ergebnisse toxikologischer Untersuchungen nicht dagegen sprechen, dann ist die Durchführung klinischer Studien zur Anwendung eines PDE2-Inhibitors bei schwerer Pneumonie denkbar. Möglicherweise könnten insbesondere Patienten mit neu diagnostizierter Pneumonie profitieren, die ein hohes Risiko für die Entwicklung eines Akuten Lungenversagens haben. Diese Patienten könnten mit einem PDE2 Inhibitor zusätzlich zur antibiotischen Behandlung therapiert werden.

Während der PDE-Inhibitor Theophyllin seit fast 70 Jahren therapeutisch eingesetzt wird und aufgrund fehlender Selektivität, geringer therapeutischer Breite und eines breiten Nebenwirkungsprofils eine suboptimale Therapieform darstellt, wird der Nutzen moderner, selektiver PDE-Inhibitoren zunehmend deutlich. Neben dem etablierten Einsatz des PDE5-Inhibitors Sildenafil zur Behandlung der erektilen Dysfunktion (Viagra[®]) und der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (Revatio[®]) wird möglicherweise in naher Zukunft der selektive PDE4-Inhibitor Roflumilast (Daxas[®]) zur Ergänzung der Standardtherapie bei COPD zugelassen. PDE4-Inhibitoren beeinflussen in vitro zahlreiche inflammatorische Vorgänge und reduzieren in vivo unter anderem die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des Immunsystems bei inflammatorischen Lungenerkrankungen. Zwei zulassungsrelevante klinische 12-Monats-Studien (noch unpubliziert) erreichten im Jahr 2008 ihre primären Endpunkte, nämlich Reduktion der Exazerbationsrate und Verbesserung der Lungenfunktion (FEV1) bei COPD. Zwei weitere unterstützende 6-Monats-Studien bestätigten, dass die Anwendung von Daxas[®] zusätzlich zu Bronchien erweiternden Standard-Medikamenten eine zusätzliche Besserung der Symptome bewirkt.

3.3 Therapie der Pneumokokkenpneumonie mit lytischem Phagenenzym

Das Auftreten Antibiotika-resistenter Bakterien wird zunehmend zum klinischen Problem bei der Behandlung von Infektionskrankheiten einschließlich der Pneumonie. Die Penizillinresistenz der Pneumokokken hat sich innerhalb des letzten Jahrzehnts in den USA auf 34% verdoppelt¹⁰⁵, und steigende Resistenzraten gegenüber anderen Antibiotika wie Makrolide, Fluorchinolone, Tetracykline, Trimethoprim-Sulfamethoxazol und Cephalosporine wurden beobachtet^{157;158}. Daher werden neue antimikrobielle Strategien benötigt, um auch zukünftig Patienten effizient behandeln zu können, die an einer durch Antibiotika-resistente Pneumokokken verursachten Erkrankung leiden.

Bakteriophagen dringen in Bakterien ein, nutzen den Protein-Syntheseapparat der Bakterien zur Vermehrung und befreien sich nachfolgend aus den Bakterien mithilfe

lytischer Enzyme, welche die Bakterienwand von innen zerstören. Die Evolutionsgeschichte lytischer Enzyme (Lysine) ist viele Millionen Jahre alt und es kann davon ausgegangen werden, dass Phagen evolutionsbiologisch benachteiligt waren, die Lysine mit suboptimaler Wirksamkeit bildeten. Eine Resistenzentwicklung gegen die derart optimierten Lysine, die den für Bakterien lebensnotwendigen Zellwandbestandteil Cholin binden, ist unwahrscheinlich. Spezies-spezifische Bakteriophagen wurden für fast alle bekannten Bakteriengattungen beschrieben, einschließlich zahlreicher pathogener Bakterien¹⁵⁹.

Ein Bakteriolyisin, dessen besondere Eigenschaften eine Nutzung als Antibiotikumersatz prinzipiell zulassen, wurde aus Pneumokokken-spezifischen Bakteriophagen isoliert und synthetisiert¹⁶⁰. In vitro Studien zeigten, dass auf Pneumokokken gegebenes Lysin höchst effizient und spezifisch Bakteriolyse verursacht. Während bereits 10 ng der Substanz ausreichen, um innerhalb weniger Sekunden eine Million Pneumokokken in vitro zu lysieren, wurden andere Bakterien und humane Zellen nicht in Mitleidenschaft gezogen. An lebenden Mäusen konnte gezeigt werden, dass dieses Lysin geeignet ist, um den Nasopharynx kolonisierende Pneumokokken zu eliminieren¹⁶⁰, sowie Bakteriämie¹⁶¹ und Endokarditis¹⁶² zu therapieren.

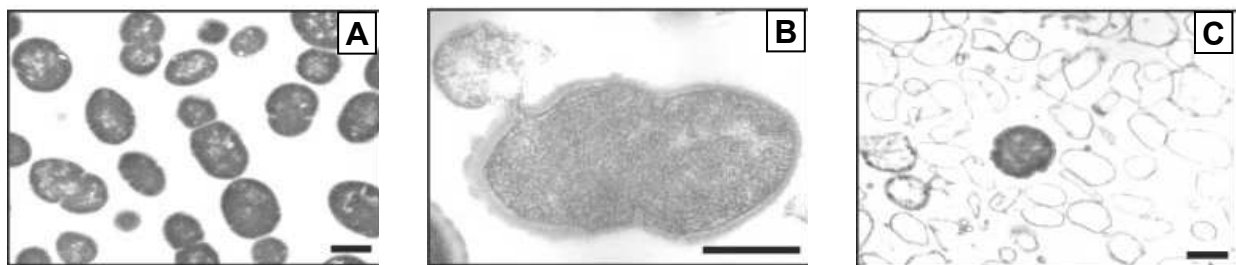


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Pneumokokken (A) vor Applikation des Pneumokokken-spezifischen lytischen Enzyms Pal, sowie (B) 1 Minute und (C) 5 Minuten nach Applikation von Pal. Eine Minute nach Applikation sind lokale Zellwandprotrusionen sichtbar, während nach fünf Minuten nur leere Bakterienhüllen zu sehen sind. Balken: 0,5µm.
Quelle: Ref.¹⁶⁰

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine experimentelle Pneumonie mit einem Lysin behandelt. Insbesondere wurde das Lysin im Gegensatz zu den genannten Arbeiten in ein vom Wirkort entferntes Kompartiment (intraperitoneal) appliziert.

Während alle Placebo-behandelten Mäuse verstarben, überlebten alle mit Cpl-1 behandelten Mäuse. Diese Tiere zeigten eine deutliche Reduktion der Bakterienzahlen in Lunge und Blut und eine rasche klinische Besserung. Die Therapieeffizienz von Cpl-1 war – bei Infektion mit penicillinempfindlichen Pneumokokken – mit der eines Penicillin

vergleichbar. Nebenwirkungen der Therapie wurden in umfassenden Analysen weder bei Mäusen, noch in humanen Zellkulturen beobachtet.

Da es sich bei Lysinen um körperfremde Proteine handelt, muss vor dem klinischen Einsatz unter anderem untersucht werden, ob der Mensch bei systemischer Applikation eine Antikörperantwort ausbildet. Diese wurde bei Mäusen beobachtet, führte jedoch nicht zu einer Reduktion der therapeutischen Effizienz bei wiederholtem Einsatz des Enzyms. Ferner muss vor dem individuellen Einsatz eines Lysins der die Krankheit verursachende Erreger bekannt sein. Ein Pneumokokken-Antigennachweis im Urin ist in der akuten Situation innerhalb kurzer Zeit möglich^{163;164}, so dass bei positivem Testergebnis eine Pneumokokkeninfektion mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Nicht zuletzt könnten sich lytische Phagenenzyme zur adjuvanten Therapie bei initialem Versagen der antibiotischen Therapie, sowie zur Eradikation von Bakterien bei Besiedlung und lokaler Infektion eignen. Aktuell werden in den USA Zulassungsverfahren für erste klinische Studien zur Untersuchung von lytischen Phagenenzymen beantragt.

3.4 Ausblick

Die Pneumonie ist weiterhin die häufigste Infektionskrankheit und führt seit Einführung der antibiotischen Therapie unverändert häufig zum Tod. Die Erkenntnis, dass die Pathogen-Wirtsinteraktion und insbesondere die inflammatorische Reaktion des Wirtes einen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der Pneumonie haben, eröffnet neue Möglichkeiten für die Entwicklung therapeutischer Optionen mit dem Ziel, die Mortalität der Pneumonie zu reduzieren.

Die vorliegende Arbeit konnte einige Aspekte der Pathogen-Wirtsinteraktion bei Pneumonie und Akutem Lungenversagen beleuchten, sowie einzelne prophylaktische und therapeutische Ansätze experimentell prüfen. Jedoch sind wesentliche Mechanismen der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt weiterhin unzureichend verstanden. Nach und nach werden wichtige Eigenschaften der mikrobiellen Erreger bekannt. Seitens des Wirtes erscheinen der Einfluss der extra- und intrazellulären Pathogen-Erkennungsrezeptoren und nachgeschalteter Signaltransduktionswege, der Interaktion zwischen Zellen der alveolokapillären Barriere und des Immunsystems, der Antigenpräsentierenden Zellen, sowie des Zusammenspiels von T-Zellen auf den Verlauf der Pneumonie aktuell als vielversprechende Forschungsgebiete auf dem Weg zu neuen Therapiestrategien.

Das zunehmende Interesse an Vorgängen angeborener und adaptiver Immunität und die rasante Weiterentwicklung der experimentellen Methoden in der biomedizinischen Forschung ermöglichen einen beschleunigten Wissenszuwachs hinsichtlich der Pathobiologie der Pneumonie. Dies führte bereits in der jüngeren Vergangenheit zu einem beeindruckenden Erkenntnisgewinn, der mit etwas Optimismus auch für die kommenden Jahre prognostiziert werden kann. Aus diesen neuen Erkenntnissen können innovative Therapiekonzepte generiert werden. Gleichzeitig gilt es, bereits experimentell erfolgreiche Therapien klinisch zu validieren. Und nicht zuletzt besteht eine wichtige Aufgabe der biomedizinischen Forschung in der Übermittlung der Forschungsergebnisse in den klinischen Alltag.

4 LITERATUR

1. Fehrenbach, H. 2001. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2:33-46.
2. Matthay, M. A., H. G. Folkesson, and C. Clerici. 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 82:569-600.
3. Uhal, B. D. 1997. Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* 272:L1031-L1045.
4. Strieter, R. M., J. A. Belperio, and M. P. Keane. 2003. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis* 16:193-198.
5. Hippenstiel, S., B. Opitz, B. Schmeck, and N. Suttorp. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia - molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory Research* 7:97.
6. Akira, S. and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
7. Schmeck, B., S. Huber, K. Moog, J. Zahlten, A. C. Hocke, B. Opitz, S. Hammerschmidt, T. J. Mitchell, M. Kracht, S. Rosseau, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2006. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L730-L737.
8. Armstrong, L., A. R. Medford, K. M. Uppington, J. Robertson, I. R. Witherden, T. D. Tetley, and A. B. Millar. 2004. Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:241-245.
9. Opitz, B., A. Puschel, B. Schmeck, A. C. Hocke, S. Rosseau, S. Hammerschmidt, R. R. Schumann, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2004. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 279:36426-36432.
10. Opitz, B., S. Forster, A. C. Hocke, M. Maass, B. Schmeck, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and M. Krull. 2005. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomydia pneumoniae*. *Circ Res* 96:319-326.
11. Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, and E. I. Tuomanen. 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377:435-438.
12. Schmeck, B., J. Zahlten, K. Moog, L. V. van, S. Huber, A. C. Hocke, B. Opitz, E. Hoffmann, M. Kracht, J. Zerrahn, S. Hammerschmidt, S. Rosseau, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2004. *Streptococcus pneumoniae*-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem* 279:53241-53247.
13. Schmeck, B., W. Beermann, L. V. van, J. Zahlten, B. Opitz, M. Witzernath, A. C. Hocke, T. Chakraborty, M. Kracht, S. Rosseau, N. Suttorp, and S. Hippenstiel. 2005. Intracellular bacteria differentially regulated endothelial cytokine release by MAPK-dependent histone modification. *J Immunol* 175:2843-2850.
14. Rubinfeld, H. and R. Seger. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* 31:151-174.

15. Silverman, N. and T. Maniatis. 2001. NF- κ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes & Dev.* 15:2321-2342.
16. Strieter, R. M. 2002. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L688-L689.
17. Zlotnik, A. and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12:121-127.
18. Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med.* 358:716-727.
19. Monto, A. S. 1989. Acute respiratory infection in children of developing countries: challenge of the 1990s. *Rev Infect.Dis* 11:498-505.
20. Mandell, L. A. 2004. Epidemiology and etiology of community-acquired pneumonia. *Infect Dis Clin North Am* 18:761-76, vii.
21. Ortqvist, A., J. Hedlund, and M. Kalin. 2005. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Semin.Respir Crit Care Med* 26:563-574.
22. Chastre, J., J. L. Trouillet, A. Vuagnat, M. L. Joly-Guillou, H. Clavier, M. C. Dombret, and C. Gibert. 1998. Nosocomial pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 157:1165-1172.
23. Lynch, J. P. I. I. 2001. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 119:373S-384S.
24. Marrie, T. J. 1994. Community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 18:501-513.
25. Welte, T., R. Marre, and N. Suttrop. 2004. [Competence network "community acquired pneumonia" (CAPNETZ). A first interim report]. *Internist (Berl).* 45:393-401.
26. Lim, W. S., S. Lewis, and J. T. Macfarlane. 2000. Severity prediction rules in community acquired pneumonia: a validation study. *Thorax.* 55:219-223.
27. Fine, M. J., T. E. Auble, D. M. Yealy, B. H. Hanusa, L. A. Weissfeld, D. E. Singer, C. M. Coley, T. J. Marrie, and W. N. Kapoor. 1997. A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia. *N.Engl.J.Med.* 336:243-250.
28. Hammerschmidt, S., S. Wolff, A. Hocke, S. Rosseau, E. Muller, and M. Rohde. 2005. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect.Immun.* 73:4653-4667.
29. Camara, M., T. J. Mitchell, P. W. Andrew, and G. J. Boulnois. 1991. Streptococcus pneumoniae produces at least two distinct enzymes with neuraminidase activity: cloning and expression of a second neuraminidase gene in Escherichia coli. *Infect.Immun.* 59:2856-2858.
30. Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, and H. R. Masure. 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol.* 25:819-829.
31. Sampson, J. S., S. P. O'Connor, A. R. Stinson, J. A. Tharpe, and H. Russell. 1994. Cloning and nucleotide sequence analysis of psaA, the Streptococcus pneumoniae gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported Streptococcus sp. adhesins. *Infect.Immun.* 62:319-324.

32. McDaniel, L. S., J. S. Sheffield, P. Delucchi, and D. E. Briles. 1991. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect.Immun.* 59:222-228.
33. Feldman, C., T. J. Mitchell, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, R. C. Read, H. C. Todd, P. J. Cole, and R. Wilson. 1990. The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb.Pathog.* 9:275-284.
34. Austrian, R. 1999. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J Infect.Dis* 179 Suppl 2:S338-S341.
35. Tilghman RC and Finland M. Clinical significance of bacteremia in pneumococcal pneumonia. *Arch Intern Med.* 59, 602-619. 1937.
36. Janoff, E. N., J. O'Brien, P. Thompson, J. Ehret, G. Meiklejohn, G. Duvall, and J. M. Douglas, Jr. 1993. *Streptococcus pneumoniae* colonization, bacteremia, and immune response among persons with human immunodeficiency virus infection. *J Infect.Dis* 167:49-56.
37. Bruyn, G. A. 1992. Pneumococcal immunisation and the healthy elderly. *Lancet* 340:1418.
38. Obaro, S. K., R. A. Adegbola, W. A. Banya, and B. M. Greenwood. 1996. Carriage of pneumococci after pneumococcal vaccination. *Lancet* 348:271-272.
39. Griffith F. The significance of pneumococcal types. *J Hyg* 27, 113-159. 1928.
40. Coffey, T. J., M. C. Enright, M. Daniels, J. K. Morona, R. Morona, W. Hryniewicz, J. C. Paton, and B. G. Spratt. 1998. Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 27:73-83.
41. Butler, J. C., R. F. Breiman, H. B. Lipman, J. Hofmann, and R. R. Facklam. 1995. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* infections among preschool children in the United States, 1978-1994: implications for development of a conjugate vaccine. *J Infect.Dis* 171:885-889.
42. Peltola, H., R. Booy, and H. J. Schmitt. 2004. What can children gain from pneumococcal conjugate vaccines? *Eur J Pediatr.* 163:509-516.
43. Lynch, J. P., III and G. G. Zhanel. 2005. Escalation of antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae*: implications for therapy. *Semin.Respir Crit Care Med* 26:575-616.
44. Tilley, S. J., E. V. Orlova, R. J. Gilbert, P. W. Andrew, and H. R. Saibil. 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* 121:247-256.
45. Rubins, J. B., D. Charboneau, J. C. Paton, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, and E. N. Janoff. 1995. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin.Invest.* 95:142-150.
46. Paton, J. C., P. W. Andrew, G. J. Boulnois, and T. J. Mitchell. 1993. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu.Rev Microbiol.* 47:89-115.
47. Balachandran, P., S. K. Hollingshead, J. C. Paton, and D. E. Briles. 2001. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol.* 183:3108-3116.

48. Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, E. Peabody, J. Weaver, D. P. Martin, M. Neff, E. J. Stern, and L. D. Hudson. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N.Engl.J.Med.* %20;353:1685-1693.
49. Steinberg, K. P., L. D. Hudson, R. B. Goodman, C. L. Hough, P. N. Lanke, R. Hyzy, B. T. Thompson, and M. Ancukiewicz. 2006. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* %20;354:1671-1684.
50. Leaver, S. K. and T. W. Evans. 2007. Acute respiratory distress syndrome. *BMJ.* 335:389-394.
51. Pratt, P. C., R. T. Vollmer, J. D. Shelburne, and J. D. Crapo. 1979. Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy. *Am.J.Pathol.* 95:191-214.
52. Bachofen, M. and E. R. Weibel. 1982. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin.Chest Med.* 3:35-56.
53. Ware, L. B. and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342:1334-1349.
54. Aberle, D. R., J. P. Wiener-Kronish, W. R. Webb, and M. A. Matthay. 1988. Hydrostatic versus increased permeability pulmonary edema: diagnosis based on radiographic criteria in critically ill patients. *Radiology.* 168:73-79.
55. Wiener-Kronish, J. P. and M. A. Matthay. 1988. Pleural effusions associated with hydrostatic and increased permeability pulmonary edema. *Chest.* 93:852-858.
56. Goodman, L. R. 1996. Congestive heart failure and adult respiratory distress syndrome. New insights using computed tomography. *Radiol.Clin.North Am.* 34:33-46.
57. Ghio, A. J., C. G. Elliott, R. O. Crapo, S. L. Berlin, and R. L. Jensen. 1989. Impairment after adult respiratory distress syndrome. An evaluation based on American Thoracic Society recommendations. *Am.Rev.Respir.Dis.* 139:1158-1162.
58. Elliott, C. G., B. Y. Rasmusson, R. O. Crapo, A. H. Morris, and R. L. Jensen. 1987. Prediction of pulmonary function abnormalities after adult respiratory distress syndrome (ARDS). *Am.Rev.Respir.Dis.* 135:634-638.
59. Weinert, C. R., C. R. Gross, J. R. Kangas, C. L. Bury, and W. A. Marinelli. 1997. Health-related quality of life after acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1120-1128.
60. Davidson, T. A., E. S. Caldwell, J. R. Curtis, L. D. Hudson, and K. P. Steinberg. 1999. Reduced quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome compared with critically ill control patients. *JAMA.* 281:354-360.
61. Pugin, J., G. Verghese, M. C. Widmer, and M. A. Matthay. 1999. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 27:304-312.
62. Wiener-Kronish, J. P., K. H. Albertine, and M. A. Matthay. 1991. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J.Clin.Invest.* 88:864-875.
63. Greene, K. E., J. R. Wright, K. P. Steinberg, J. T. Ruzinski, E. Caldwell, W. B. Wong, W. Hull, J. A. Whitsett, T. Akino, Y. Kuroki, H. Nagae, L. D. Hudson, and T. R. Martin. 1999. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:1843-1850.

64. Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin, and J. P. Wiener-Kronish. 1999. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J.Clin.Invest.* 104:743-750.
65. Bitterman, P. B. 1992. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am.J.Med.* 92:39S-43S.
66. Bachofen, M. and E. R. Weibel. 1977. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am.Rev.Respir.Dis.* 116:589-615.
67. Lafe, M. D., R. H. Simon, A. Flint, and J. B. Keller. 1986. Adult respiratory distress syndrome in neutropenic patients. *Am.J.Med.* 80:1022-1026.
68. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med.* 342:1301-1308.
69. Brower, R. G., P. N. Lanken, N. MacIntyre, M. A. Matthay, A. Morris, M. Ancukiewicz, D. Schoenfeld, and B. T. Thompson. 2004. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 351:327-336.
70. Prewitt, R. M., J. McCarthy, and L. D. Wood. 1981. Treatment of acute low pressure pulmonary edema in dogs: relative effects of hydrostatic and oncotic pressure, nitroprusside, and positive end-expiratory pressure. *J.Clin.Invest.* 67:409-418.
71. Sakka, S. G., M. Klein, K. Reinhart, and A. Meier-Hellmann. 2002. Prognostic value of extravascular lung water in critically ill patients. *Chest.* 122:2080-2086.
72. Humphrey, H., J. Hall, I. Sznajder, M. Silverstein, and L. Wood. 1990. Improved survival in ARDS patients associated with a reduction in pulmonary capillary wedge pressure. *Chest.* 97:1176-1180.
73. Wiedemann, H. P., A. P. Wheeler, G. R. Bernard, B. T. Thompson, D. Hayden, B. deBoisblanc, A. F. Connors, Jr., R. D. Hite, and A. L. Harabin. 2006. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N.Engl.J.Med.* 354:2564-2575.
74. 1998. Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. Cochrane Injuries Group Albumin Reviewers. *BMJ.* 317:235-240.
75. Wilkes, M. M. and R. J. Navickis. 2001. Patient survival after human albumin administration. A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann.Intern.Med.* 135:149-164.
76. Finfer, S., R. Bellomo, N. Boyce, J. French, J. Myburgh, and R. Norton. 2004. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med.* 350:2247-2256.
77. Martin, G. S., R. J. Mangialardi, A. P. Wheeler, W. D. Dupont, J. A. Morris, and G. R. Bernard. 2002. Albumin and furosemide therapy in hypoproteinemic patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 30:2175-2182.
78. Martin, G. S., M. Moss, A. P. Wheeler, M. Mealer, J. A. Morris, and G. R. Bernard. 2005. A randomized, controlled trial of furosemide with or without albumin in hypoproteinemic patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 33:1681-1687.
79. Calfee, C. S. and M. A. Matthay. 2007. Nonventilatory treatments for acute lung injury and ARDS. *Chest.* 131:913-920.

80. Anzueto, A., R. P. Baughman, K. K. Guntupalli, J. G. Weg, H. P. Wiedemann, A. A. Raventos, F. Lemaire, W. Long, D. S. Zaccardelli, and E. N. Pattishall. 1996. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.* 334:1417-1421.
81. Spragg, R. G., J. F. Lewis, W. Wurst, D. Hafner, R. P. Baughman, M. D. Wewers, and J. J. Marsh. 2003. Treatment of acute respiratory distress syndrome with recombinant surfactant protein C surfactant. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 167:1562-1566.
82. Spragg, R. G., J. F. Lewis, H. D. Walmrath, J. Johannigman, G. Bellingan, P. F. Laterre, M. C. Witte, G. A. Richards, G. Rippin, F. Rathgeb, D. Hafner, F. J. Taut, and W. Seeger. 2004. Effect of recombinant surfactant protein C-based surfactant on the acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 351:884-892.
83. Willson, D. F., N. J. Thomas, B. P. Markovitz, L. A. Bauman, J. V. DiCarlo, S. Pon, B. R. Jacobs, L. S. Jefferson, M. R. Conaway, and E. A. Egan. 2005. Effect of exogenous surfactant (calfactant) in pediatric acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA.* 293:470-476.
84. Rossaint, R., K. J. Falke, F. Lopez, K. Slama, U. Pison, and W. M. Zapol. 1993. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 328:399-405.
85. Dellinger, R. P., J. L. Zimmerman, R. W. Taylor, R. C. Straube, D. L. Hauser, G. J. Criner, K. Davis, Jr., T. M. Hyers, and P. Papadakos. 1998. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med.* 26:15-23.
86. Michael, J. R., R. G. Barton, J. R. Saffle, M. Mone, B. A. Markewitz, K. Hillier, M. R. Elstad, E. J. Campbell, B. E. Troyer, R. E. Whatley, T. G. Liou, W. M. Samuelson, H. J. Carveth, D. M. Hinson, S. E. Morris, B. L. Davis, and R. W. Day. 1998. Inhaled nitric oxide versus conventional therapy: effect on oxygenation in ARDS. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:1372-1380.
87. Sprung, C. L., P. V. Caralis, E. H. Marcial, M. Pierce, M. A. Gelbard, W. M. Long, R. C. Duncan, M. D. Tendler, and M. Karpf. 1984. The effects of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. A prospective, controlled study. *N.Engl.J.Med.* 311:1137-1143.
88. Bone, R. C., C. J. Fisher, Jr., T. P. Clemmer, G. J. Slotman, and C. A. Metz. 1987. Early methylprednisolone treatment for septic syndrome and the adult respiratory distress syndrome. *Chest.* 92:1032-1036.
89. Luce, J. M., A. B. Montgomery, J. D. Marks, J. Turner, C. A. Metz, and J. F. Murray. 1988. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am.Rev.Respir.Dis.* 138:62-68.
90. Bernard, G. R., J. M. Luce, C. L. Sprung, J. E. Rinaldo, R. M. Tate, W. J. Sibbald, K. Kariman, S. Higgins, R. Bradley, C. A. Metz, and . 1987. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 317:1565-1570.
91. Bernard, G. R., J. L. Vincent, P. F. Laterre, S. P. LaRosa, J. F. Dhainaut, A. Lopez-Rodriguez, J. S. Steingrub, G. E. Garber, J. D. Helterbrand, E. W. Ely, and C. J. Fisher, Jr. 2001. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N.Engl.J.Med.* 344:699-709.
92. Sapru, A., J. L. Wiemels, J. S. Witte, L. B. Ware, and M. A. Matthay. 2006. Acute lung injury and the coagulation pathway: Potential role of gene polymorphisms in the protein C and fibrinolytic pathways. *Intensive Care Med.* 32:1293-1303.

93. Ware, L. B., E. Camerer, K. Welty-Wolf, M. J. Schultz, and M. A. Matthay. 2006. Bench to bedside: targeting coagulation and fibrinolysis in acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 291:L307-L311.
94. Ware, L. B., X. Fang, and M. A. Matthay. 2003. Protein C and thrombomodulin in human acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 285:L514-L521.
95. Nick, J. A., C. D. Coldren, M. W. Geraci, K. R. Poch, B. W. Fouty, J. O'Brien, M. Gruber, S. Zarini, R. C. Murphy, K. Kuhn, D. Richter, K. R. Kast, and E. Abraham. 2004. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood.* 104:3878-3885.
96. van der, P. T., M. Levi, J. A. Nick, and E. Abraham. 2005. Activated protein C inhibits local coagulation after intrapulmonary delivery of endotoxin in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 171:1125-1128.
97. Liu, K. D., J. Levitt, H. Zhuo, R. H. Kallet, S. Brady, J. Steingrub, M. Tidswell, M. D. Siegel, G. Soto, M. W. Peterson, M. S. Chesnutt, C. Phillips, A. Weinacker, B. T. Thompson, M. D. Eisner, and M. A. Matthay. 2008. Randomized clinical trial of activated protein C for the treatment of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 178:618-623.
98. Lechner, A. J., K. E. Lamprech, L. H. Potthoff, T. L. Tredway, and G. M. Matuschak. 1994. Recombinant GM-CSF reduces lung injury and mortality during neutropenic Candida sepsis. *Am.J.Physiol.* 266:L561-L568.
99. Presneill, J. J., T. Harris, A. G. Stewart, J. F. Cade, and J. W. Wilson. 2002. A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 166:138-143.
100. Sakuma, T., G. Okaniwa, T. Nakada, T. Nishimura, S. Fujimura, and M. A. Matthay. 1994. Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150:305-310.
101. McAuley, D. F., J. A. Frank, X. Fang, and M. A. Matthay. 2004. Clinically relevant concentrations of beta2-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Crit Care Med.* 32:1470-1476.
102. Maris, N. A., A. F. de Vos, M. C. Dessing, C. A. Spek, R. Lutter, H. M. Jansen, J. S. van der Zee, P. Bresser, and P. T. van der. 2005. Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 172:878-884.
103. Perkins, G. D., D. F. McAuley, D. R. Thickett, and F. Gao. 2006. The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 173:281-287.
104. Lorente, L., S. Blot, and J. Rello. 2007. Evidence on measures for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J.* 30:1193-1207.
105. File, T. M., Jr. 2004. Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med.* 117 Suppl 3A:39S-50S.:39S-50S.
106. Hament, J. M., J. L. Kimpen, A. Flier, and T. F. Wolfs. 1999. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 26:189-195.
107. Pugin, J. 2007. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis.Found.Symp.* 280:21-7; discussion 27-36, 160-4.:21-27.

108. Lujan, M., M. Gallego, and J. Rello. 2006. Optimal therapy for severe pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* 32:971-980.
109. Lujan, M., M. Gallego, D. Fontanals, D. Mariscal, and J. Rello. 2004. Prospective observational study of bacteremic pneumococcal pneumonia: Effect of discordant therapy on mortality. *Crit Care Med.* 32:625-631.
110. Meehan, T. P., M. J. Fine, H. M. Krumholz, J. D. Scinto, D. H. Galusha, J. T. Mockalis, G. F. Weber, M. K. Petrillo, P. M. Houck, and J. M. Fine. 1997. Quality of care, process, and outcomes in elderly patients with pneumonia. *JAMA.* 278:2080-2084.
111. Roson, B., J. Carratala, N. Fernandez-Sabe, F. Tubau, F. Manresa, and F. Gudiol. 2004. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med.* 164:502-508.
112. Rodriguez, A., T. Lisboa, S. Blot, I. Martin-Loeches, J. Sole-Violan, D. De Mendoza, and J. Rello. 2008. Mortality in ICU patients with bacterial community-acquired pneumonia: when antibiotics are not enough. *Intensive Care Med.*
113. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449:819-826.
114. Koedel, U., B. Angele, T. Rupprecht, H. Wagner, A. Roggenkamp, H. W. Pfister, and C. J. Kirschning. 2003. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunol.* 170:438-444.
115. Letiembre, M., H. Echchannaoui, P. Bachmann, F. Ferracin, C. Nieto, M. Espinosa, and R. Landmann. 2005. Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun.* 73:8397-8401.
116. Jedrzejewski, M. J. 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol.Mol Biol Rev* 65:187-207.
117. Jedrzejewski, M. J. 2004. Extracellular virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci.* 9:891-914.:891-914.
118. Musher, D. M., H. M. Phan, and R. E. Baughn. 2001. Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. *J Infect.Dis.* 183:827-830.
119. Rubins, J. B., D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, J. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, and E. N. Janoff. 1996. Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir.Crit.Care Med* 153:1339-1346.
120. Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Charboneau, and E. N. Janoff. 1992. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect.Immun.* 60:1740-1746.
121. Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, J. Young, and D. E. Niewoehner. 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 61:1352-1358.
122. Spreer, A., H. Kerstan, T. Bottcher, J. Gerber, A. Siemer, G. Zysk, T. J. Mitchell, H. Eiffert, and R. Nau. 2003. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxone. *Antimicrob.Agents Chemother.* 47:2649-2654.

123. Maus, U. A., M. Srivastava, J. C. Paton, M. Mack, M. B. Everhart, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlondorff, W. Seeger, and J. Lohmeyer. 2004. Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol* 173:1307-1312.
124. Malley, R., P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, E. Kurt-Jones, J. C. Paton, M. R. Wessels, and D. T. Golenbock. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1966-1971.
125. Cockeran, R., A. J. Theron, H. C. Steel, N. M. Matlola, T. J. Mitchell, C. Feldman, and R. Anderson. 2001. Proinflammatory interactions of pneumolysin with human neutrophils. *J Infect.Dis.* 183:604-611.
126. Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell, and R. Anderson. 2002. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J Infect.Dis.* 186:562-565.
127. Witzernath, M., B. Gutbier, J. S. Owen, B. Schmeck, T. J. Mitchell, K. Mayer, M. J. Thomas, S. Ishii, S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte. 2007. Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. *Crit Care Med.* 35:1756-1762.
128. Krull, M., C. Dold, S. Hippenstiel, S. Rosseau, J. Lohmeyer, and N. Suttorp. 1996. Escherichia coli hemolysin and Staphylococcus aureus alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J.Immunol.* 157:4133-4140.
129. Suttorp, N., M. Buerke, and S. Tannert-Otto. 1992. Stimulation of PAF-synthesis in pulmonary artery endothelial cells by Staphylococcus aureus alpha-toxin. *Thromb Res.* 67:243-252.
130. Chang, S. W., C. O. Feddersen, P. M. Henson, and N. F. Voelkel. 1987. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest.* 79:1498-1509.
131. Uhlig, S., R. Goggel, and S. Engel. 2005. Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep.* 57 Suppl:206-21.:206-221.
132. Wang, H., X. Tan, H. Chang, F. Gonzalez-Crussi, D. G. Remick, and W. Hsueh. 1997. Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor. *Biochem J.* 322:603-608.
133. Prescott, S. M., G. A. Zimmerman, D. M. Stafforini, and T. M. McIntyre. 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 69:419-45.:419-445.
134. Suputtamongkol, Y., S. Intaranongpai, M. D. Smith, B. Angus, W. Chaowagul, C. Permpikul, J. A. Simpson, A. Leelarasamee, L. Curtis, and N. J. White. 2000. A double-blind placebo-controlled study of an infusion of lexipafant (Platelet-activating factor receptor antagonist) in patients with severe sepsis. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:693-696.
135. Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, and E. I. Tuomanen. 1995. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 377:435-438.
136. Rijneveld, A. W., S. Weijer, S. Florquin, P. Speelman, T. Shimizu, S. Ishii, and P. T. van der. 2004. Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis.* 189:711-716.

137. Cundell, D. R., C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, E. I. Tuomanen, and N. P. Gerard. 1996. PAF receptor anchors Streptococcus pneumoniae to activated human endothelial cells. *Adv. Exp Med Biol.* 416:89-94.:89-94.
138. van der Sluijs, K. F., L. J. van Elden, M. Nijhuis, R. Schuurman, S. Florquin, T. Shimizu, S. Ishii, H. M. Jansen, R. Lutter, and P. T. van der. 2006. Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against Streptococcus pneumoniae during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 290:L194-L199.
139. McCullers, J. A., A. R. Iverson, R. McKeon, and P. J. Murray. 2008. The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza. *Scand. J Infect Dis.* 40:11-17.
140. Jones, N., K. Iljin, D. J. Dumont, and K. Alitalo. 2001. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:257-267.
141. Davis, S., T. H. Aldrich, P. F. Jones, A. Acheson, D. L. Compton, V. Jain, T. E. Ryan, J. Bruno, C. Radziejewski, P. C. Maisonpierre, and G. D. Yancopoulos. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 87:1161-1169.
142. Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions. 2006. Angiogenesis and inflammation face off. *Nat Med.* 12:171-172.
143. Thurston, G., C. Suri, K. Smith, J. McClain, T. N. Sato, G. D. Yancopoulos, and D. M. McDonald. 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science.* 286:2511-2514.
144. Kim, I., H. G. Kim, J. N. So, J. H. Kim, H. J. Kwak, and G. Y. Koh. 2000. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ Res.* 86:24-29.
145. Springer, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76:301-314.
146. Mizgerd, J. P., B. B. Meek, G. J. Kutkoski, D. C. Bullard, A. L. Beaudet, and C. M. Doerschuk. 1996. Selectins and neutrophil traffic: margination and Streptococcus pneumoniae-induced emigration in murine lungs. *J Exp Med.* 184:639-645.
147. Orfanos, S. E., A. Kotanidou, C. Glynos, C. Athanasiou, S. Tsigkos, I. Dimopoulou, C. Sotiropoulou, S. Zakynthinos, A. Armaganidis, A. Papapetropoulos, and C. Roussos. 2007. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med.* 35:199-206.
148. Parikh, S. M., T. Mammoto, A. Schultz, H. T. Yuan, D. Christiani, S. A. Karumanchi, and V. P. Sukhatme. 2006. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med.* 3:e46.
149. McCarter, S. D., S. H. Mei, P. F. Lai, Q. W. Zhang, C. H. Parker, R. S. Suen, R. D. Hood, Y. D. Zhao, Y. Deng, R. N. Han, D. J. Dumont, and D. J. Stewart. 2007. Cell-based angiopoietin-1 gene therapy for acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 175:1014-1026.
150. Kalomenidis, I., A. Kollintza, I. Sigala, A. Papapetropoulos, S. Papiris, R. W. Light, and C. Roussos. 2006. Angiopoietin-2 levels are elevated in exudative pleural effusions. *Chest.* 129:1259-1266.
151. Hashimoto, T. and J. F. Pittet. 2006. Angiopoietin-2: modulator of vascular permeability in acute lung injury? *PLoS Med.* 3:e113.

152. Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krull, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schutte, and N. Suttorp. 2002. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res.* 91:618-625.
153. Suttorp, N., U. Weber, T. Welsch, and C. Schudt. 1993. Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J.Clin.Invest.* 91:1421-1428.
154. Suttorp, N., S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krull, and T. Podzuweit. 1996. Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am.J.Physiol* 270:C778-C785.
155. Seybold, J., D. Thomas, M. Witzenrath, S. Boral, A. C. Hocke, A. Burger, A. Hatzelmann, H. Tenor, C. Schudt, M. Krull, H. Schutte, S. Hippenstiel, and N. Suttorp. 2005. Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood* 105:3569-3576.
156. Witzenrath, M., B. Gutbier, B. Schmeck, H. Tenor, J. Seybold, R. Kuelzer, G. Grentzmann, A. Hatzelmann, L. van, V, T. Tschernig, T. J. Mitchell, C. Schudt, S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte. 2009. Phosphodiesterase 2 inhibition diminished acute lung injury in murine pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.*
157. Jacobs, M. R., D. Felmingham, P. C. Appelbaum, and R. N. Gruneberg. 2003. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 52:229-246.
158. Pallares, R., A. Fenoll, and J. Linares. 2003. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Agents.* 22 Suppl 1:S15-24; discussion S25-6.:S15-S24.
159. Merrill, C. R., D. Scholl, and S. L. Adhya. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nat Rev Drug Discov.* 2:489-497.
160. Loeffler, J. M., D. Nelson, and V. A. Fischetti. 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science.* 294:2170-2172.
161. Loeffler, J. M., S. Djurkovic, and V. A. Fischetti. 2003. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. *Infect Immun.* 71:6199-6204.
162. Entenza, J. M., J. M. Loeffler, D. Grandgirard, V. A. Fischetti, and P. Moreillon. 2005. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:4789-4792.
163. Murdoch, D. R., R. T. Laing, G. D. Mills, N. C. Karalus, G. I. Town, S. Mirrett, and L. B. Reller. 2001. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin.Microbiol.* 39:3495-3498.
164. Smith, M. D., P. Derrington, R. Evans, M. Creek, R. Morris, D. A. Dance, and K. Cartwright. 2003. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. *J Clin Microbiol.* 41:2810-2813.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen akademischen Lehrern. Prof. Dr. Norbert Suttrop, Direktor der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin hat mich stets in jeder Hinsicht unterstützt und in zielführenden Diskussionen viele wesentliche Gedanken in die wissenschaftlichen Projekte eingebracht. Dr. Hartwig Schütte leistete als wissenschaftlicher Mentor und freundschaftlicher Wegbegleiter von der ersten Stunde an unzählige wertvolle Beiträge in jedem Bereich. Mein Doktorvater Prof. Dr. Werner Seeger ermöglichte mir das Erlernen wissenschaftlichen Arbeitens und war bereits früh ein wichtiges Vorbild. Ihnen verdanke ich die Fähigkeit und Möglichkeit zu erfolgreichem wissenschaftlichen Arbeiten und die große Freude, die ich daran habe.

Ohne die viele, exzellente Arbeit wissenschaftlicher Mitarbeiter und Doktoranden wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Insbesondere (alphabetisch) Jan Doehn, Dr. Birgitt Gutbier, Dr. Stefanie Kube und Katrin Reppe danke ich besonders herzlich. Die enge Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen mit vielen Kollegen aus der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, vor allem mit Prof. Dr. Stefan Hippenstiel, Dr. Andreas Hocke, Dr. Simone Rosseau, PD Dr. Bernd Schmeck und Dr. Joachim Seybold haben ebenfalls wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich danke allen Kooperationspartnern und Koautoren, ohne deren exzellente Beiträge die vorliegenden Publikationen undenkbar gewesen wären, für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Nycomed GmbH, der Silence Therapeutics AG und der Charité-Universitätsmedizin Berlin danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Meinen Eltern Friederike und Werner bin ich sehr dankbar, dass sie meine Neugier geweckt und gefestigt haben, und dass sie mich stets in jeder Hinsicht liebevoll unterstützen.

Die vorliegende Arbeit ist meiner Frau Andrea gewidmet. Von ihr erfahre ich jederzeit Rückhalt und Verständnis. Ohne ihre praktische Unterstützung, ihren enormen Zuspruch und viele persönliche Opfer wäre mir die Durchführung der vorliegenden Untersuchungen nicht möglich gewesen. Ihr und unserem Sohn Jan bin ich außerordentlich dankbar für die Liebe, Kraft und Freude, die sie mir zum Leben und Arbeiten schenken.

Eidesstattliche Erklärung

gemäß §4 Abs. 3 (k) der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité -
Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift