

---

# **Charakterisierung der Pneumolysin-induzierten pulmonalen Entzündungsantwort in der Maus**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Christine Sibylle Hampl  
aus Esslingen am Neckar  
Giessen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin,  
Medizinische Klinik II  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen,  
Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“  
Leiter: Prof. Dr. med. Werner Seeger

Gutachter: Prof. Dr. J. Lohmeyer  
Gutachter: Frau Prof. Dr. R. Füssle  
Tag der Distputation: 16.01.2008

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>6</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
1.1 <i>Streptococcus</i> .....	8
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	8
1.3 Epidemiologische Verbreitung der Pneumokokkenerkrankungen.....	10
1.4 Therapie der Pneumokokkeninfektion.....	10
1.5 Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	11
1.6 Struktur und Funktion von Pneumolysin .....	14
1.6.1 Bedeutung des Pneumolysin in der Pneumokokkeninfektion .....	15
1.6.2 Effekt des Pneumolysin auf Entzündungszellen <i>in vitro</i> .....	15
1.7 Fragestellung.....	16
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>17</b>
2.1 Versuchstiere.....	17
2.2 Verwendete Substanzen.....	17
2.2.1 Pneumolysin und PdB .....	17
2.2.2 Applikation funktionsblockierender Antikörper.....	18
2.2.3 Herstellung von liposomalem Clodronat.....	18
2.3 Behandlung der Tiere .....	19
2.3.1 Narkose .....	19
2.3.2 Intratracheale Instillation von Pneumolysin bzw. PdB.....	19
2.3.3 Intratracheale Instillation von liposomalem Clodronat.....	19
2.3.4 Applikation funktionsblockierender anti-CD18- bzw. anti-CD49d- Antikörper sowie anti-CCR2-Antikörper .....	20
2.4 Gewinnung von peripherem Blut und bronchoalveoläre Lavage .....	20
2.4.1 Punktion der Vena cava zu Gewinnung von peripherem Blut.....	20

---

2.4.2	Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	21
2.4.3	Anfertigung von Zytocentrifugenpräparaten.....	21
<b>2.5</b>	<b>Evaluierung der Pneumolysin-induzierten Lungenpermeabilität .....</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....</b>	<b>22</b>
<b>2.7</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Effekt von Pneumolysin auf die alveolär-kapilläre Permeabilität der Lunge.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Effekt der intratrachealen Pneumolysinapplikation auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum von Mäusen .....</b>	<b>25</b>
<b>3.3</b>	<b>Effekt der intratrachealen Pneumolysinapplikation auf den residenten Alveolarmakrophagenpool von Mäusen.....</b>	<b>27</b>
<b>3.4</b>	<b>Effekt der systemischen Applikation funktions-blockierender anti-CCR2-Antikörper auf den alveolären Makrophagenpool in Pneumolysin- bzw. PdB-behandelten Mäusen.....</b>	<b>28</b>
<b>3.5</b>	<b>Effekt der intratrachealen Pneumolysin-Applikation auf die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren im alveolären Kompartiment .....</b>	<b>31</b>
<b>3.6</b>	<b>Effekt der Applikation funktionsblockierender anti-CD18- bzw. anti-CD49d-Antikörper auf die Pneumolysin-induzierte alveoläre Leukozytenrekrutierung und konsekutive Schrankenstörung.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7</b>	<b>Die Relevanz residenter Alveolarmakrophagen bei der Pneumolysin-induzierten akuten Schrankenstörung der Lunge .....</b>	<b>35</b>
<b>3.8</b>	<b>Effekt der Depletion residenter Alveolarmakrophagen auf die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Pneumolysin-behandelten Mäusen.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Effekt des Pneumolysin auf die alveolär-kapilläre Barriereintegrität der Lunge ..</b>	<b>40</b>

---

4.2	Effekt von Pneumolysin auf die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten 42	
4.3	Effekt der $\beta$ 2- bzw. $\beta$ 1-Integrin-abhängigen Leukozytenrekrutierung auf die Pneumolysin-induzierte akute Lungenschädigung bei Mäusen .....	43
4.4	Effekt der Blockade leukozytenmigrationsabhängiger Rekrutierungspaths auf die Pneumolysin-induzierte akute Lungenschädigung.....	45
4.5	Effekt des Pneumolysin auf den Alveolarmakrophagenpool der Lunge.....	46
4.6	Rolle der Alveolarmakrophagen bei der Pneumolysin-induzierten akuten Lungenentzündung .....	47
4.7	Effekt des Pneumolysin auf die Zytokinfreisetzung im Alveolarraum der Lunge.	48
4.8	Effekt adhäsionsblockierender anti-CCR2-Antikörper auf die alveoläre Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten .....	48
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	50
6	ABSTRACT .....	52
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	53
8	ANHANG .....	66
8.1	Reagenzien .....	66
8.2	Materialien und Bezugsquellen .....	66
8.3	Geräte und Herstellernachweis .....	68
	DANKSAGUNG .....	70
	LEBENS LAUF .....	71
	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....	73

---

## Abkürzungen

Aqua dest.	Aqua destillata
AU	arbitrary unit
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
°C	Grad Celsius
Cbp	Cholesterin-Bindungsprotein
C3	Komplementfaktor 3
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CCL	CC-Ligand
CCR	CC-Rezeptor
CXCL	CXC-Ligand
CXCR	CXC-Rezeptor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fc	fragment constant
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HIV	human immunodeficiency virus
HSA	Humanes Serumalbumin
HU	hemolytic unit

---

Hyl	Hyaluronidate Lyase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LytA	Lytische Amidase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MIP	makrophage inflammatory protein
Mn <sup>2+</sup>	Mangan
$\mu$ l	Mikroliter
NO	Stickstoffmonoxid
p	Wahrscheinlichkeit
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PdB	PLY mit einer Trp <sup>433</sup> -Phe-Mutation
PLY	Pneumolysin
PRR	pattern recognition receptor
PsaA	pneumococcal surface antigen A
PspA, PspC	pneumococcal surface protein A, C
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
ZmpB	Zinkmetalloprotease B
Zn <sup>2+</sup>	Zink

---

# 1 Einleitung

## 1.1 *Streptococcus*

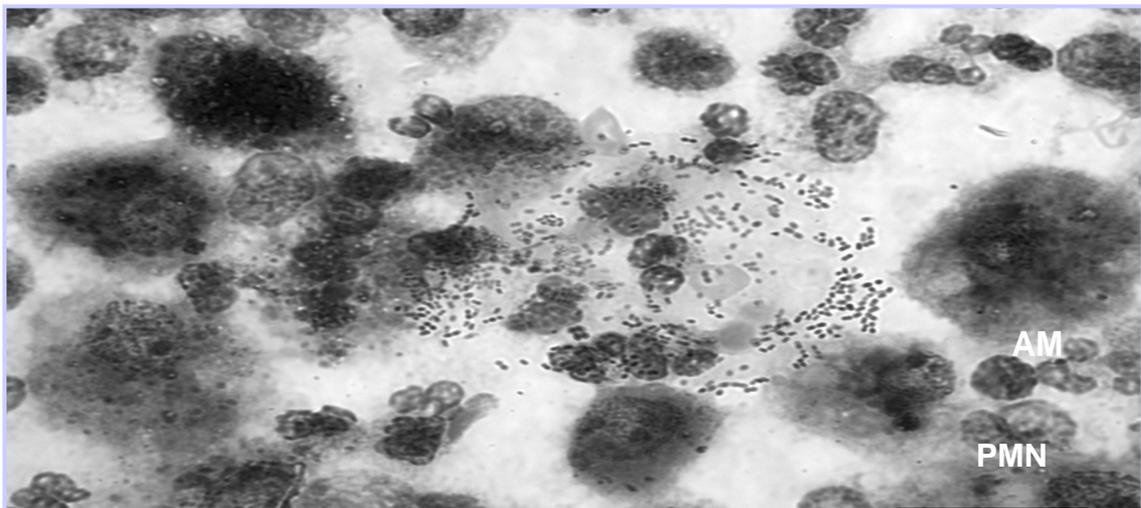
Die Gattung *Streptococcus* umfasst 59 Spezies, die zum Teil als Kommensalen, zum Teil obligat pathogen in erster Linie Säugetiere als Wirtsorganismen besiedeln. Schon in der Antike waren einige durch Streptokokken verursachte Erkrankungen wie das Kindbettfieber, die Wundrose und die Phlegmone bekannt. Es gelang jedoch erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts bedeutenden Ärzten wie Billroth (1868), Cheyne (1877), Ogston (1881), Rosenbach (1884) und Widal (1889), die Ätiologie dieser Erkrankungen auf eine Infektion mit Streptokokken zurückzuführen. Die Bezeichnung *Streptococcus* selbst stammt von Billroth (1874) und orientiert sich am mikroskopischen Erscheinungsbild der Bakterien (*Streptos* (gr.): Kette; *coccus* (gr.): die Beere, das Samenkorn), die ein zunächst perlschnurartiges Wachstum zeigen. Erst Anfang des 19. Jahrhunderts gelang es, Streptokokkenspezies anhand von serologischen und biochemischen Verfahren zu differenzieren (Sternberg, 1881; Pasteur, 1881; Fränkel 1884). 1984 erfolgte erstmals eine Unterteilung der Streptokokkengruppe in Enterokokken, Laktokokken und Streptokokken [86]. Seitdem folgten zahlreiche Veränderungen in der Klassifikation und der Einteilung der Streptokokken [32].

## 1.2 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (*Pneumococcus*, *Diplococcus pneumoniae*) zählt zur Gattung der Streptokokken, von denen über 90 verschiedene Serotypen bekannt sind. Streptokokken sind Gram-positive, sporenlose Kokken bzw. kokkoid wachsende Stäbchen mit einem Durchmesser von  $< 2 \mu\text{m}$ , die fakultativ anaerob wachsen. Die Isolation und Identifikation von *Streptococcus pneumoniae* ist noch immer problematisch aufgrund der Tatsache, dass konventionelle Kulturtechniken bei weitem noch nicht ausgereift sind und die Differenzierung einzelner Stämme sehr schwierig ist [65]. *Streptococcus pneumoniae* zeigt auf bluthaltigem Kulturmedium eine  $\alpha$ -Hämolysereaktion. Gemäß der Lancefield-Klassifikation werden die Pneumokokken somit den nicht- $\beta$ -hämolisierenden

Streptokokken zugeordnet, eine Einteilung, die vor allem von klinischer Relevanz ist [32]. Im Gegensatz zur  $\beta$ -Hämolyse, bei der die Erythrozytenwände geschädigt werden, so dass Hämoglobin austreten und in die Umgebung diffundieren kann, bleiben die Wände bei der  $\alpha$ -Hämolyse weitestgehend intakt [36]. Bei der  $\alpha$ -Hämolyse verfärbt sich das Hämoglobin (Hb) im Inneren der Erythrozyten, vor allem bedingt durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Dadurch entstehen schmale grünliche Höfe um die Bakterienkolonien, ein Phänomen, das auch als Vergrünung bezeichnet wird [32,65].

Physiologische, phänotypische Tests platzieren *Streptococcus pneumoniae* in die *Streptococcus-viridans-/Streptococcus-mitis*-Gruppe. Idealerweise wird *Streptococcus pneumoniae* identifiziert durch serologische Techniken wie Omni-Serum, Agglutinationstest oder Serumtypisierung. Sofern keine serologischen Techniken verwendet werden, kann die Identifikation durch Bestimmung der Empfindlichkeit auf Optochin und/oder der Gallenlöslichkeit vervollständigt werden [20,68,90]. Neuere Methoden wie PCR-Tests für gezielte Proteine, darunter auch PLY und Pencillinbindungsprotein, trugen dazu bei, die Identifikation von kulturnegativen Fällen von Pneumonien zu verbessern [6,68,92].



**Abb. 1.** *Streptococcus pneumoniae* in BAL-Zytozentrifugenpräparaten eines Patienten mit Pneumokokkenpneumonie [42]. AM, Alveolarmakrophage, PMN, polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt.

### 1.3 Epidemiologische Verbreitung der Pneumokokkenkrankungen

*Streptococcus pneumoniae* ist ein wichtiges fakultativ humanpathogenes Bakterium, das bei etwa 50 % der gesunden Bevölkerung den oberen Respirationstrakt kolonisiert. Weltweit gehört die durch *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) verursachte Pneumokokkenpneumonie zu einer der häufigsten bakteriellen Infektionskrankheiten. Darüber hinaus ist *Streptococcus pneumoniae* gehäuft Ursache der Mittelohrentzündung (Otitis media) des Kleinkindes, der Pneumokokkenhirnhautentzündung (Meningitis) sowie der Pneumokokkenpneumonie älterer Menschen und immunkompromittierter Patienten, wie z.B. HIV-Patienten. Weiterhin können Pneumokokken Arthritiden und Peritonitiden verursachen. Die klinisch schlimmste Verlaufsform, die Pneumokokkensepsis, ist weltweit mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert [87].

### 1.4 Therapie der Pneumokokkeninfektion

Trotz umfangreicher zur Verfügung stehender Therapieoptionen gehören Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* zu den häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Zwei wesentliche Therapiestrategien bzw. prophylaktische Maßnahmen spielen in der Behandlung bzw. Vorsorge der Pneumokokkeninfektion eine wesentliche Rolle. Dies ist zum Einen die medikamentöse Therapie der Pneumokokkeninfektion mit Antibiotika, zum Anderen die Pneumokokkenimpfung. In der medikamentösen Therapie der Pneumokokkeninfektion stellen Penicillin G sowie Oralpenicilline seit Jahrzehnten die Antibiotika der Wahl dar. Seit vielen Jahren sind allerdings steigende Inzidenzen antibiotikaresistenter Pneumokokkeninfektionen weltweit zu verzeichnen. Durch Veränderung der Kapselpolysaccharide als Escape-Reaktion des Bakteriums auf verschiedene Antibiotika sind eine Vielzahl von Serotypen entstanden, die sich zunehmend der Therapie durch zurzeit verfügbare Antibiotika entziehen [5,6,34]. Insbesondere für immunsupprimierte Patienten sowie ältere Menschen spielt die Prophylaxe der Pneumokokkeninfektion durch Vakzination eine wichtige Rolle. Die zurzeit verfügbare Vakzine enthält Polysaccharidkapselantigene der 23 häufigsten

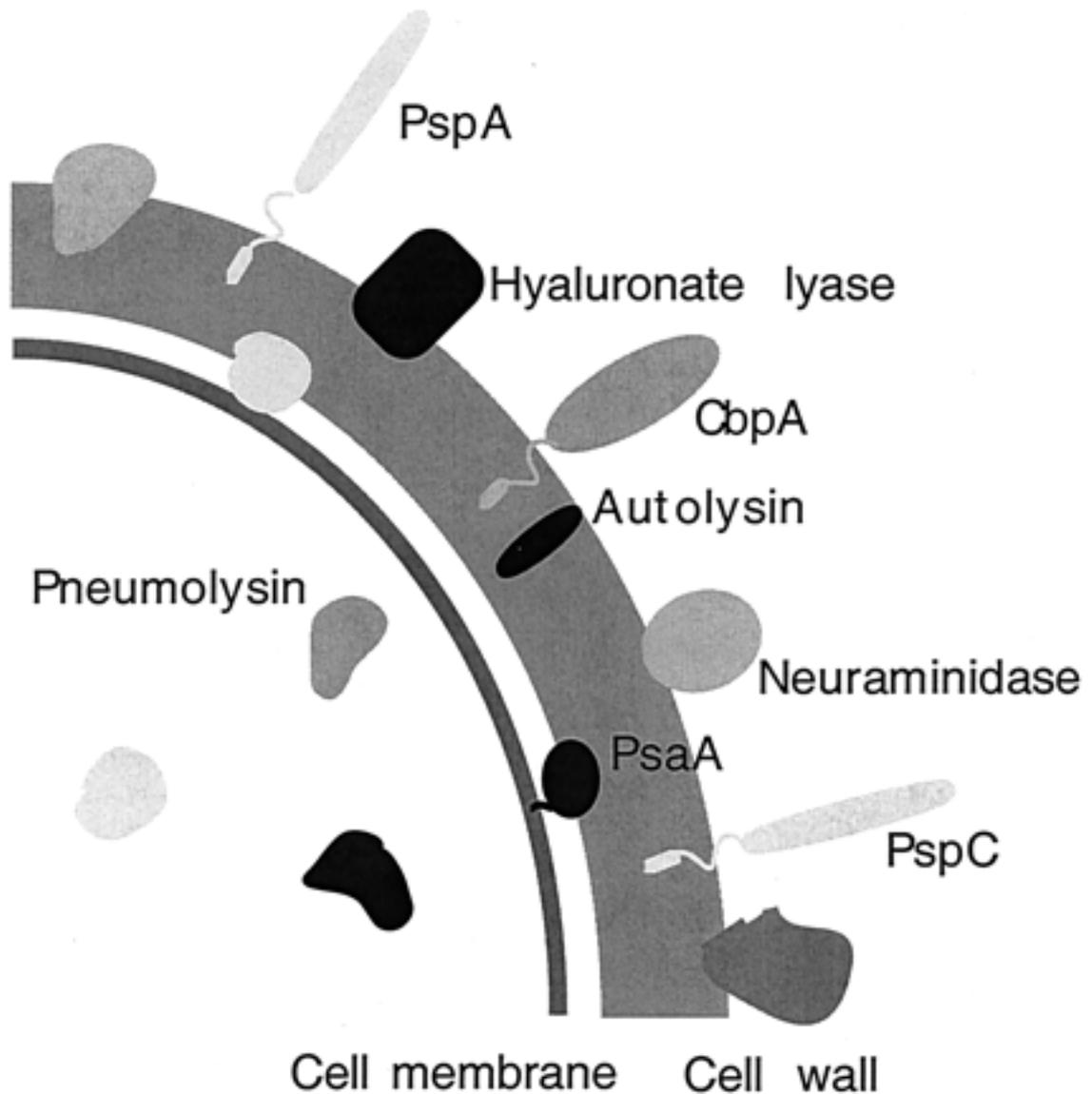
*Streptococcus-pneumoniae*-Serotypen, die für mehr als 90 % der Pneumokokkeninfektionen verantwortlich sind [49,71,78]. Einschränkender Aspekt dieser Pneumokokkenvakzination ist jedoch die Beobachtung, dass lediglich die invasive Pneumokokkenerkrankung (Pneumokokkensepsis), die häufig in Folge einer primären Pneumokokkenpneumonie entsteht, durch die Impfung attenuiert werden kann, nicht jedoch die primäre Pneumokokkenpneumonie selbst [12].

Neue Strategien in der Entwicklung wirksamer Pneumokokkenvakzine fokussieren auf das pneumokokkale Oberflächenprotein A (PspA), das von mehr als 95 % aller Pneumokokkenserotypen exprimiert wird. Aufgrund seiner hohen genetischen Stabilität könnte es eine potenzielle Bedeutung in der Induktion antigenspezifischer Antikörpersynthesen erlangen [15,16,17,66]. Ein weiterer Ansatzpunkt beruht auf der Entwicklung eines Konjugatvakzines aus einem polysaccharidalen und einem nicht-polysaccharidalen Anteil. Die Kombination dieser beiden Anteile könnte die Immunität erhöhen und das immunologische Gedächtnis verbessern helfen [3,15,42,66,71].

## **1.5 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae***

In der Pathogenese und dem Krankheitsverlauf der Pneumokokkeninfektion spielen Oberflächenproteine und -enzyme eine wichtige Rolle. Sie interagieren entweder direkt mit dem Wirt oder stellen Schutzfaktoren gegen die wirtseigenen Abwehrmechanismen dar [42]. Bis vor kurzer Zeit wurde die Polysaccharidkapsel als primärer Virulenzfaktor angesehen. Die Hauptfunktion der Kapsel besteht in der Inhibition der Phagozytose. Dies geschieht zum einen durch Verhinderung der Opsonisierung von *Streptococcus pneumoniae* durch Opsonine (C3), die im Verlauf der Komplementaktivierungskaskaden freigesetzt werden und zum anderen durch Maskierung verschiedener bakterieller Oberflächenantigene. Zugleich kommt der Pneumokokkenkapsel eine hohe Bedeutung in der Pneumokokkenbesiedlung des oberen Respirationstraktes zu. Ausgehend von einer lokalen, asymptomatischen Pneumokokkenkolonisation des oberen Respirationstraktes kann dann unter bestimmten, im Detail noch nicht geklärten Bedingungen, eine weitere Ausbreitung des Erregers in den terminalen

Respirationstrakt und von hier aus eine systemisch voranschreitende, invasive Pneumokokkenerkrankung erfolgen [39,46,48].



**Abb. 2** Schematische Darstellung der Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* [48]

Wie in Abb. 2 dargestellt, spielen neben der Kapsel noch zahlreiche weitere Virulenzfaktoren eine Rolle. Zu diesen gehören auch die pneumokokkalen Oberflächenenzyme Neuraminidase und Hyaluronidase, die eine wichtige Rolle in der epithelialen Besiedelung des oberen und unteren Respirationstraktes spielen. Die erstmalig von Duran-Reynals beschriebene Hyaluronidase wird bei der Autolyse freigesetzt [31]. Durch Degradierung der Matrixmoleküle erhöht sie

die Gewebeporosität und erleichtert die Pneumokokkeninvasion [73]. Die Neuraminidase demaskiert Sialinsäurereste auf der Zellmembran eukaryotischer Zellen und fördert somit die Pneumokokkenanheftung an Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstraktes [19,47,51]. Ein weiteres wichtiges pneumokokkales Oberflächenprotein ist das PspA. Es wird von allen klinisch wichtigen Serotypen exprimiert, besitzt große serologische Variabilität und die Fähigkeit zur Kreuzreaktion mit heterologen Stämmen. Aufgrund seiner besonderen intramolekularen elektrostatischen Ladungsverteilungen ist PspA in der Lage, die Opsonisierung von Pneumokokken durch wirtseigene Opsonine (C3b) zu antagonisieren. Es repräsentiert somit einen „Escape“-Mechanismus der Pneumokokken gegenüber dem Wirtskomplementsystem [16,26,75]. Analysen von Genomsequenzen zur Identifizierung von Proteinen mit einem PspA-ähnlichen Funktionsteil fanden PspC, ein Molekül, das bzgl. seiner Struktur und Funktion sowie in seinen Eigenschaften mit dem PspA eng verwandt ist [16].

Weiterhin zu den Virulenzfaktoren zählt das Pneumokokkenoberflächenantigen A (PsaA). Dintillac schreibt dem PsaA die Funktion zu,  $Mn^{2+}$  ins Zytoplasma von Bakterien zu transportieren. Im Gegensatz zu den anderen Oberflächenproteinen befindet sich das PsaA unterhalb der Peptidoglycanschicht und der Kapsel der Pneumokokken und ist deshalb vermutlich nicht an der Adhäsion der Bakterien an Zellen beteiligt [28].

Unter den Cholinbindungsproteinen spielt vor allem das Cholinbindungsprotein A (CbpA) eine wichtige Rolle bei der Adhärenz der Pneumokokken an Oberflächenproteine der Zielzellen. Mittels einer spezifischen Cholinbindung sind die Cholinbindungsproteine fest an das Bakterium gebunden, so dass diese Bindungsstellen der Interaktion mit dem wirtseigenen Immunsystem nicht mehr zur Verfügung stehen. Dadurch kommt den Cholinbindungsproteinen neben der Adhäsion zugleich die Funktion der Pneumokokkenoberflächenmaskierung zu [27,79].

An der Pathogenität der Pneumokokken beteiligt ist auch die lytische Amidase A (Lyt A), die verantwortlich für die Separation der Tochterzellen am Ende der Zellteilung ist [53]. Sie gehört der Gruppe der Autolysine an, einer Gruppe von

Enzymen, die direkt die Freisetzung von entzündungsinduzierenden pneumokokkalen Zellwandkomponenten, zu denen auch Pneumolysin (PLY) zählt, verursacht. Auf diese Weise stellt Lyt A zugleich auch einen Trigger für endogene Entzündungsantworten dar [52,93].

Jüngste Untersuchungen erbrachten darüber hinaus Evidenz für einen weiteren Virulenzfaktor, eine Zink-Metalloprotease (ZmpB), die die Fähigkeit zur Entzündungsinduktion im unteren Respirationstrakt besitzt [11].

## 1.6 Struktur und Funktion von Pneumolysin

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* ist PLY. PLY wird von allen klinisch bekannten *Streptococcus-pneumoniae*-Isolaten gebildet. Als intrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von 53 kD wird es durch Autolysin-induzierte Autolyse der Pneumokokken freigesetzt. PLY zählt zur Familie der cholesterolbindenden Toxine [70,94]. Es ist zytotoxisch für nahezu alle eukaryotischen Zellen, indem es an Cholesterol der Zellmembran bindet und eine aus ca. 30-50 Monomeren bestehende Transmembranpore mit einem inneren Durchmesser von ca. 30-45 nm in der Zellmembran der Zielzelle ausbildet. In der Folge entstehen Transmembranporen, die den Durchtritt von Ionen und zytoplasmatischen Proteinen aus dem Intrazellularraum zulassen und letztendlich zur Lyse der Zielzelle führen [1,10,13,37,69]. Aufgrund seiner für respiratorische Epithel- sowie Endothelzellen bereits nachgewiesenen Zytotoxizität ist PLY in der Lage, die pulmonale kapillär-endotheliale und alveoläre epitheliale Barriere zu zerstören. Dies führt regelhaft zur Entstehung proteinreicher pulmonaler Ödeme und erleichtert zugleich die Pneumokokkeninvasion [84,85,91]. Daneben trägt PLY zur Zerstörung von „tight junctions“ epithelialer Zellverbände bei und kann durch das Herabsetzen der Zilienschlagfrequenz zudem die mukoziliäre Clearancekapazität des Respirationstraktes reduzieren [33,74,91]. Neben seiner direkten zytotoxischen Aktivität zeigt PLY darüber hinaus komplementdepletierende Eigenschaften, die es ihm ermöglicht, die Opsonisierung von Pneumokokken durch wirtseigene Opsonine (C3) zu antagonisieren. Letztendlich resultiert eine attenuierte komplementabhängige bakterielle Clearance durch den Wirtsorganismus. Dadurch bedingt verlängert sich

die Überlebenszeit der Pneumokokken im Verlaufe der Infektion, was in der Folge die invasive Streuung von Pneumokokken im Blutgefäßsystem fördert [2,82]. Neben der Fähigkeit zur Komplementdepletion führen bereits niedrige Konzentrationen von PLY zu einer Aktivierung des Komplementsystems, ein Phänomen, das vermutlich auf die strukturelle Ähnlichkeit einer PLY-Domäne mit dem Fc-Fragment des IgG zurückzuführen ist [18,81,82]. Johnson et al. konnte weiterhin zeigen, dass PLY durch direkte Serumaktivierung neben einer generalisierten Entzündungsreaktion die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten zur Folge hat [43].

### **1.6.1 Bedeutung des Pneumolysin in der Pneumokokkeninfektion**

In zahlreichen Infektionsmodellen wurde die Rolle des PLY in der Pneumokokkeninfektion detailliert untersucht. Hierbei erfolgte im Wesentlichen die Untersuchung der Entzündungsresponse der Lunge auf intratracheale Instillation PLY-exprimierender versus PLY-defizienter Pneumokokken. Es konnte gezeigt werden, dass PLY-defiziente Pneumokokkenstämme eine reduzierte frühe intraalveoläre Bakterienkolonisierung sowie Bakterieninvasion in das Interstitium der Lunge und das Blutgefäßsystem aufweisen [25,45,67,82,83]. Malley et al. konnte in einer jüngst publizierten Studie nachweisen, dass PLY neben seinen zytotoxischen Eigenschaften als porenbildendes Toxin möglicherweise über den „Toll-like“-Rezeptor 4 (TLR4), einen „pattern-recognition“-Rezeptor (PRR) als Signaltransduktor in Entzündungszellen agieren kann [55]. Ähnliche Signaltransduktionsmechanismen sind bereits für Endotoxine Gram-negativer Bakterien seit langem beschrieben [22,40]. Eine Bestätigung der Befunde von Malley et al. steht allerdings bis dato noch aus.

### **1.6.2 Effekt des Pneumolysin auf Entzündungszellen *in vitro***

Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit subzytolytischen Konzentrationen von PLY *in vitro* einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom in neutrophile Granulozyten verursacht. Daneben aktiviert PLY die Phospholipase A2 und induziert die Sekretion proinflammatorischen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, die aus neutrophilen Granulozyten und/oder aus monozytären Phagozyten freigesetzt werden. Proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  und IL-

1 könnten durch Verstärkung der endogenen Entzündungsreaktion somit zur Schädigung des Wirtes im Sinne einer „systemic inflammatory response“ beitragen [8,14,23,24,41]. Vor dem skizzierten Hintergrund erscheint es daher wichtig, die Frage zu klären, inwieweit die durch PLY induzierte pulmonale Entzündungsantwort durch residente Phagozyten der Lunge (Alveolarmakrophagen) oder aber alveolär rekrutierte Leukozytenpopulationen (neutrophile Granulozyten und Monozyten) verstärkt wird.

## **1.7 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Charakterisierung der pulmonalen Entzündungsantwort auf intratracheale PLY-Applikation
2. Rolle residenter Alveolarmakrophagen in der PLY-induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion
3. Effekt der Blockade der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten auf die PLY-induzierte akute pulmonale Entzündung

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche BALB/c Mäuse mit einem Gewicht von 18-21 g und in einem Alter von 8-12 Wochen verwendet (Charles River Sulzfeld, Deutschland). Die Mäuse wurden vor und während der Experimente unter konventionellen Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

### 2.2 Verwendete Substanzen

#### 2.2.1 Pneumolysin und PdB

PLY wurde uns in einer internationalen Kooperation mit Prof. Dr. James Paton (Adelaide University, Australien) zur Verfügung gestellt. Rekombinantes natives PLY wurde aus *Escherichia coli* gewonnen und aufgereinigt [72]. PLY lag in einer Stammkonzentration von 1,8 mg/ml Protein vor. Die spezifische Aktivität der verwendeten PLY-Präparationen betrug  $8,25 \times 10^5$  HU (hemolytic units)/mg. Es lag in >95% reiner Form vor. Für *in-vivo*-Experimente wurde je 1  $\mu$ l PLY-Stammkonzentration (1,8 mg/ml) mit 2,6  $\mu$ l einer 50 % Glycerollösung (99 % Glycerol + PBS) im Verhältnis 1:2 gemischt. In dieser Zwischenverdünnung lag das PLY in einer Konzentration von 500 ng/ $\mu$ l vor und wurde für die Experimente mit 99  $\mu$ l PBS/0,1 % HSA verdünnt. Die so vorbereiteten Verbrauchsverdünnungen des PLY wurden innerhalb einer Stunde nach Fertigstellung *in vivo* zum Einsatz gebracht. Die pro Maus applizierte PLY-Konzentration betrug 40 ng/Maus (entsprechen etwa 33.2 HU/Maus).

Rekombinantes, aus *Escherichia coli* gewonnenes PdB, das nicht-zytotoxische Derivat des PLY (PLY mit einer Trp<sup>433</sup>-Phe-Mutation), wurde nach Aufreinigung [72] aus einer Stammlösung von 1,6 mg/ml für die intratracheale Applikation in korrespondierender Weise zu der des PLY vorbereitet. Die hämolytische Aktivität von PdB betrug  $< 5 \times 10^3$  HU/mg Protein.

### 2.2.2 Applikation funktionsblockierender Antikörper

Zur Evaluierung der Funktion neu alveolär rekrutierter neutrophiler Granulozyten und Monozyten in der PLY-induzierten akuten pulmonalen Inflammation der Maus wurden Mäuse vor intratrachealer Applikation des PLY bzw. des PdB mit funktionsblockierenden Antikörpern mit Spezifität für CD18 ( $\beta$ 2-Integrine) bzw. CD49d ( $\beta$ 1-Integrine) vorbehandelt. Nach Sedierung mittels intramuskulärer Ketanest<sup>®</sup>-Injektion erhielten die Mäuse entweder 100  $\mu$ g/Maus anti-CD18-Antikörper bzw. anti-CD49d-Antikörper alleine oder anti-CD18- und anti-CD49d-Antikörper kombiniert intravenös über die Schwanzvene injiziert. 15 Minuten nach Antikörpergabe wurden die Mäuse zur intratrachealen Applikation des PLY bzw. PdB in Narkose gelegt und wie unter 2.3. beschrieben behandelt.

Zur Blockierung der Monozytenrekrutierung erhielten die Mäuse 24h vor sowie während PLY-Gabe intraperitoneal 250  $\mu$ g/Maus anti-CCR2-Antikörper appliziert [59].

### 2.2.3 Herstellung von liposomalem Clodronat

Zur Klärung der Frage, welche Rolle residente Alveolarmakrophagen in der PLY-induzierten akuten pulmonalen Inflammation spielen, wurden in der vorliegenden Arbeit vor intratrachealer Applikation von PLY Alveolarmakrophagen mittels liposomalen Clodronats aus dem Alveolarraum der Lunge depletiert. Zur Herstellung der Clodronatlösung wurde 1,2 g Dichloromethylene-Diphosphorsäure in 5 ml sterilem PBS gelöst. Die Herstellung der zur Verpackung des Clodronats erforderlichen Liposomen erfolgte durch Mischung von 8 mg Cholesterin mit 86 mg Eiwissphosphatidylcholine in Chloroform und anschließender Evaporation der Chloroformphase unter Helium. Als nächstes erfolgte die Entfernung der Chloroformphase unter Vakuum in einem Savant<sup>®</sup>-SpeedVac-Konzentrator. 5 ml der Clodronatlösung wurden mit den hergestellten Liposomen vermischt und nach Ultraschallbehandlung bei 10.000 g für eine Stunde bei 4 °C in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Nach Resuspension der liposomalen Pellets in PBS erfolgte eine erneute Abzentrifugierung bei 10.000 g für eine Stunde bei 4 °C. Die so erhaltene liposomale Clodronatlösung wurde in 5 ml sterilem PBS aufgenommen und innerhalb von 48 h nach Herstellung weiterverarbeitet. Die Endkonzentration der liposomalen Clodronatkonzentration

betrug 5 mg/ml. Als Kontrolle kamen „leere“ Liposomen zur Verwendung, die durch Mischung der Liposomen mit sterilem PBS anstelle von Clodronatlösung hergestellt wurden.

## **2.3 Behandlung der Tiere**

### **2.3.1 Narkose**

Die Narkoseeinleitung der Mäuse erfolgte mittels intramuskulärer Applikation von ca. 50 µl einer 1:15 in Kochsalzlösung verdünnten Xylazinhydrochlorid-Stammlösung (Rompun<sup>®</sup>), das als Sedativum und Muskelrelaxans fungiert (Endkonzentration 2,5 mg/kg Körpergewicht). Die eigentliche Narkose wurde anschließend durch intramuskuläre Applikation von 50 µl einer 1:5 mit Kochsalz verdünnten Ketaminhydrochloridlösung (Ketanest<sup>®</sup>) (2,5 mg/kg Körpergewicht Endkonzentration) durchgeführt.

### **2.3.2 Intratracheale Instillation von Pneumolysin bzw. PdB**

Nach Narkoseeinleitung erfolgte die Operation in Rückenlage. Zuerst wurde die ventrale Halspartie rasiert und desinfiziert. Zum Freilegen der Trachea erfolgte eine kleine Hautinzision und das stumpfe Freipräparieren des darunter liegenden Weichteilgewebes. Mit einer 23G-Kanüle wurde die Trachea ca. 3-4 Trachealspangen unterhalb des Kehlkopfes punktiert und ein Venenverweilkatheter (Abbocath<sup>®</sup>, 26G) in die Trachea vorgeschoben. Nach Entfernung des Kathetermandrins erfolgte erneut die Überprüfung der korrekten Lage des Teflonkatheters. Die Mäuse erhielten unter Spontanatmung die inflammatorischen Stimuli in 10-µl-Aliquots unter Beachtung der Atmungsaktivität der Tiere intratracheal appliziert. Das Gesamtapplikationsvolumen betrug ca. 70-80 µl/Maus. Nach Beendigung der intratrachealen Instillation wurde der Venenverweilkatheter vorsichtig aus der Trachea entfernt und die Wunde nach erneuter Desinfektion mit zwei Einzelknopfnähten verschlossen.

### **2.3.3 Intratracheale Instillation von liposomalem Clodronat**

Zur Evaluierung der Funktion residenter Alveolarmakrophagen in der PLY-induzierten akuten pulmonalen Inflammation erfolgte vor Applikation des PLY die Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools mittels intratrachealer

Applikation von 100 µl liposomaler Clodronatlösung. Hierfür wurden die Mäuse, wie vorangehend beschrieben, mit Rompun® und Ketanest® in Narkose gelegt. Nach chirurgischer Freilegung der Trachea erfolgte die intratracheale Gabe der liposomalen Clodronatlösung in einem Gesamtvolumen von 100 µl entsprechend der intratrachealen Instillation von PLY und PdB. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Funktion residenter Alveolarmakrophagen in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation zeigten, dass die Applikation von 100 µl liposomaler Clodronatlösung zu einer mehr als 85%igen Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools führte [60,61]. 24 h nach erfolgter Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools wurden die Mäuse erneut in Narkose gelegt und erhielten die vorab beschriebene Intratrachealapplikation von PLY bzw. PdB.

### **2.3.4 Applikation funktionsblockierender anti-CD18- bzw. anti-CD49d-Antikörper sowie anti-CCR2-Antikörper**

Zur Evaluierung der Funktion alveolär rekrutierter neutrophiler Granulozyten bzw. Monozyten in der PLY-induzierten akuten pulmonalen Inflammation erhielten Mäuse unmittelbar vor intratrachealer PLY-Applikation intravenös anti-CD18- bzw. anti-CD49d-Antikörper mit Spezifität gegen  $\beta$ 2-Integrine bzw.  $\beta$ 1-Integrine (je 100 µg Antikörper/Maus) injiziert. In selektierten Experimenten erfolgte die kombinierte Gabe von je 100 µg anti-CD18- bzw. anti-CD49d-Antikörper zur simultanen Blockade  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Integrin-induzierter leukozytärer Rekrutierungspaths. Die Anti-CCR-Antikörper wurden intraperitoneal 24 h und unmittelbar vor PLY-Gabe appliziert in einer Dosis von 250 µg Antikörper/Maus. Bei denjenigen Experimenten, in denen PLY-Effekte auf die pulmonale Entzündungsresponse nach 48 h bzw. 72 h evaluiert werden sollten, wurden die Antikörpergaben in 24 h Abständen wiederholt.

## **2.4 Gewinnung von peripherem Blut und bronchoalveoläre Lavage**

### **2.4.1 Punktion der Vena cava zu Gewinnung von peripherem Blut**

Nachdem die Mäuse mit einer Überdosis Isofluran getötet wurden, erfolgte die Fixierung in Rückenlage, die Eröffnung der Bauchhöhle und die Punktion der

Vena cava inferior mit einer 23G-Kanüle. Es erfolgte die Entnahme von ca. 700-900 µl Blut. Zur Gewinnung von Serum wurde das geronnene Blut ca. 1 h nach Entnahme in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur bei ca. 3000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert und anschließend der erythrozytenfreie Serumüberstand abpipettiert und bei -20 °C eingefroren.

#### **2.4.2 Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Nach Tötung der Tiere mit einer Überdosis Isofluran und erfolgter Serumgewinnung erfolgte die Durchführung der BAL. Hierzu wurde die Hautnaht über der Trachea mittels einer Mikropräparierschere entfernt und das darunter liegende Gewebe stumpf disseziert. Nach Freilegung der Trachea erfolgte eine kleine Inzision zwischen zwei Knorpelspangen mittels Mikropräparierschere, über die eine auf ca. 1,5 cm gekürzte 21G-Kanüle eingeführt wurde. Diese wurde mit einem Vicrylfaden (4,0) durch Umschlingen von Tubus und Trachea fest fixiert und mit einer 1-ml-Insulinspritze verbunden, die zuvor mit 300 µl PBS/5 mM EDTA (pH 7.2) gefüllt worden war. Die Durchführung der BAL erfolgte in 300-µl-Aliquots bis zu einem initialen Lavagevolumen von 1,5 ml. Daraufhin erfolgte die Fortführung der BAL mit 500-µl-Aliquots bis zu einem zusätzlichen Volumen von 4,5 ml. Beide Lavagealiquots (1,5 ml und 4,5 ml) wurden bei 1400 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die zellfreien Überstände des 1,5-ml-Lavage-Aliquots dienten zur Bestimmung proinflammatorischer Zytokine und wurden in Aliquots á 500 µl bei -80 °C zur späteren Zytokinbestimmung eingefroren. Der Überstand der zweiten BAL-Suspension wurde dekantiert und die verbliebenen Zellen mit denen des zuvor gewonnenen 1,5-ml-Aliquots vereint. Mit Hilfe einer Neubauer<sup>®</sup>-Zählkammer erfolgte daraus die Ermittlung der Zellzahl.

#### **2.4.3 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten**

Zur morphologischen Differenzierung der komplexen BAL-Zellpopulationen erfolgte die Anfertigung von Zytozentrifugenpräparate. Hierfür wurden  $10^5$  Zellen aus der BAL bzw. separierte Zellen in 100 µl PBS mit Hilfe einer Zytozentrifuge 5 min bei 500 rpm auf vertikal montierte Objektträger zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Diese Präparate wurden danach 10 min in May-Grünwald-

(Eosin-Methylenblau-) Lösung fixiert und anschließend 5 min in Giemsa- (Azur-Eosin-Methylenblau-) Lösung (10 % v/v in Aqua dest.) angefärbt (Pappenheim-Färbung). Die differentielle lichtmikroskopische Auszählung der prozentualen Anteile an residenten Alveolarmakrophagen, alveolär rekrutierten neutrophilen Granulozyten bzw. alveolär rekrutierten alveolären Monozyten erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Endvergrößerung unter Verwendung eines Leica®-Lichtmikroskops.

## **2.5 Evaluierung der Pneumolysin-induzierten Lungenpermeabilität**

Zur Evaluierung der PLY-induzierten pulmonalen Schrankenstörung erhielten die Mäuse ca. 1 h vor Gewinnung des peripheren Blutes bzw. vor Durchführung der BAL eine intravenöse Injektion FITC-markierten Humanalbumins (1 mg/Maus in 100 µl PBS) via laterale Schwanzveneninjektion [58,61]. Nach Gewinnung des Serums und der BAL wurden die Serumproben (1:10 und 1:100 in PBS verdünnt, pH 7.4) sowie unverdünnte Aliquots der BALF auf eine 96-well-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der FITC-Intensität in einem Plattenfluoreszenzreader bei 488 nm Exzitations- und 525±20 nm Emissionswellenlänge. Das Maß der Lungenpermeabilität wurde anschließend kalkuliert aus dem Verhältnis der FITC-Fluoreszenzsignale der unverdünnten BALF versus 1:10 verdünnter Serumproben der gleichen Mäuse [58,60].

## **2.6 Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Die Bestimmung der Serum- bzw. BAL- Konzentration proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , MIP-2) erfolgte mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits. Die Absorptionmessung wurde bei 450 nm (Referenzwert: 570 nm) unter Verwendung eines ELISA-Plattenphotometers (Molecular Dynamics) durchgeführt. Die untere bzw. obere Nachweisgrenze für TNF- $\alpha$  lag bei 5 pg/ml BALF bzw. 1000 pg/ml BALF. Die Zytokinkonzentrationen in der BALF und korrespondierenden Serumflüssigkeit wurden in Doppelbestimmung quantifiziert.

## 2.7 Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die statistische Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Für  $p < 0.05$  wurden die Unterschiede als statistisch signifikant eingeordnet. Die statistischen Erhebungen erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSS<sup>®</sup> für MS Windows<sup>®</sup>.

---

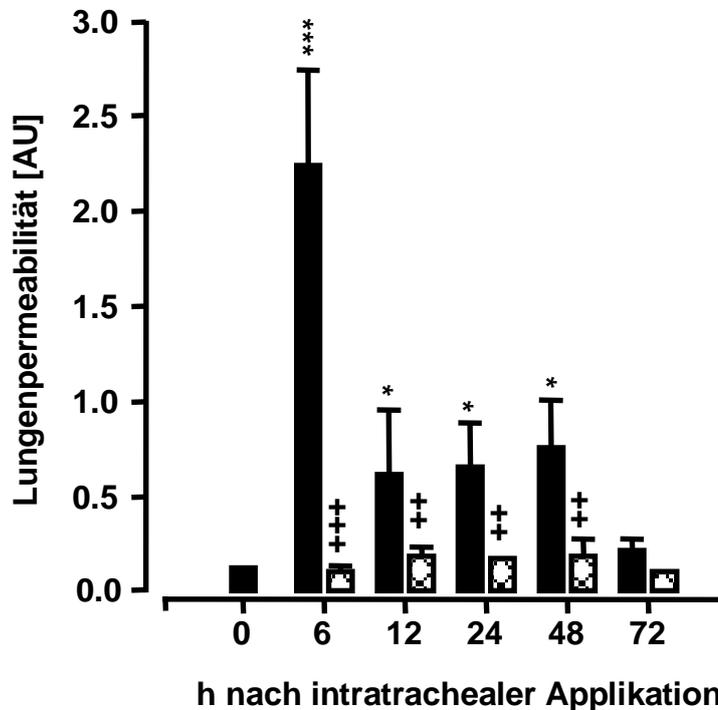
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Effekt von Pneumolysin auf die alveolär-kapilläre Permeabilität der Lunge

Frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnten bereits eine klare Evidenz für den zytotoxischen Effekt von PLY auf Alveolarepithelzellen und –endothelzellen *in vitro* erbringen [84,85,91]. Weitere Untersuchungen zum Effekt rekombinanten PLY auf die Induktion einer akuten pulmonalen Schrankenstörung nach intratrachealer Applikation in Mäusen wurden bisher in der Literatur nicht berichtet. Vorversuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die durch PLY getriggerte pulmonale Entzündungsresponse in einem sehr engen Dosis-Wirkungsbereich verlief: Während PLY in einer Dosis von 10 - 30 ng/Maus keine signifikante Entzündungsantwort in der Lunge induzierte, zeigten Dosen von > 40 ng PLY/Maus eine Mortalität von > 20 %. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Mäuse ausschließlich mit PLY-Dosen von 40 ng/Maus (= 33,2 HU/Maus) behandelt. Unter diesem Behandlungsregime kam es nur in vereinzelt Fällen zu einem vorzeitigen Versterben der Versuchstiere. Zur Evaluierung des Effekts von PLY und seines nicht-zytotoxischen Derivates PdB auf die Induktion einer akuten pulmonalen Schrankenstörung erhielten die Mäuse 40 ng PLY bzw. 40 ng PdB intratracheal appliziert und wurden nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h durch Isoflurangabe getötet und einer BAL unterworfen.

Wie Abb. 3 zeigt, war in unbehandelten Mäusen (0-h-Wert) keine pulmonale Schrankenstörung nachweisbar. Demgegenüber zeigten Mäuse 6 h nach intratrachealer Applikation von PLY, nicht aber von PdB, eine dramatisch gesteigerte Lungenpermeabilität, die 12 h post PLY-Applikation auf niedrigere Werte abfiel, aber immer noch signifikant im Vergleich zum 0-h-Wert erhöht blieb. Auch nach 24 h und 48 h blieben die Lungenpermeabilitätswerte in Mäusen post PLY-Applikation im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. 72 h nach intratrachealer PLY-Applikation war die pulmonale Permeabilität wieder auf Basalwerte zurückgegangen. Demgegenüber konnte zu keinem analysierten Zeitpunkt (6 h-

72 h) nach intratrachealer PdB-Applikation eine signifikant gesteigerte Lungenpermeabilität detektiert werden.

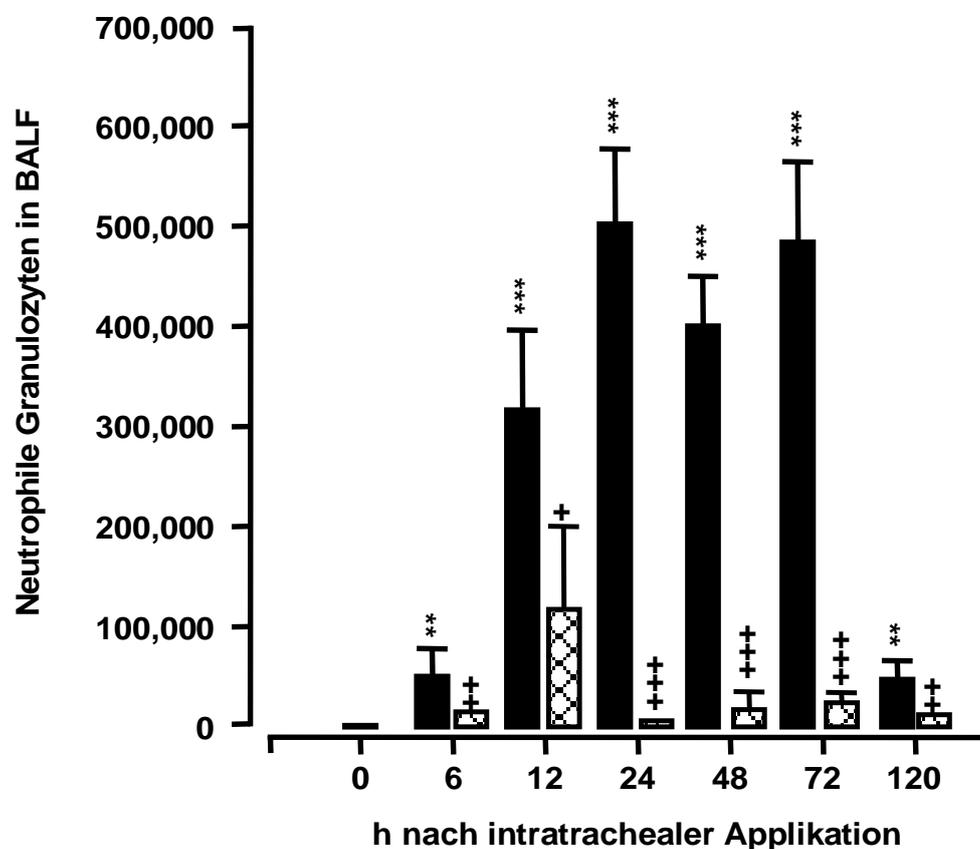


**Abb. 3 Effekt der intratrachealen Applikation von PLY versus PdB auf die pulmonale Schrankenstörung in Mäusen.** Die Applikation von PLY (schwarze Balken) induzierte eine frühe Schrankenstörung mit einem Maximum 6 h post Instillation, die bis zu 48 h nach Applikation signifikant erhöht blieb. Demgegenüber induzierte PdB (gestreifte Balken), das nicht-zytotoxische Derivat des PLY, zu keinem analysierten Zeitpunkt eine gesteigerte pulmonale Barrierestörung in Mäusen. [\*\*\* (\*) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle. +++ (++) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.01$ ) im Vergleich zur alleinigen Applikation von PLY]. Die Lungenpermeabilitätswerte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe).

### 3.2 Effekt der intratrachealen Pneumolysinapplikation auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum von Mäusen

Untersuchungen von Rijnveld et al. konnten bereits zeigen, dass die intratracheale Applikation von PLY bei Mäusen eine mäßiggrade Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das alveoläre Kompartiment induziert [77]. Diese Studie analysierte jedoch nicht die Kinetik der entzündlich getriggerten alveolären Leukozytenmobilisierung nach PLY-Applikation. In der vorliegenden Arbeit erhielten

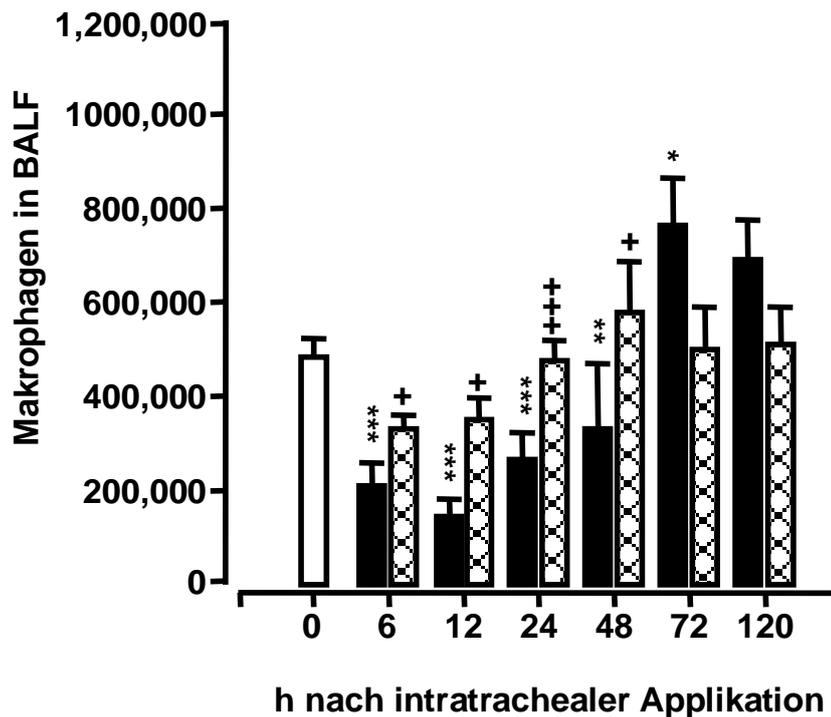
Mäuse intratracheal PLY bzw. PdB, das nicht-zytotoxische Derivat von PLY und wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 120 h) nach intratrachealer PLY- bzw. PdB-Instillation einer BAL zur Bestimmung alveolär rekrutierter neutrophiler Granulozyten unterzogen. Abb. 4 zeigt den Effekt der PLY- versus PdB-Applikation auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum von Wildtypmäusen. In der BALF un behandelter Mäuse (0-h-Zeitpunkt) waren keine neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Demgegenüber zeigte sich auf intratracheale PLY-Applikation eine signifikante Steigerung der neutrophilen Granulozyten in der BALF, die zwischen 24 h und 48 h post PLY-Applikation ihren Peak erreichte. Zu späteren Zeitpunkten gingen die analysierten Neutrophilenzahlen in der BALF wieder auf Basalniveau zurück. Die intratracheale Applikation von PdB zeigte im Gegensatz zur PLY-Applikation lediglich eine moderate, wenngleich auch signifikante, Steigerung der alveolären Akkumulation neutrophiler Granulozyten zum 12-h-Zeitpunkt post PdB-Instillation. Diese Steigerung war zu den späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar.



**Abb. 4 Effekt der PLY- versus PdB-Applikation auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum von Wildtypmäusen.** PLY führte zu einer Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum der Lunge bei Wildtypmäusen [\*\*\*(\*\*) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.01$ ) im Vergleich zur Kontrolle]. PdB, das modifizierte Derivat des PLY, zeigte nach intratrachealer Applikation keinen signifikanten Effekt auf die Zahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF. Lediglich nach 12 h war ein leichter Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Lavageflüssigkeit zu erkennen [+++(++ , +) bedeutet eine signifikante Reduzierung ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) im Vergleich zu PLY allein]. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten ist als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen den Werten nach PLY-Gabe (40 ng/Maus), gestreifte Säulen nach PdB-Gabe (40 ng/Maus).

### 3.3 Effekt der intratrachealen Pneumolysinapplikation auf den residenten Alveolarmakrophagenpool von Mäusen

Untersuchungen von Mariott et al. konnten einen Schädigungsmechanismus des PLY in Makrophagen *in vitro* nachweisen [56]. Bis dato lagen hingegen keine Erkenntnisse über den Effekt der PLY-Applikation auf den residenten Alveolarmakrophagenpool von Mäusen *in vivo* vor. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit neben der Analyse der PLY-induzierten alveolären Rekrutierung von Entzündungszellen der Effekt der PLY-Applikation auf den residenten Makrophagenpool der Lunge analysiert. Abb. 5 zeigt den Effekt der intratrachealen PLY-Applikation auf den residenten Alveolarmakrophagenpool in Mäusen. Der 0-h-Wert entspricht der Anzahl von Alveolarmakrophagen in der BALF unbehandelter Mäuse. Es ließ sich zeigen, dass die intratracheale Applikation von PLY bereits zu frühen Zeitpunkten post Applikation (6 h, 12 h) zu einer dramatischen und hochsignifikanten Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools führte. Dieser Depletion des Alveolarmakrophagenpools, der auch nach 24 h signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt war, folgte eine zu späteren Zeitpunkten (72 h, 120 h) gemessene Reexpansion des Alveolarmakrophagenpools. 72 h nach PLY-Applikation lag dieser sogar noch deutlich über dem Ausgangsniveau. Demgegenüber zeigte die PdB-Applikation in Wildtypmäusen keine signifikante Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen. Eine Reexpansion des Alveolarmakrophagenpools zu späteren Zeitpunkten (48 h, 72 h, 120 h) konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

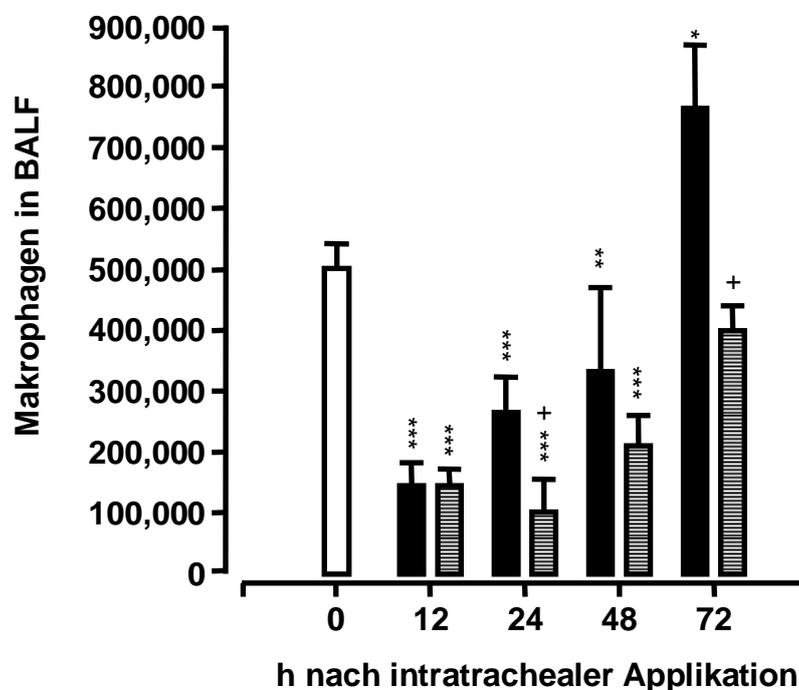


**Abb. 5 Effekt der intratrachealen PLY- bzw. PdB-Applikation auf den residenten Alveolarmakrophagenpool von Mäusen.** Im Gegensatz zu PdB führte die Gabe von PLY zu einer deutlichen Depletion des Alveolarmakrophagenpools, die gefolgt von einer Reexpansion desselbigen war [\*\*\* (\*\*, \*) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe; +++ (+) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu PLY behandelten Mäusen.]. Die Anzahl Alveolarmakrophagen in der BALF sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen den nach PLY-Applikation (40 ng/Maus) gemessenen Werten. Die gestreiften Säulen geben die Zahl der Alveolarmakrophagen in der BALF nach PdB-Gabe (40 ng/Maus) wieder.

### 3.4 Effekt der systemischen Applikation funktionsblockierender anti-CCR2-Antikörper auf den alveolären Makrophagenpool in Pneumolysin- bzw. PdB-behandelten Mäusen

Die Beobachtung, dass die intratracheale Applikation von PLY zu einer drastischen Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools im Vergleich zu unbehandelten Kontrollmäusen führte, gefolgt von einer signifikanten Reexpansion des residenten Alveolarmakrophagenpools 72 h bzw. 120 h post PLY-Applikation, legte die Vermutung nahe, dass die Repopularisierung des Alveolarraums mit Makrophagen nach PLY-Applikation aus der Rekrutierung zirkulierender Blutmonozyten aus dem Gefäßbett in das alveoläre Kompartiment der

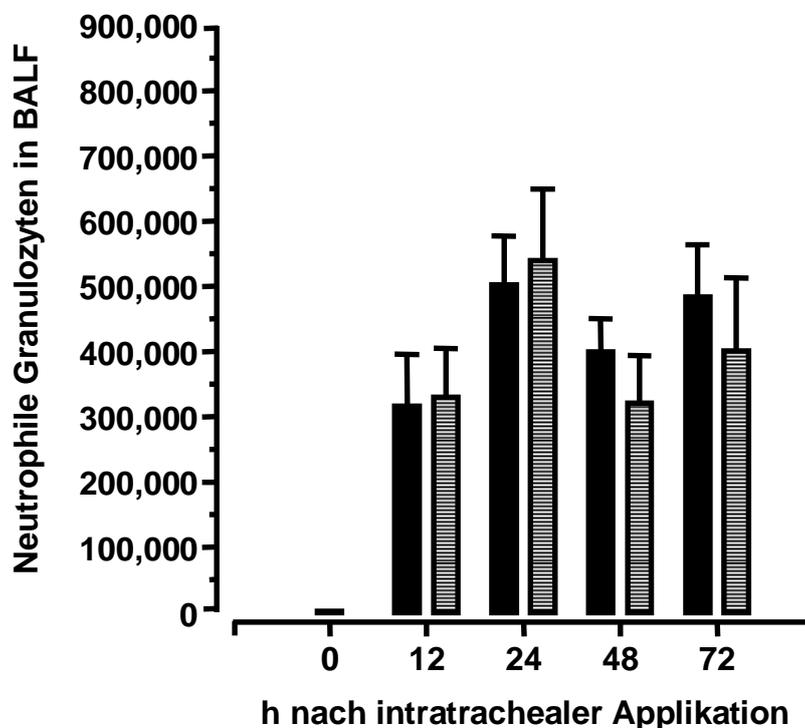
Lunge resultiert. Zur Überprüfung dieser Hypothese erhielten Mäuse vor Applikation von PLY eine intraperitoneale Applikation des funktionsblockierenden anti-CCR2-Antikörpers MC21 [54]. Anschließend wurden die Mäuse nach 6 h, 12 h, 24 h, 48 h bzw. 72 h zur Bestimmung der Anzahl residenter Alveolarmakrophagen einer BAL unterworfen. Wie in Abb. 6 zu sehen ist, zeigten Mäuse, die vor intratrachealer PLY-Applikation eine systemische Vorbehandlung mit dem anti-CCR2-Antikörper MC21 erhalten hatten, eine signifikant attenuierte Makrophagenrepopularisierung im Vergleich zu allein mit PLY behandelten Mäusen. Die Repopularisierung des Alveolarmakrophagenpools war im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bis zum Zeitpunkt 48 h post PLY-Applikation stark signifikant reduziert und zeigte auch zum 72-h-Zeitpunkt post PLY-Applikation noch signifikant reduzierte Werte im Vergleich zu alleiniger PLY-Applikation. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der Repopulierung des Alveolarraums mit Alveolarmakrophagen in der Folge einer PLY-induzierten Alveolarmakrophagendepletion eine *de-novo*-Rekrutierung zirkulierender Blutmonozyten aus dem Gefäßbett in das alveoläre Kompartiment zugrunde liegt.



**Abb. 6** Effekt der anti-CCR2-Antikörper-Applikation auf die Reexpansion des Alveolarmakrophagenpools nach PLY-Gabe. Die intraperitoneale Appli-

kation des anti-CCR2-Antikörpers MC21 führte zu einer signifikanten Attenuierung der alveolären Makrophagenrepopulierung nach PLY-Gabe. [\*\*\* (\*\*,\*) bedeutet  $p < 0.001$  ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle, + zeigt eine signifikant reduzierte Makrophagenzahl ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu PLY-behandelten Mäusen]. Die Anzahl der Makrophagen in der BALF sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen Werten nach PLY-Applikation (40 ng/Maus), gestreifte Säulen zeigen die Werte nach Vorbehandlung mit anti-CCR2-Antikörper MC21.

Wie Abb. 7 zeigt, entsprach das Ausmaß der alveolären Neutrophilenrekrutierung in PLY-behandelten Mäusen dem in anti-CCR2- plus PLY-behandelten Mäusen. Hieraus lässt sich ableiten, dass die systemische Gabe von anti-CCR2-Antikörpern, die zu einer attenuierten Reexpansion des Alveolarmakrophagenpools auf PLY-Applikation führte, keinen Einfluß auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum hat. Insbesondere lassen die vorliegenden Daten erkennen, dass die durch intratracheale PLY-Applikation in Mäusen induzierte Neutrophilenalveolitis nicht abhängig ist von der Ko-Migration zirkulierender Monozyten in das alveoläre Kompartiment.



**Abb. 7** Effekt der anti-CCR2-Antikörpergabe auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum von Mäusen. Die systemische

Vorbehandlung von Mäusen mit anti-CCR2-Antikörpern zeigte keinen Effekt auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum der Lunge. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (5 Tieren pro Zeitpunkt und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen der Anzahl neutrophiler Granulozyten nach Gabe von 40 ng PLY, gestreifte Säulen geben die entsprechenden Werte in mit anti-CCR2-Antikörpern vorbehandelten Mäusen wieder.

### **3.5 Effekt der intratrachealen Pneumolysin-Applikation auf die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren im alveolären Kompartiment**

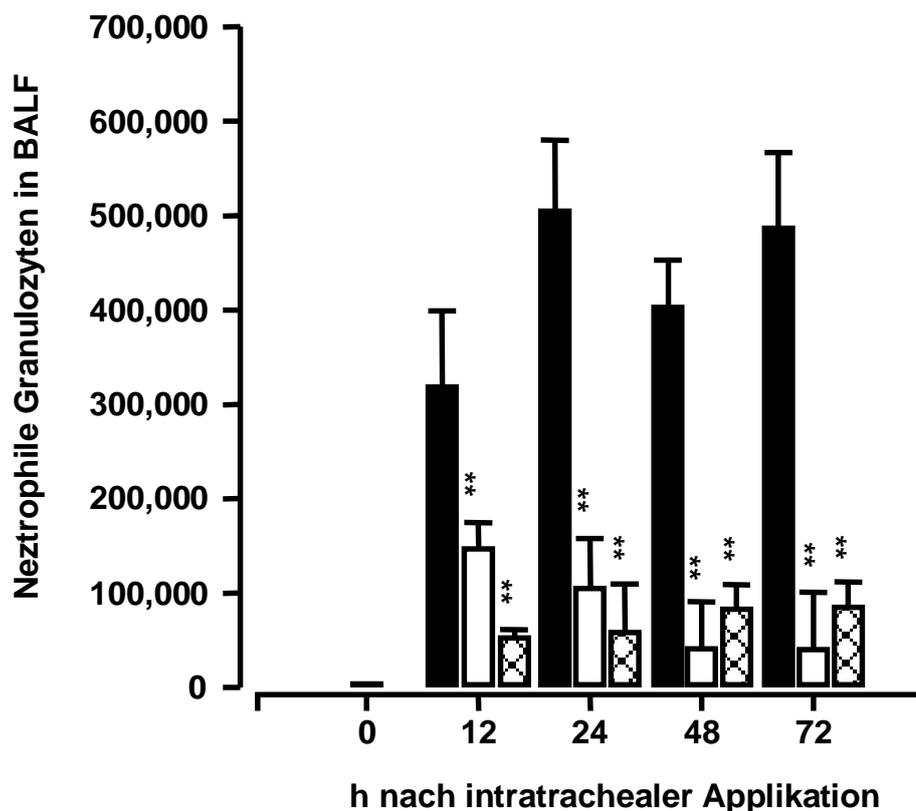
In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die intratracheale Applikation von Toxinen Gram-negativer Bakterien (Endotoxine) zu einer drastischen Steigerung der proinflammatorischen Zytokinsekretion, insbesondere der Zytokine TNF- $\alpha$  und MIP-2, im alveolären Kompartiment führte [63]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit den Effekt der intratrachealen Applikation von PLY als Virulenzfaktor Gram-positiver Erreger auf die intraalveoläre TNF- $\alpha$ - und MIP-2-Freisetzung. In der BALF unbehandelter Mäuse ließ sich kein TNF- $\alpha$  nachweisen. Auch 6 h, 12 h und 24 h nach PLY-Applikation war nur eine marginale Sekretion von TNF- $\alpha$  im alveolären Kompartiment zu erkennen (6 h:  $6 \pm 8$  pg/ml; 12 h:  $20 \pm 40$  pg/ml, 24 h:  $1 \pm 2$  pg/ml). Ähnliche Daten konnten auch für die Freisetzung des Neutrophilen-Chemokins MIP-2 erbracht werden. Kontrollmäuse zeigten eine basale MIP-2-Konzentration in der BALF von  $45 \pm 37$  pg/ml, die nach PLY-Applikation auf Werte von  $146 \pm 84$  pg/ml nach 6 h,  $69 \pm 42$  pg/ml nach 12 h und  $12 \pm 3$  pg/ml nach 24 h anstiegen. Diese Daten verdeutlichen, dass die intratracheale Applikation von PLY, welches eine dramatische Depletion des Alveolarmakrophagenpools zur Folge hatte, nicht mit einer erheblichen intraalveolären Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  oder MIP-2 einhergeht.

### **3.6 Effekt der Applikation funktionsblockierender anti-CD18- bzw. anti-CD49d-Antikörper auf die Pneumolysin-induzierte alveoläre Leukozytenrekrutierung und konsekutive Schrankenstörung**

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass der pneumokokkale Virulenzfaktor PLY erhebliche zytotoxische Effekte sowohl auf

sessile Barrierezellen in der Lunge (Endothelzellen, Epithelzellen) wie auch zirkulierende Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten) ausübt [13,84,85,91]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass PLY in subzytolytischen Konzentrationen eine proinflammatorische Mediatorsynthese in neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten induziert [8,14,23,24,41]. Hieraus leitet sich die Hypothese ab, dass PLY nicht nur zytotoxische Effekte auf Targetzellen ausübt, sondern darüber hinaus auch in subzytolytischen Konzentrationen zu einer Aggravierung der pulmonalen Entzündungsresponse mit konsekutiver Schrankenstörung führen kann. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse vor intratrachealer Applikation von PLY mit funktionsblockierenden Antikörpern mit Spezifität für  $\beta$ 2- bzw.  $\beta$ 1-Integrine vorbehandelt, um die PLY-induzierte alveoläre Leukozytenrekrutierung zu supprimieren und so den Effekt der Blockade alveolärer Leukozytenrekrutierung auf das Ausmaß der PLY-induzierten pulmonalen Permeabilitäts-erhöhung zu untersuchen. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere das  $\beta$ 2-Integrin CD18 ein wichtiges Adhäsionsmolekül in der Endotoxin-induzierten alveolären Leukozytenrekrutierung ist. Auch CD49d spielt bei der Endotoxin-induzierten pulmonalen Leukozytenrekrutierung eine bedeutende Rolle [57]. Es scheint allerdings für die Monozytenrekrutierung von größerer Relevanz zu sein als für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten ins Alveolarkompartiment der Lunge. Doerschuk et al. konnte zeigen, dass in der Pneumokokkenpneumonie im Gegensatz zur *Escherichia-coli*-induzierten Pneumonie CD18-abhängige Rekrutierungs- pathways für die alveoläre Leukozytenrekrutierung von untergeordneter Bedeutung sind [29]. Hieraus entwickelte sich über viele Jahre die Hypothese, dass *Streptococcus-pneumoniae*-induzierte Leukozytenrekrutierungsprozesse CD18-unabhängigen Rekrutierungsmechanismen folgen, während in der *Escherichia-coli*-induzierten pulmonalen Infektion CD18-abhängige Rekrutierungs- pathways dominieren [29,38,57]. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse vor intratrachealer PLY-Applikation entweder mit anti-CD18-Antikörpern alleine vorbehandelt oder erhielten kombiniert anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörper appliziert zur Blockade potenziell alternativer

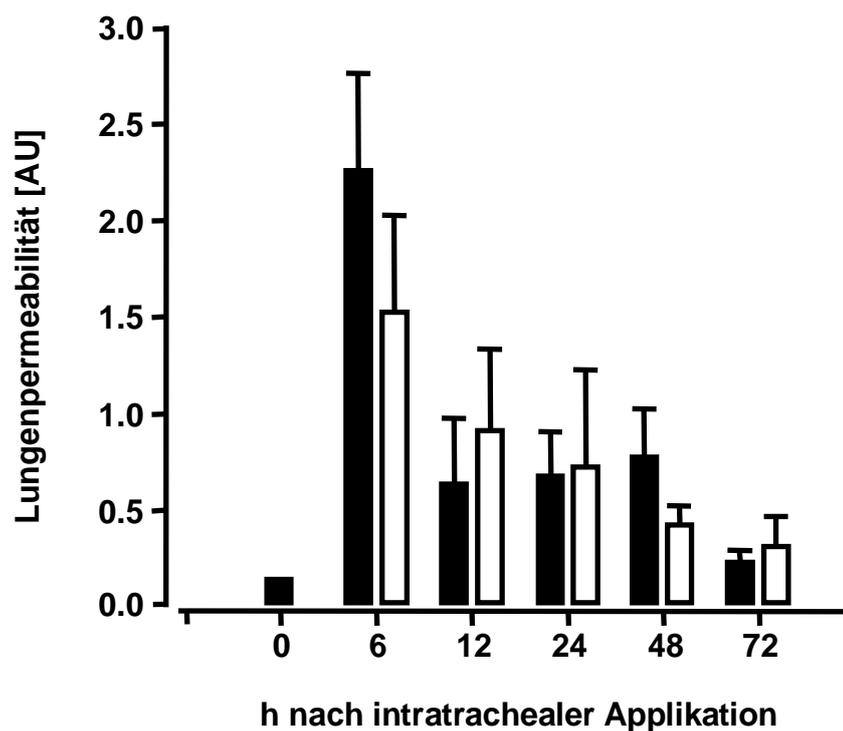
Rekrutierungspaths der alveolären Leukozytenrekrutierung auf PLY-Provokation. Wie Abb. 8 zeigt, induzierte bereits die alleinige Applikation von anti-CD18-Antikörpern eine signifikante Reduktion der alveolären Akkumulation neutrophiler Granulozyten in PLY-behandelten Mäusen, die zum Zeitpunkt 48 h bzw. 72 h nach PLY-Applikation eine maximale Attenuierung aufwies. Darüber hinaus zeigte sich bei den Mäusen, die eine kombinierte Antikörperapplikation (anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörper) vor PLY-Instillation erhalten hatten, eine weitere Reduktion der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, deren Anzahl nun nahezu den Basalwerten in unbehandelten Mäusen entsprach. Diese Daten belegen eindeutig, dass die PLY-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten von  $\beta$ 2-Integrin-abhängigen (CD18) Rekrutierungspaths dominiert wird und dass  $\beta$ 1-Integrin-abhängige Pathways (CD49d) ebenfalls partiell zur alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auf PLY beitragen



**Abb. 8 Effekt adhäsionsblockierender Antikörper auf die PLY-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten.** 12 h - 72 h post PLY-Applikation konnte die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in Anwesenheit funktionsblockierender anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörper maximal auf über 85 %

supprimiert werden. Die entsprechenden Werte nach Kombination von anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörpergabe vor PLY-Applikation sind in Form gestreifter Säulen dargestellt. \*\* bedeutet  $p < 0,01$  im Vergleich zu PLY allein. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BALF sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitraum und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen den Werten nach alleiniger PLY-Gabe. Weiße Säulen geben die ermittelten Werte in nur mit anti-CD18-Antikörpern behandelten Mäusen an.

Wie Abb. 9 zeigt, ließ sich in Mäusen nach systemischer Vorbehandlung mit anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörpern und nachfolgender intratrachealer PLY-Applikation keine nennenswerte Reduktion der PLY-induzierten Lungenpermeabilität zu den analysierten Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach PLY-Applikation erkennen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten keinen nennenswerten Beitrag zur PLY-induzierten pulmonalen Permeabilitätserhöhung leisten.

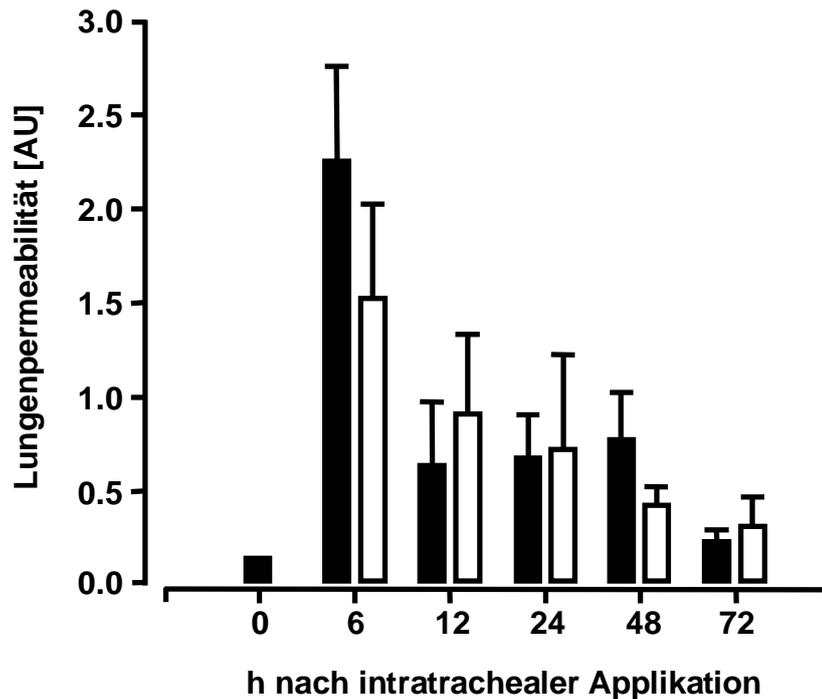


**Abb. 9 Effekt adhäsionsblockierender Antikörper auf die PLY-induzierte pulmonale Schrankenstörung.** Die Vorbehandlung von Mäusen mit anti-CD18- plus anti-CD49d-Antikörpern (weiße Balken) gefolgt von intratrachealer Applikation von PLY erbrachte gegenüber alleinig mit PLY behandelten Mäusen (schwarze Balken) keine signifikante Reduktion der PLY-induzierten pulmonalen Schrankenstörung. Die Permeabilitätswerte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitraum und Behandlungsgruppe).

### **3.7 Die Relevanz residenter Alveolarmakrophagen bei der Pneumolysin-induzierten akuten Schrankenstörung der Lunge**

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits in früheren Untersuchungen zeigen konnte, spielen residente Alveolarmakrophagen in der Endotoxin-induzierten akuten pulmonalen Inflammation eine zentrale Rolle als Initiatoren des lokalen Entzündungsgeschehens. Die Depletion residenter Alveolarmakrophagen mittels liposomalen Clodronats führte nicht nur zu einer signifikanten Reduktion der frühen proinflammatorischen Zytokinfreisetzung im alveolären Kompartiment, sondern bewirkte darüber hinaus eine drastische Reduktion der Endotoxin-induzierten alveolären Akkumulation neutrophiler Granulozyten [61]. Diese Beobachtungen verdeutlichen den hohen Stellenwert von Alveolarmakrophagen als Initiatoren Endotoxin-getriggelter pulmonaler Entzündungskaskaden. In der vorliegenden Arbeit wurden Mäuse vor PLY-Applikation mit liposomalem Clodronat behandelt, um die PLY-induzierte akute Entzündungsantwort in Abwesenheit residenter Alveolarmakrophagen zu evaluieren. Ähnlich wie in bereits publizierten Untersuchungen zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass die Applikation liposomalen Clodronats in den Alveolarraum von Mäusen zu einer > 85 % Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools führte [61]. Bemerkenswerterweise führte jedoch die Depletion residenter Alveolarmakrophagen vor Applikation von PLY in das alveoläre Kompartiment nicht zu einer Reduktion der akuten Lungenschädigung, gemessen am Übertritt FITC-markierten Albumins aus dem Gefäßbett in das alveoläre Kompartiment (Abb. 10). Wie in Abb. 10 zu sehen ist, zeigte die beobachtete Reduktion der Lungenpermeabilität in Clodronat- plus PLY-behandelten Mäusen 6 h nach Behandlung keinen statistisch signifikanten Unterschied zu Mäusen, die nur PLY erhalten hatten und noch über einen regulären residenten Alveolarmakrophagenpool zum Zeitpunkt der PLY-Instillation verfügten. Wie in den vorherig beschriebenen Befunden der PLY-induzierten Schrankenstörung zeigten auch Clodronat-vorbehandelte Mäuse zum Zeitpunkt 12 h, 24 h und 48 h nach PLY-Applikation eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigerte Lungenpermeabilität, die durch die vorausgehende Depletion residenter Alveolarmakrophagen nicht reduziert wurde. 72 h nach der PLY-Behandlung war die erhöhte pulmonale Permeabilität auf das

Ausgangsniveau bei unbehandelten Mäusen zurückgekehrt. Diese Daten lassen erkennen, dass die Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools keinen Effekt auf die PLY-induzierte pulmonale Permeabilitätserhöhung hat und somit residente Alveolarmakrophagen an der PLY-induzierten pulmonalen Schrankenstörung nicht beteiligt sind.

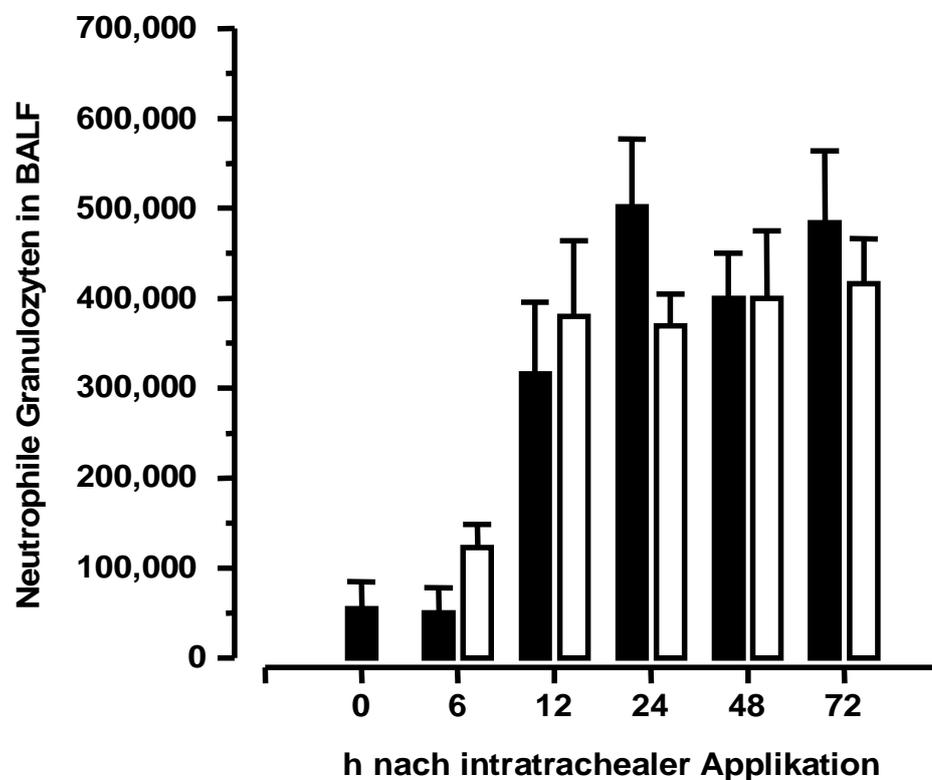


**Abb. 10 Effekt der Depletion residenter Alveolarmakrophagen auf die PLY-induzierte Schrankenstörung bei Mäusen.** Die vor PLY-Applikation durchgeführte Depletion residenter Alveolarmakrophagen durch liposomales Clodronat (weiße Balken) zeigte im Vergleich zur alleinigen PLY-Applikation (schwarze Balken) keinen signifikanten Effekt auf die PLY-induzierte alveolär-kapilläre Schrankenstörung der Lunge. Die Lungenpermeabilitätswerte sind als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitraum und Behandlungsgruppe). Schwarze Säulen entsprechen den Werten nach PLY-Gabe. Weiße Säulen geben die Werte nach vorheriger Zerstörung des Alveolarmakrophagenpools mittels liposomalen Clodronats an.

### 3.8 Effekt der Depletion residenter Alveolarmakrophagen auf die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Pneumolysin-behandelten Mäusen

Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools in der Endotoxin-getriggerten pulmonalen Inflammation mit

einer signifikanten Reduktion der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten einhergeht [61]. Analog zu diesen Befunden wurde in der vorliegenden Arbeit das Ausmaß der alveolären Neutrophilenrekrutierung bei Clodronat- plus PLY-vorbehandelten Mäusen analysiert. Es ergab sich dabei kein Hinweis auf eine signifikante Beteiligung residenter Alveolarmakrophagen an der PLY-induzierten pulmonalen Neutrophilenakkumulation. Wie Abb. 11 zeigt, war bei Mäusen, die lediglich liposomales Clodronat zur Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools erhielten (0-h-Zeitpunkt), eine schwache Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zu beobachten. Der alleinigen PLY-Applikation folgte, wie zuvor schon in Abb. 2 beschrieben, das typische Muster einer alveolären Neutrophilenrekrutierung mit einem Maximum 24 h bis 72 h post PLY-Applikation. Bei Mäusen, die zunächst mittels liposomalen Clodronats Alveolarmakrophagen-depletiert wurden und die anschließend intratracheal PLY appliziert bekamen, zeigte sich bzgl. der Neutrophilenrekrutierung kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu alleinig mit PLY behandelten Mäusen.



**Abb. 11** Effekt der Clodronat-induzierten Alveolarmakrophagendepletion auf die PLY-induzierte Neutrophilenrekrutierung bei Mäusen. Die der PLY-

Applikation vorausgehende Depletion des Alveolarmakrophagenpools mittels Clodronat (weiße Balken) zeigte in dem beobachteten Zeitraum von 12 h bis 72 h nach PLY-Gabe im Vergleich zur alleinigen PLY-Applikation keinen Effekt auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der Lunge von Mäusen. Die Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben (5 Tiere pro Zeitraum und Behandlungsgruppe).

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der durch den pneumokokkalen, zytotoxischen Virulenzfaktor PLY induzierten Entzündungsantwort der Lunge. PLY induzierte, im Gegensatz zu PdB, seinem nicht-zytotoxischen Derivat, nach intratrachealer Applikation eine massive Schädigung der pulmonalen endo-epithelialen Barriere. Darüber hinaus bewirkte die intratracheale Applikation von PLY eine drastische Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools, der im Verlauf der Entzündung durch eine CCR2-abhängige *de-novo*-Rekrutierung zirkulierender Monozyten aus dem Gefäßbett der Lunge in den Alveolarraum repopuliert wurde. Zur Klärung der Frage, inwieweit neu rekrutierte Leukozyten versus residente Alveolarmakrophagen an der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung beteiligt sind, wurden Mäuse vor PLY-Gabe mit funktionsblockierenden Antikörpern mit Spezifität für  $\beta$ 2- und  $\beta$ 1-Integrine vorbehandelt oder erhielten liposomales Clodronat zur Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung der Mäuse mit funktionsblockierenden anti- $\beta$ 1- bzw. anti- $\beta$ 2-Integrin-Antikörpern keinerlei Effekt hinsichtlich der PLY-induzierten Lungenschädigung hatte. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools mittels liposomalen Clodronats die PLY-induzierte akute Lungenschädigung nicht attenuierte. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht somit, dass die sich regelhaft auf PLY-Applikation entwickelnde akute Lungenschädigung primär auf den zytotoxischen Effekt dieses pneumokokkalen Virulenzfaktors zurückzuführen ist. Eine Aggravierung der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung durch neu rekrutierte Leukozyten bzw. residente Alveolarmakrophagen konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

PLY ist einer der wichtigsten zytotoxischen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* und wird von allen klinischen Pneumokokkenisolaten gebildet. Die alleinige Applikation von PLY in die Lunge von Mäusen induziert histopathologische Veränderungen vergleichbar denen einer Pneumokokkenpneumonie [70,82,83]. Bereits frühere Untersuchungen von Rubins et al. und Rijnveld et

al. legten dar, dass die primäre Entzündungsresponse der Lunge auf PLY-Applikation zu einer Destruktion der alveolär-kapillären Barriereintegrität der Lunge mit konsekutiver Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum führt [77,82]. *In-vitro*-Studien mit PLY konnten darüber hinaus zeigen, dass die Stimulation neutrophiler Granulozyten sowie mononukleärer Phagozyten mit subzytolytischen Konzentrationen von PLY eine verstärkte Freisetzung potenter proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 induziert [23,24,41]. Studien von Braun et al. und Baba et al. demonstrierten, dass die Stimulation von Makrophagen durch PLY via IFN- $\gamma$  zu einer verstärkten NO-Freisetzung führt, die auf der einen Seite antimikrobielle Effekte hat, auf der anderen Seite aber auch den Wirt selbst schädigen kann [4,14]. Jüngste Daten belegen darüber hinaus, dass PLY als PAMP (pathogen-associated molecular pattern) über „pattern-recognition“-Rezeptoren wie TLR4 intrazelluläre Signalt-ransduktionen in Entzündungszellen induzieren und somit zu einer gesteigerten Freisetzung von TNF- $\alpha$  führen können [55]. Diese Befunde bieten eine mögliche Erklärung für die zuvor von Cockeran et al. und Malley et al. gemachten Beobachtungen der proinflammatorischen Mediatorsynthese in PLY-stimulierten Granulozyten und Monozyten [23,24]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob inflammatorisch rekrutierte Leukozyten bzw. residente Alveolarmakrophagen der Lunge an der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung beteiligt sind oder aber diese aggravierern.

#### **4.1 Effekt des Pneumolysin auf die alveolär-kapilläre Barriereintegrität der Lunge**

Frühere Untersuchungen konnten bereits einzelne Aspekte der pulmonalen Entzündungsantwort auf intratracheale PLY-Applikation erarbeiten [77]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen keine systematische Charakterisierung des akuten Entzündungsverlaufs auf PLY-Applikation vorgenommen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die PLY-induzierte Entwicklung des akuten Lungenschadens in Abhängigkeit von der Zeit systematisch untersucht. Analog dazu erfolgte die Durchführung von Experimenten mit dem nicht-zytotoxischen Derivat des PLY, dem PdB. PdB weist im Vergleich zu PLY in der vierten Domäne des Proteinmonomers einen Aminosäureaustausch auf (PLY mit einer

Trp<sup>433</sup>-Phe-Mutation), der bewirkt, dass die Toxinmonomere zwar noch an Cholesterin der Zellmembran binden können, aber ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung in Transmembrankanäle verloren haben. Hierdurch verliert PdB seine zytotoxischen Aktivitäten und stellt aufgrund der nahezu identischen Strukturhomologie zugleich eine ideale Kontrolle zu PLY dar. In der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass PLY im Vergleich zu PdB zu einer drastischen Erhöhung der Lungenpermeabilität führte. Insbesondere zwei Mechanismen scheinen für diese PLY-abhängige Steigerung der pulmonalen Permeabilität verantwortlich zu sein: Zum einen wurde in der Literatur bereits vielfach dokumentiert, dass PLY aufgrund seiner Transmembranporenbildung einen unmittelbaren zytotoxischen Effekt auf verschiedene Zellpopulationen, darunter auch Endothel-, und Epithelzellen, ausübt [13,84,85]. Darüber hinaus konnte Rayner et al. 1995 erstmalig nachweisen, dass PLY zu einer Destruktion der epithelialen „tight junctions“ führt. Im Falle einer Pneumokokkenpneumonie dürfte dieses Phänomen für die sich hieraus potentiell entwickelnde invasive Pneumokokkenkrankung (Pneumokokkensepsis) von besonderer Relevanz sein [74]. Interessanterweise konnten frühere tierexperimentelle Arbeiten an Mäusen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass auch die intratracheale Instillation von Endotoxinen Gram-negativer Bakterien eine akute Permeabilitätserhöhung induziert [58]. Beim Vergleich der beiden Studien ist festzustellen, dass das Maximum der akuten Lungenschädigung durch LPS nach 12 – 24 h erreicht wird, wohingegen PLY eine akute Lungenschädigung mit einem Maximum nach 6 h bewirkt. Besonders auffällig ist darüber hinaus, dass das Ausmaß der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung die durch Endotoxin induzierte akute Lungenschädigung um ein Vielfaches übersteigt. Dies lässt sich am ehesten durch die grundsätzlich unterschiedlichen Wirkmechanismen der beiden Virulenzfaktoren erklären: Während PLY primär als zytotoxisches Agens fungiert, weist LPS als Endotoxin *per se* keinen unmittelbaren zytotoxischen Pathogenitätscharakter auf. In der Endotoxin-induzierten akuten Lungenschädigung scheint der Lungenschaden somit sekundär verursacht zu werden. Endotoxin-induzierte Entzündungsantworten, wie vorrangig die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge, scheinen hierbei für den beobachteten Lungenschaden verantwortlich zu sein.

Kongruent mit dieser Hypothese ist, dass die Applikation funktionsblockierender anti-CD18-Antikörper in der Endotoxin-induzierten akuten pulmonalen Inflammation zu einer nahezu vollständigen Blockade der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten führt und darüber hinaus auch das Ausmaß der LPS-induzierten Lungenpermeabilität dramatisch reduziert [58]. Genau dieses Wechselspiel zwischen primärer, Toxin-induzierter Entzündungsresponse sowie daraus sich entwickelnder sekundärer inflammatorischer Response des Wirtes ist für PLY-induzierte Entzündungsantworten bis dato nicht ausreichend erforscht worden.

#### **4.2 Effekt von Pneumolysin auf die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten**

Bis dato fehlten genauere *in vivo*-Untersuchungen zur Kinetik, mit welcher die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auf PLY-Provokation zustande kam. Es ließ sich zeigen, dass PLY, im Gegensatz zu PdB, eine mäßige Neutrophilenalveolitis induzierte. Die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Lunge PLY-behandelter Mäuse erreichte nach etwa 24 h ein Maximum. Da in den korrespondierenden Experimenten mit PdB keine signifikante Induktion einer alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zu beobachten war, ergibt sich hieraus, dass insbesondere die zytolytische Komponente des PLY für die beobachtete alveolären Neutrophilenrekrutierung verantwortlich ist. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden auch von Rijnveld et al. gezogen, der bei Untersuchung diverser PLY-Mutanten die zytolytische Komponente des PLY als Hauptverursacher der Neutrophilenrekrutierung identifizierte [77]. Untersuchungen von Kadioglu et al. und Jounblat et al. mit PLY-defizienten Pneumokokken konnten zeigen, dass im Vergleich zu Wildtyp-Pneumokokken eine deutlich reduzierte Akkumulation neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe der Pneumokokken-infizierten Mäuse zu beobachten war [44,45]. Diese Daten unterstützen ebenfalls die Annahme, dass PLY in der Lage ist, eine Neutrophilen-Alveolitis in der Mauslunge zu induzieren. Wiederum vergleichend mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wird jedoch deutlich, dass das Ausmaß der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten auf PLY-Applikation bei Weitem

geringer ausfällt als in der Endotoxin-induzierten akuten pulmonalen Inflammation [58,61].

### **4.3 Effekt der $\beta$ 2- bzw. $\beta$ 1-Integrin-abhängigen Leukozytenrekrutierung auf die Pneumolysin-induzierte akute Lungenschädigung bei Mäusen**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob die Blockade der PLY-induzierten alveolären Leukozytenrekrutierung durch Applikation von  $\beta$ 2- bzw.  $\beta$ 1-Integrin-Antikörpern das Ausmaß der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung beeinflussen kann. Dazu wurden Antikörper mit Spezifität für  $\beta$ 2-Integrine (CD18) bzw.  $\beta$ 1-Integrine (CD49d) verwendet. Dieser experimentelle Ansatz lag in zahlreichen Studien begründet, die zeigten, dass für die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten insbesondere  $\beta$ 2-Integrine eine essentielle Rolle spielen. Die Beteiligung von  $\beta$ 2-Integrinen an der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten über Kapillarendothel bzw. Alveolarepithel war hierbei maßgeblich abhängig von dem Stimulus, der die alveoläre Migration neutrophiler Granulozyten auslöste [29,84,85,91]. Doerschuk et al. wiesen nach, dass für die alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der *Escherichia-coli*-induzierten akuten systemischen und pulmonalen Inflammation insbesondere  $\beta$ 2-Integrine eine essentielle Rolle spielen [29]. Demgegenüber vermitteln in der *Streptococcus-pneumoniae*-induzierten Pneumonie der Maus primär CD18-( $\beta$ 2-Integrin-)unabhängige Rekrutierungsmechanismen den Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge [29]. In der CD18-unabhängigen alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten scheinen alternative Pathways für den Migrationsprozeß neutrophiler Granulozyten verantwortlich zu sein. Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass insbesondere den  $\beta$ 1-Integrinen CD49d und CD29 hierbei eine wichtige Rolle zukommt [29,76]. Bereits frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten demonstrieren, dass in der durch *Escherichia-coli*-Endotoxin-induzierten pulmonalen Inflammation alveolär rekrutierte neutrophile Granulozyten primär  $\beta$ 2-Integrin-abhängig in den Alveolarraum emigrierten, während die Beteiligung von  $\beta$ 1-Integrinen an diesem Prozess lediglich eine untergeordnete Rolle spielte. Diese Studie konnte ebenso belegen, dass bei der alveolären Rekrutierung von Monozyten im Gegensatz

zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten sowohl  $\beta$ 2- wie auch  $\beta$ 1-Integrin-vermittelte Adhäsionsinteraktionen maßgeblich beteiligt waren [57]. Mit den Untersuchungsergebnissen von Doerschuk et al. übereinstimmend, fanden sich in der vorliegenden Studie Anhaltspunkte dafür, dass die in den alveolären Leukozytenimmigrationsprozess involvierten Adhäsionsmolekülpathways von migrationsauslösenden Stimuli abhängig waren. So konnte nachgewiesen werden, dass die CCR2- plus LPS-induzierte alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Mausmodell der akuten pulmonalen Inflammation CD11a-unabhängig verlief, wohingegen die MIP-1 $\alpha$ - plus LPS-induzierte pulmonale Akkumulation neutrophiler Granulozyten strikt CD11a-abhängig war [57,80]. Entsprechende Untersuchungen über die Beteiligung  $\beta$ 2- versus  $\beta$ 1-Integrin-abhängiger Rekrutierungspaths für die alveoläre Leukozytenrekrutierung auf die intratracheale Applikation hochaufgereinigten rekombinanten PLY *in vivo* lagen bis dato nicht vor. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PLY-induzierte alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten durch alleinige Gabe funktionsblockierender anti-CD18-Antikörper zu allen analysierten Zeitpunkten hochsignifikant attenuiert werden konnte. Auch eine Beteiligung  $\beta$ 1-Integrin-vermittelter Granulozytenrekrutierungspaths auf PLY wurde in der vorliegenden Arbeit dokumentiert: Die simultane Blockade  $\beta$ 2-Integrin- plus  $\beta$ 1-Integrin-vermittelter Rekrutierungspaths inhibierte zusätzlich das Ausmaß der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten. Diese Daten sind besonders von Interesse vor dem Hintergrund, dass bisherige Untersuchungen zu dieser Thematik erkennen ließen, dass die alveoläre Leukozytenmigration als Antwort auf durch Gram-positive Erreger (*Streptococcus pneumoniae*) induzierte Pneumonien weitestgehend CD18-unabhängig verliefen [29]. Demgegenüber konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass rekombinantes hochaufgereinigtes PLY von *Streptococcus pneumoniae* sehr wohl eine primär CD18-abhängige Migration neutrophiler Granulozyten in die Lunge zu induzieren vermochte. Auch wenn das in der vorliegenden Arbeit verwendete PLY als rekombinantes Protein in *Escherichia coli* exprimiert wurde, scheiden doch aufgrund durchgeführter Kontrollmessungen potentiell kontaminierende Endotoxingehalte in den PLY-Präparationen als ursächlich für die be-

obachtete CD18-abhängige Neutrophilenalveolitis mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Nachdem PLY als porenbildendes Toxin einen primär hohen zytotoxischen Effekt auf Alveolarepithelzellen ausübt, ist aller Wahrscheinlichkeit nach davon auszugehen, dass die durch PLY induzierte primär CD18-abhängige alveoläre Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nicht eine unmittelbare Response auf das Toxin selbst darstellt, sondern sekundär durch PLY-induzierte akute alveolär-epitheliale Schädigungsprozesse induziert wird.

#### **4.4 Effekt der Blockade leukozytenmigrationsabhängiger Rekrutierungspaths auf die Pneumolysin-induzierte akute Lungenschädigung**

Trotz nahezu vollständiger Blockade der alveolären Leukozytenrekrutierung (neutrophile Granulozyten und Monozyten) in mit  $\beta$ 2-Integrin-Antikörper vorbehandelten Mäusen war das Ausmaß der akuten Lungenschädigung auf intratracheale PLY-Applikation beinahe unverändert hoch. Diese Beobachtung macht deutlich, dass zum einen das Ausmaß der PLY-induzierten Lungenschädigung unabhängig war von der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bzw. Monozyten und zum anderen diese Leukozytenpopulationen nicht an der Entstehung eines PLY-induzierten Lungenschadens beteiligt waren. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass das Ausmaß der Schädigung der alveolär-epithelialen Barriere der Mauslunge nach Endotoxinapplikation durch Blockade der alveolären Rekrutierung neutrophiler Granulozyten mittels funktionsblockierender anti-CD18-Antikörper reduziert werden konnte [58,61]. Diese Studien erbrachten Evidenz dafür, dass neutrophile Granulozyten grundsätzlich an der Initiation einer pulmonalen Schrankenstörung beteiligt sein können. Belperio et al. beobachtete in einer jüngst publizierten Arbeit, dass Mäuse, denen der Chemokin-Rezeptor CXCR2 fehlte, welcher für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten essentiell ist, nahezu kein Lungenödem entwickelten bei Beatmung mit hohen Beatmungsdrücken, wohingegen unter identischen Bedingungen Wildtypmäuse mit einer Neutrophilenalveolitis und konsekutiver Lungenödembildung reagierten [7]. In der vorliegenden Arbeit führte die intratracheale Applikation von PLY nicht zu einer dramatischen Liberierung proinflammatorischer Mediatoren, und auch das Ausmaß

der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Lunge war im Vergleich zu anderen akuten Entzündungsmodellen der Maus eher moderat bis schwach einzustufen. Gleichfalls führte die Blockade der alveolären Neutrophilenrekrutierung mittels funktionsblockierender Antikörper trotz nachgewiesener Effektivität nicht zu einer Attenuierung der PLY-induzierten Lungenschädigung. Daraus kann geschlossen werden, dass im beschriebenen Modell der PLY-induzierten akuten pulmonalen Inflammation neutrophile Granulozyten eher eine untergeordnete Beteiligung an der beobachteten Entwicklung gesteigerter Lungenpermeabilität haben.

#### **4.5 Effekt des Pneumolysin auf den Alveolarmakrophagenpool der Lunge**

Verschiedene bislang publizierte Untersuchungen konnten Mechanismen der Makrophagenaktivierung durch PLY *in vitro* aufzeigen. Mariott et al. wies nach, dass PLY auf direktem Weg oder via Induktion der NO-Freisetzung durch Makrophagen zu einer Depletion des Makrophagenpools führte [56]. Demgegenüber lagen bis dato noch keine korrespondierenden *in-vivo*-Untersuchungen vor. Vor diesem Hintergrund erfolgte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Evaluierung der zeitabhängigen Wirkung von PLY auf den Alveolarmakrophagenpool bei Mäusen sowie eine Vergleichsreihe mit PdB, dem nicht-zytotoxischen Derivat des PLY. Es liess sich eine Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools innerhalb der ersten 12 h nach PLY-Gabe nachweisen, dem ein Wiederanstieg der Makrophagenzahlen mit einem Maximum nach 72 h folgte. PdB, das nicht-toxische Derivat des PLY, hatte hingegen keinen signifikanten Effekt auf den Alveolarmakrophagenpool. Eine Studie von Bergeron et al. erbrachte ähnlich Resultate: In dem von ihm beobachteten Zeitraum von 48 h war zunächst ein Abfall der in der BALF von Mäusen gemessenen Makrophagenzahlen innerhalb von 12 h zu verzeichnen, innerhalb der nächsten 48 h folgte ein Wiederanstieg der Alveolarmakrophagenanzahl bis auf Normalniveau. Die Applikation von PdB zeigte entsprechend den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultaten ebenfalls keinen Alveolarmakrophagen-depletierenden Effekt [9].

#### **4.6 Rolle der Alveolarmakrophagen bei der Pneumolysin-induzierten akuten Lungenentzündung**

Zur Untersuchung der Rolle von Alveolarmakrophagen in der PLY-induzierten akuten Lungenschädigung erfolgte deren Depletion via liposomalen Clodronats. Bereits in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte die makrophagendepletierende Wirkung von Clodronat gezeigt werden [61]. Mit Clodronat- plus PLY-behandelte Mäuse zeigten gegenüber Mäusen nach alleiniger PLY-Applikation ein ähnlich hohes Ausmaß pulmonaler Permeabilitätssteigerung. Trotz effektiver Clodronat-induzierter Alveolarmakrophagendepletion konnte somit keine Attenuierung der PLY-induzierten Lungenschädigung nachgewiesen werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass Alveolarmakrophagen in die PLY-getriggerte akute Lungenentzündung und die konsekutive Permeabilitätssteigerung kausal nicht involviert sind. Hierzu passt auch die Beobachtung, dass PLY neben der Induktion akuter Schrankenstörungsprozesse aufgrund seiner zytotoxischen Effekte zugleich auch eine massive Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools verursachte. Neben der Evaluierung des Effektes einer clodronatbasierten Alveolarmakrophagendepletion auf die PLY-induzierte Lungenschädigung wurde in der vorliegenden Arbeit aber auch die Frage untersucht, inwieweit die Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools das Ausmaß der Neutrophilenrekrutierung in die Lunge von Mäusen nach PLY-Applikation beeinflusst. Es zeigte sich, dass die in Clodronat- plus PLY-behandelten Mäusen detektierte Anzahl neutrophiler Granulozyten in der BALF derjenigen entsprach, die auch bei Mäusen nach alleiniger PLY-Gabe ermittelt wurde. Dem gegenüber haben frühere Untersuchungen gezeigt, dass die Depletion des Alveolarmakrophagenpools die LPS-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten stark vermindert [50,61]. Dies zeigt, dass Alveolarmakrophagen bei der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Modell der PLY-induzierten pulmonalen Entzündung, im Gegensatz zu Entzündungsabläufen in der Lunge mit LPS als inflammatorischem Stimulus, keine wesentliche Rolle spielen.

#### **4.7 Effekt des Pneumolysin auf die Zytokinfreisetzung im Alveolarraum der Lunge**

PLY wurde *in vitro* als Induktor für die Freisetzung verschiedener Zytokine und Chemokine aus Makrophagen beschrieben, darunter auch MIP-2 und TNF- $\alpha$  [21,30,41,89]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung der Wirkung des PLY auf die MIP-2- und TNF- $\alpha$ -Freisetzung *in vivo*. Dabei fand sich, dass dem Alveolarmakrophagenanstieg in der BALF zeitlich ein Anstieg der untersuchten Zytokine (MIP-2 und TNF- $\alpha$ ) folgte. Ähnliche Ergebnisse ergaben auch Untersuchungen von Rijneveld et al. Sie stellten bei Mäusen nach intranasaler PLY-Gabe einen Anstieg verschiedener Zytokine und Chemokine in der BALF fest, darunter auch MIP-2, wohingegen kein Anstieg des TNF- $\alpha$  zu verzeichnen war [77]. Allerdings bleibt festzustellen, dass das Ausmaß der entzündlichen Zytokinfreisetzung in der Lunge PLY-behandelter Mäuse verglichen mit anderen inflammatorischen Stimuli auf niedrigem Niveau erfolgte, so dass höchst fraglich bleibt, welche proinflammatorische Relevanz diese niedrigen Zytokinspiegel in der Lunge *in vivo* überhaupt haben.

#### **4.8 Effekt adhäsionsblockierender anti-CCR2-Antikörper auf die alveoläre Rekrutierung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten**

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass endothelial sezerniertes CCL2 zur gesteigerten Adhäsion CCR2-exprimierender Monozyten an entzündlich aktivierte Endothelzellen unter dynamischen Strömungsbedingungen *in vitro* führte [62]. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, inwieweit die Monozytenrekrutierung bei PLY-getriggerten Entzündungsreaktionen *in vivo* von der CCR2-CCL2-Achse abhängig ist. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von anti-CCR2-Antikörpern die Reexpansion des durch PLY-Applikation depletierten Alveolarmakrophagenpools signifikant attenuierte. Es ist bereits bekannt, dass residente Alveolarmakrophagen aus peripheren Blutmonozyten hervorgehen und diese wiederum unter akuten Entzündungsbedingungen über CCR2-abhängige Prozesse in die Lunge rekrutiert werden [35,59,63]. Daraus kann geschlossen werden, dass die durch die Inhibition der CCR2-CCL2-Achse via funktionsblockierender anti-

CCR2-Antikörper reduzierte alveoläre Monozytenrekrutierung kausal verantwortlich ist für die beobachtete Reduktion der Reexpansion des residenten Alveolarmakrophagenpools. Ob durch derartige Interventionsstrategien zugleich auch die pulmonale Abwehrfunktion der Lunge gegenüber einer Pneumokokkeninfektion beeinträchtigt ist, ist gegenwärtig nicht geklärt. Im Gegensatz zur attenuierten alveolären Monozytenrekrutierung wurde in der vorliegenden Arbeit die PLY-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten als CCR2-unabhängiger Prozess identifiziert. Ein ähnliches Ergebnis erbrachten frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, bei denen anstelle von PLY das Endotoxin LPS als Entzündungsinduktor eingesetzt wurde. Der Rekrutierungsmechanismus neutrophiler Granulozyten in die Lunge erwies sich in mit LPS-behandelten Wildtypmäusen ebenfalls als CCR2-unabhängig [59,60].

---

## 5 Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* spielt weltweit eine dominierende Rolle als Erreger ambulant erworbener Pneumonien, die mit hoher Morbidität und Mortalität assoziiert sind. Wesentliche Ursache für die hohe Pathogenität von *Streptococcus pneumoniae* ist nach gegenwärtiger Erkenntnis das komplexe Muster und Zusammenspiel der Pneumokokken-assoziierten Virulenzfaktoren. Einer der wichtigsten pneumokokkalen Virulenzfaktoren ist Pneumolysin (PLY), ein intrazelluläres Protein, das nach Autolysin-induzierter Autolyse von Pneumokokken freigesetzt wird.

In der folgenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Organ-residente Alveolarmakrophagen im Vergleich zu aus dem Gefäßkompartiment alveolär rekrutierten Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten) auf die PLY-induzierte akute Lungenschädigung *in vivo* haben. Hierzu wurden zwei Interventionsstrategien gewählt: (i) Vorbehandlung der Mäuse mit liposomalem Clodronat zur selektiven Depletion des Alveolarmakrophagenpools, (ii) Vorbehandlung der Mäuse mit funktionsblockierenden Antikörpern mit Spezifität für  $\beta 2$ - und  $\beta 1$ -Integrine, um die PLY-induzierte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bzw. Monozyten in das alveoläre Kompartiment zu inhibieren. Danach wurde den Tieren PLY oder sein nicht-zytotoxisches Derivat PdB intratracheal appliziert. Hierbei zeigte sich, dass die intratracheale Gabe von PLY im Gegensatz zu PdB zu einer Steigerung der Lungenpermeabilität (Schrankenstörung) und zu einer drastischen Depletion des residenten Alveolarmakrophagenpools führte, der eine konsekutive Repopulierung des Alveolarraums mit *de-novo*-rekrutierten zirkulierenden Monozyten folgte. Parallel induzierte die Behandlung mit PLY einen moderaten Zytokinanstieg in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit und die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in den Alveolarraum. Die Depletion des Alveolarmakrophagenpools mittels liposomalen Clodronats hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der Lungenschädigung nach intratrachealer PLY-Gabe, so dass residente Alveolarmakrophagen zu der durch PLY induzierten Lungenschädigung im untersuchten Mausmodell nicht wesent-

lich beitragen. Eine Vorbehandlung der Mäuse mit anti-CD18- und anti-CD49d-Antikörpern zur Blockade des Leukozytenverkehrs in die Lunge hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die PLY-induzierte Schrankenstörung. Die Gabe von anti-CCR2-Antikörpern konnte die Rekrutierung peripherer Monozyten in die Lunge und damit die Reexpansion des PLY-depletierten Alveolarmakrophagenpools wirksam blockieren, hatte aber keinen Einfluß auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und auf das Ausmaß der PLY-induzierten Schrankenstörung.

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass die Schädigung der Lunge durch intratracheal appliziertes PLY im untersuchten Mausmodell weitgehend unabhängig von Lungen-residenten Alveolarmakrophagen und alveolär rekrutierten Entzündungszellen erfolgt und vermutlich überwiegend durch direkte pneumotoxische Effekte von PLY auf die alveolo-kapilläre Barriere zustande kommt. Die CCL2-getriebene Monozytenrekrutierung trägt jedoch zur Regeneration des durch PLY-depletierten Alveolarmakrophagenpools bei und ist damit möglicherweise von Bedeutung für späte Reparaturprozesse.

---

## 6 Abstract

Pneumolysin (PLY) is a major virulence factor released by *Streptococcus pneumoniae* and has been implicated in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. In this study, we evaluated the contribution of newly recruited neutrophils and monocytes and resident alveolar macrophages to the pathogenesis of PLY-induced lung injury. Mice received either adhesion-blocking antibodies to inhibit alveolar leukocyte trafficking or liposomal clodronate to deplete alveolar macrophages before intratracheal application of native PLY or its noncytotoxic derivative PdB. We found that treatment with PLY but not PdB resulted in increased lung vascular permeability. In addition, PLY also induced a decrease in the resident alveolar macrophage population, and the recruitment of peripheral blood neutrophils and monocytes into the alveolar space. Blockade of PLY-induced alveolar leukocyte trafficking by pretreatment of mice with anti-CD18 plus anti-CD49d antibodies or depletion of circulating neutrophils did not attenuate the increases in lung permeability observed in response to intratracheal PLY. In addition, depletion of resident alveolar macrophages with clodronated liposomes did not reduce alveolar injury developing in response to PLY. PLY-induced lung injury was associated with only a small increase in bronchoalveolar lavage concentrations of cytokines. These data indicate that PLY-induced lung injury results from direct pneumotoxic effects on the alveolar-capillary barrier and is independent of both resident and recruited phagocytic cells.

---

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Abdel Ghani, E. M., S. Weis, I. Walev, M. Kehoe, S. Bhakdi, M. Palmer.** 1999. Streptolysin O: inhibition of the conformational change during membrane binding of the monomer prevents oligomerization and pore formation. *Biochemistry*. 38:15204-11.
2. **Alcantara, R. B., L. C. Preheim, M. J. Gentry-Nielsen.** 2001. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* 69:3569-75.
3. **Alexander J. E. , R. A. Lock, C. C. Peeters, J. T. Poolman, P. W. Andrew, T. J. Mitchell, D. Hansman, J. C. Paton.** 1994. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62:5683-8.
4. **Baba, H., I. Kawamura, C. Kohda, T. Nomura, Y. Ito, T. Kimoto, I. Watanabe, S. Ichiyama, M. Mitsuyama.** 2002. Induction of gamma interferon and nitric oxide by truncated pneumolysin that lacks pore-forming activity. *Infect. Immun.* 70:107-13.
5. **Baquero, F., J. Martinez-Beltran, and E. Lozan.** 1991. A review of antibiotic resistance patterns of *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:31-8.
6. **Beall, B., R. R. Facklam, D. M. Jackson, H. H. Starling.** 1998. Rapid screening for penicillin susceptibility of systemic pneumococcal isolates by restriction enzyme profiles of the *pbp2B* gene. *J. Clin. Microbiol.* 36:2359-2362.
7. **Belperio, J. A., M. P. Keane, M. D. Burdick, V. Londhe, Y. Y. Xue, K. Li, R. J. Phillips, R. M. Strieter.** 2002. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J. Clin. Invest.* 110:1703-16.

8. **Benton, K. A., J. L. VanCott, D. E. Briles.** 1998. Role of tumor necrosis factor alpha in the host response of mice to bacteremia caused by pneumolysin-deficient *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 66:839-42.
9. **Bergeron, Y., N. Ouellet, A. M. Deslauriers, M. Simard, M. Olivier, M. G. Bergeron.** 1998. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect. Immun.* 66:912-22.
10. **Bhakdi, S., J. Trantum-Jensen, J., A. Sziegoleit.** 1985. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect. Immun.* 47:52-60.
11. **Blue, C. E., G. K. Paterson, A. R. Kerr, M. Berge, J. P. Claverys, T. J. Mitchell.** 2003. ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect. Immun.* 71:4925-35.
12. **Bogaert D., R. De Groot, P. W. Hermans.** 2004. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. 2004. *Lancet Infect. Dis.* 4:144-54.
13. **Bonev, B. B., R. J. Gilbert, P. W. Andrew, O. Byron, A. Watts.** 2001. Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J. Biol. Chem.* 276:5714-9.
14. **Braun, J. S., R. Novak, G. Gao, P. J. Murray, J. L. Shenep.** 1999. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*, induces nitric oxide production from macrophages. *Infect. Immun.* 67:3750-6.
15. **Briles, D. E., J. Yother, L. S. McDaniel.** 1988. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 2:372-4.

16. **Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Zyalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Preller, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk, and M. J. Crain.** 1997. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* 3:401-8.
17. **Briles, D. E., S. K. Hollingshead, J. C. Paton, E. W. Ades, L. Novak, F. W. van Ginkel, W. H. Jr. Benjamin.** 2003. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 188:339-48.
18. **Brown, J. S., T. Hussell, S. M. Gilliland, D. W. Holden, J. C. Paton, M. R. Ehrenstein, M. J. Walport, M. Botto.** 2002. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16969-74.
19. **Camara, M, G. J. Boulnois, P. W. Andrew, T. J. Mitchell.** 1994. A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect. Immun.* 62:3688-95.
20. **Chandler, L. J., B.S. Reisner, G. L. Woods, A. K. Jafri.** 2000. Comparison of four methods for identifying *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:285-7.
21. **Choi, Y., L. F. Chuang, K. M. Lam, H. F. Kung, J. M. Wang, B. I. Osburn, R. Y. Chuang.** 1999. Inhibition of chemokine-induced chemotaxis of monkey leucocytes by mu-opioid receptor agonists. *In Vivo.* 13:389-96.
22. **Chow, J. C., D. W. Young, D. T. Golenbock, W. J. Christ, F. Gusovsky.** 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.* 274:10689-92.
23. **Cockeran, R., A. J. Theron, H. C. Steel, N. M. Matlola, T. J. Mitchell, C. Feldman, R. Anderson.** 2001. Proinflammatory interaction of pneumolysin with human neutrophils. *J. Infect. Dis.* 183:604-11.

24. **Cockeran, R., C. Durandt, C. Feldman, T. J. Mitchell, R. Anderson.** 2002. Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils in vitro. *J. Infect. Dis.* 186:562-5.
25. **Cockeran, R., R. Anderson, C. Feldman.** 2002. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15:235-9.
26. **Crain, M. J., W. D. 2<sup>nd</sup>. Waltman, J. S. Turner, J. Yother, D. F. Talkington, L. S. McDaniel, B. M. Gray, D. E. Briles.** 1990. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 58:3293-9.
27. **Cundell, D. R., N. P. Gerard, C. Gerard, I. Idanpaan-Heikkila, E. I. Toumanen.** 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377:435-8.
28. **Dintilhac, A., G. Alloing, C. Granadel, and J. P. Claverys.** 1997. Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol. Microbiol.* 25:727-739.
29. **Doerschuk, C. M., R. K. Winn, H. O. Coxson, J. M. Harlan.** 1990. CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J. Immunol.* 144:2327-33
30. **Driscoll, K. E., D. G. Hassenbein, J. Carter, J. Poynter, T. N. Asquith, R. A. Grant, J. Whitten, M. P. Purdon, R. Takigiku.** 1993. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: expression by rat alveolar macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and in rat lung after mineral dust exposure. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 8:311-8.
31. **Duran-Reynals, F.** 1933. Studies on a certain spreading factor existing in bacteria and its significance for bacterial invasiveness. *J. Exp. Med.* 58:161-81.

32. **Facklam, R.** 2002. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 613–30. Review.
33. **Feldman C., R. Anderson, R. Cockeran, T. Mitchell, P. Cole, R. Wilson.** The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. 2002. *Respir. Med.* 96:580-5.
34. **Fernebro, J., I. Andersson, J. Sublett, E. Morfeldt, R. Novak, E. Tuomanen, S. Normark, B. H. Normark.** 2004. Capsular expression in *Streptococcus pneumoniae* negatively affects spontaneous and antibiotic-induced lysis and contributes to antibiotic tolerance. *J. Infect. Dis.* 189: 328-38.
35. **Geissmann, F., S. Jung, D. R. Littman.** 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19: 71-82.
36. **Gibson, R. L., V. Nizet, C. E. Rubens.** 1999. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr. Res.* 45:626-34.
37. **Gilbert, R. J., J. L. Jimenez, S. Chen, I. J. Tickle, J. Rossjohn, M. Parker, P. W. Andrew, H. R. Saibil.** 1999. Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell.* 97:647-55.
38. **Hogg, J. C., C. M. Doerschuk.** 1995. Leukocyte traffic in the lung. *Annu. Rev. Physiol.* 57:97-114.
39. **Huo Z, O. Spencer, J. Miles, J. Johnson, R. Holliman, J. Sheldon, P. Riches.** 2004. Antibody response to pneumolysin and to pneumococcal capsular polysaccharide in healthy individuals and *Streptococcus pneumoniae* infected patients. *Vaccine.* 22:1157-61.

40. **Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, S. Akira.** 1999. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162: 3749-52.
41. **Houldsworth, S., P. W. Andrew, T. J. Mitchell.** 1994. Pneumolysin stimulates production of tumour necrosis factor and interleukin 1 $\beta$  by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 62:1501-3.
42. **Jedrzejewski, M. J.** 2001. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol. Mol. Rev.* 65:187-207.
43. **Johnson, M. K., D. Boese-Marrazzo, W. A. Jr. Pierce.** 1981. Effects of pneumolysin on human polymorphonuclear leukocytes and platelets. *Infect. Immun.* 34:171-6.
44. **Jounblat, R., A. Kadioglu, T.J. Mitchell, P.W. Andrew.** 2003. Pneumococcal behaviour and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect. Immun.* 71:1813-9.
45. **Kadioglu, A., N. A. Gingles, K. Grattan, A. Kerr, T. J. Mitchell, P. W. Andrew.** 2000. Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Inf. Immun.* 68:492-501.
46. **Kadioglu, A., S. Taylor, F. Iannelli, G. Pozzi, T. J. Mitchell, P. W. Andrew.** 2002. Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect. Immun.* 70: 2886-90.
47. **Kelly, R., and D. Greiff.** 1970. Toxicity of pneumococcal neuraminidase. *Infect. Immun.* 2: 115-7.
48. **Kelly, T., J. P. Dillard, and J. E. Yother.** 1994. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 62:1813-19.

49. **Klugman, K. P., S. A. Madhi, R. E. Huebner, R. Kohberger, N. Mbelle, N. Pierce;Vaccine Trialists Group. 2003.** A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N. Engl. J. Med.* 349:1341-8.
50. **Koay, M. A., X. Gao, M. K. Washington, K. S. Parman, R. T. Sadikot, T. S. Blackwell, J. W. Christman. 2002.** Macrophages are necessary for maximal nuclear factor-kappa B activation in response to endotoxin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:572-8.
51. **Krivan, H. C., D. D. Roberts, and V. Ginsburg. 1988.** Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:6157-61.
52. **Lock, R. A., D. Hansman, J. C. Paton. 1992.** Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* 12:137-43.
53. **Lopez, R., J. L. Garcia, E. Garcia, C. Ronda, P. Garcia. 1992.** Structural analysis and biological significance of the cell wall lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophage. *F. E. M. S. Microbiol. Lett.* 79:439-47.
54. **Mack, M., J. Cihak, C. Simonis, B. Luckow, A. E. Proudfoot, J. Plachy, H. Bruhl, M. Frink, H. J. Anders, V. Vielhauer, J. Pfirstinger, M. Stangassinger, D. Schlondorff. 2001.** Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J. Immunol.* 166:4697-704.
55. **Malley, R., P. Henneke, S. C. Morse, M. J. Cieslewicz, M. Lipsitch, C. M. Thompson, E. Kurt-Jones, J. C. Paton, M. R. Wessels, D. T. Golenbock. 2003.** Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Infect. Immun.* 100:1966-71.

56. **Marriott, H. M., F. Ali, R. C. Read, T. J. Mitchell, M. K. Whyte, D. H. Dockrell.** 2004. Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection. *F. A. S. E. B. J.* May 7.
57. **Maus, U. A., J. Huwe, L. Ermert, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2002. Molecular pathways of monocyte emigration into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:1-7.
58. **Maus, U. A. , J. Huwe, R. Maus, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2001. Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx and vascular leakage in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164:406-411.
59. **Maus, U. A., K. von Grote, W. A. Kuziel, M. Mack, E. J. Miller, J. Cihak, M. Stangassinger, R. Maus, D. Schlöndorff, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2002. The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166:268-73.
60. **Maus, U. A., K. Waelsch, W. A. Kuziel, T. Delbeck, M. Mack, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlöndorff, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2003. Monocytes are potent facilitators of alveolar neutrophil emigration during lung inflammation: role of the CCL2-CCR2 axis. *J. Immunol.* 170:3273-78.
61. **Maus, U. A., M. A. Koay, T. Delbeck, M. Mack, M. Ermert, L. Ermert, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlöndorff, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2002. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 282:L1245-L1252.
62. **Maus, U. A., S. Henning, H. Wenschuh, K. Mayer, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2002. Role of endothelial MCP-1 in monocyte adhesion to inflamed human endothelium under physiological flow. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283:H2584-91.

63. **Maus, U. A., S. Wellmann, C. Hampl, W. A. Kuziel, M. Srivastava, M. Mack, M. B. Everhart, T. S. Blackwell, J. W. Christman, D. Schlöndorff, R. M. Bohle, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2004. CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 288:350-8.
64. **Metlay, J. P., M. D. Witmer-Pack, R. Agger, M. T. Crowley, D. Lawless, R. M. Steinmann.** 1990. The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 171:1753-71.
65. **Murdoch, D. A.** 1998. Gram-positiv anaerobic cocci. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:81-120.
66. **Nabors, G. S., P. A. Braun, D. J. Herrmann, M. L. Heise, D. J. Pyle, S. Gravenstein, M. Schilling, L. M. Ferguson, S. K. Hollingshead, D. E. Briles, R. S. Becker.** 2000. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine* 18:1743-54.
67. **Orihuela, C. J, G. Gao, K. P. Francio, J. Yu, E. I. Tuomanen.** 2004. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 190:1661-9.
68. **Ortqvist, A., I. Jonsson, M. Kalin, and A. Krook.** 1989. Comparison of three methods for detection of pneumococcal antigen in sputum of patients with community-acquired pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:956-961.
69. **Palmer, M., I. Vulicevic, P. Saweljew, A. Valeva, M. Kehoe, S. Bhakdi.** 1998. Streptolysin O: a proposed model of allosteric interaction between a pore-forming protein and its target lipid bilayer. *Biochemistry* 37:2378-83.
70. **Paton, J. C.** 1996. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends in Microbiol.* 4:103-6.

71. **Paton, J. C.** 1998. Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential. *Trends in Microbiol.* 6:85-7.
72. **Paton, J. C., R. A. Lock, C. J. Lee, J. P. Li, A. M. Berry, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, D. Hansman, G. J. Boulnois.** 1991. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect. Immun.* 59:2297-304.
73. **Ponnuraj, K., and M. J. Jedrzejak.** 2000. Mechanism of hyaluronan binding and degradation: structure of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with hyaluronic acid disaccharide at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 299:885-95.
74. **Rayner, C. F, A. D. Jackson , A. Rutman, A. Dewar, T. J. Mitchell, P. W. Andrew, P. J. Cole, R. Wilson.** 1995. Interaction of pneumolysin-sufficient and –deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect. Immun.* 63: 442-7.
75. **Ren B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, D. E. Briles.** 2004. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect. Immun.* 72:114-22.
76. **Ridger, V. C., B. E. Wagner, W. A. H. Wallace, P. G. Hellewell.** 2001. Differential effects of CD18, CD29, CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 166:3484-90.
77. **Rijneveld, A. W., G. P. van den Dobbelsteen, S. Florquin, T. J. Standiford, P. Speelman, L. van Alphen, T. van der Poll.** 2002. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J. Infect. Dis.* 185:123-6.

78. **Robbins, J. B., R. Austrian, C. J. Lee, S. C. Rastogi, G. Schiffman, J. Henrichsen, P. H. Makela, C. V. Broome, R. R. Facklam, R. H. Tiesjema, et al.** 1983. Considerations for formulating the second-generation pneumococcal capsular polysaccharide vaccine with emphasis on the cross-reactive types within groups. *J. Infect. Dis.* 148:1136-59.
79. **Rosenow, C., P. Ryan, J. N. Weiser, S. Johnson, P. Fontan, A. Ortqvist, H. R. Masure.** 1997. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 25:819-29.
80. **Rosseau, S., J. Selhorst, K. Wiechmann, K. Leissner, U. Maus, K. Mayer, F. Grimminger, W. Seeger, J. Lohmeyer.** 2000. Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J. Immunol.* 164:427-35.
81. **Rossjohn, J., R. J. Gilbert, D. Crane, P. J. Morgan, T. J. Mitchell, A. J. Rowe, P. W. Andrew; J. C. Paton, R. K. Tweten, M. W. Parker.** 1998. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* 284:449-61.
82. **Rubins, J. B., D. Charboneau, C. Fasching, A. M. Berry, F. C. Paton, J. E. Alexander, P. W. Adrew, T. J. Mitchell, 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.* 153:1339-46.
83. **Rubins, J. B., D. Charboneau, J. C. Paton, T. J. Mitchell, P. W. Adrew, E. N. Janoff.** 1995. Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J. Clin. Invest.* 95:142-50.
84. **Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Charboneau, E. N. Janoff.** 1992. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infect. Immun.* 60:1740-6.

85. **Rubins, J. B., P. G. Duane, D. Clawson, D. Charboneau, A. Young, D. E. Niewoehner.** 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* 61:1352-8.
86. **Schleifer, K. H., R. Kilpper-Balz.** 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst. Appl. Microbiol.* 10:1-19.
87. **Schuchat, A.**1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:497-513.
88. **Smith, J. D., N. J. Cortes, G. S. Evans, R. C. Read, A. Finn.** 1998. Induction of beta2 integrin-dependent neutrophil adhesion to human alveolar epithelial cells by type 1 *Streptococcus pneumoniae* and derived soluble factors. *J. Infect. Dis.* 177:977-85.
89. **Simpson, S. Q., R. Singh, D. E. Bice.** 1994. Heat-killed pneumococci and pneumococcal capsular polysaccharides stimulate tumor necrosis factor-alpha production by murine macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 10:284-9.
90. **Sorensen, U. B. S.** 1993. Typing of pneumococcal by using 12 pooled antisera. *J. Clin. Microbiol.* 31:2097-100.
91. **Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, H. Todd, D. Sykes, J. Walker, K. Saunders, P. W. Andrew, G. J. Boulnois, P. J. Cole.** 1989. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect. Immun.* 57:2006-13.
92. **Toikka, P., S. Nikkari, O. Ruuskanen, M. Leinonen, and J. Mertsola.** 1999. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J. Clin. Microbiol.* 37:633-637
93. **Tomasz, A.** 1984. Building and breaking of bonds in the cell wall of bacteria- the role for autolysin, p. 3-12. In C. Nombela (ed.), *Microbial cell wall and autolysin.* Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

94. **Walker, J. A., R. L. Allen, P. Falmagne, M. K. Boulnois, G. J.** 1987. Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* 55:1184-9.
95. **Williams J. R., J. H., M. V. Pahl, D. Kwong, J. Zhang, D. Hatakeyama, K. Ahmad, M. Naderi, M. Kim, N. Vaziri.** 2003. Modulation of neutrophil complement receptor 3 expression by pneumococci. *Clin. Sci.* 104:615-25.

---

## 8 Anhang

### 8.1 Reagenzien

PBS (Dulbecco´s Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	KCl	0,20 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,20 g/l
	NaCl	8,00 g/l
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2,16 g/l
EDTA-PBS-Lösung (50ml 2 µmolar [pH 7,2])	PBS einfach	46,3 ml
	EDTA-Versen	3,7 ml
Erythrozytenlysepuffer (10fach) [pH 7,2]	NH <sub>4</sub> Cl	82,6 g/l
	KHCO <sub>3</sub>	10,0 g/l
	Titriplex 3	0,42 g/l

### 8.2 Materialien und Bezugsquellen

Abbocath <sup>®</sup> 26G Venenverweilka- theter	Abbott, D-Wiesbaden
Agarosegel Nu Sieve	Biozym, D-Oldendorf
Ammoniumchlorid (pH 7.2)	Sigma, D-München
Anti-CCR2-Antikörper MC21	Klon RB6-8C5, Isotyp IgG2b, BD- Biosciences, D-Heidelberg
Aqua destillata	Pharmacia& Upjohn, D-Erlangen
Autoklavierbeutel	Fischer Scientific, D-Giessen
Balb/c Mäuse	Charles River, D-Sulzfeld
Bepanthen Augensalbe	Hoffmann-LaRoche, D-Grenzach-Whylen
Blutprobenröhrchen mit EDTA	KABE Labortechnik, D-Nürnberg
Clodronat	Sigma, D-München

---

EDTA-PBS-Lösung	Biochrom AG, D-Berlin, PAA, D-Cölbe
Einwegmaterial aus Polypropylen, Polyethylen, Polystyren	Eppendorf, D-Hamburg; Falcon, D-Heidelberg; Costar, D-Bodenheim
Erythrozytenlysepuffer	Merck, D-Darmstadt
Ethanol 70 %	Fischer, D-Saarbrücken
Ethanol 100 %	Riedel-deHaen, D-Seelze
FCS (Fötale Kälberserum)	Gibco, D-Karlsruhe
Giemsa-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Injekt F 1 ml-Spritze	Braun, D-Melsungen
Isopropanol	Roth, D-Karlsruhe
Isofluran	Forene R, Abott, D-Wiesbaden
Ketaminhydrochlorid (Ketavet <sup>®</sup> )	Pharmacia&Upjohn, D-Erlangen
Maus-Serum	Serotec, D-München
Maus TNF- $\alpha$ ELISA-Kit	R&D Systems, D-Wiesbaden
May-Grünwald-Lösung	Merck, D-Darmstadt
Nadelhalter	Schilling, D-Tuttlingen
Nahtmaterial	Ethicon, D-Nordstedt
Natriumchlorid (0,9 %)	Pharmacia&Upjohn, D-Erlangen; Braun, D-Melsungen
Natriumazid	Merck, D-Darmstadt
Objektträger	Menzel, D-Wiesbaden
Omnican <sup>®</sup> 30 (300 $\mu$ l-Spritze, 29G-Kanüle)	Braun, D-Melsungen
Omnifix <sup>®</sup> 100 (1ml-Spritze)	Braun, D-Melsungen
PBS (Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)	PAA, D-Cölbe

Propidium-Iodid	Sigma, D-München
Ratte-Anti-Maus-Antikörper (CD18)	Klon 2E <sub>6</sub> , Isotyp IgG <sub>2a</sub> , American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD
Ratten-Anti-Maus-Antikörper (CD49d)	VLA-4, Klon PS/2, Isotyp IgG <sub>2b</sub> Serotec, D-München
Softasept <sup>®</sup> -Desinfektionslösung	Braun, D-Melsungen
Sterile Kanülen	BD-Biosciences, D-Heidelberg
Sterile Skalpelle	PFM, D-Köln
TRIS	USB-Cleveland, USA-Ohio
Tupfer, unsteril	D-Giessen
Xylazinhydrochlorid (Rompun <sup>®</sup> )	Bayer, D-Leverkusen

### 8.3 Geräte und Herstellernachweis

ELISA-Washer	Tecan, D-Crailsheim
Fluoreszenzspektrometer	Biotec FI 880 Microplate- Fluorescence-Reader, D-Einbeck
Lichtmikroskop	Leica, D-Wetzlar
Mikropräparierbesteck	Hammacher, D-Solingen; Aesculap, D-Tutlingen
Mikrotierplatten, flexible	Falcon, BD-Biosciences, D-Heidelberg
pH-Meter	Schott, D-Hofheim
Pipetten	Eppendorf, D-Hamburg; Abimed, D-Langenfeld
Plattenphotometer	Molecular Devices, D-Ismaning
Rüttelgerät	Janke&Kunkel, D-Staufen
SpeedVac-Konzentrator	Savant, USA-Holbrook

---

Stereomikroskop Leica® MS 5	Leica, D-Wetzlar
Zentrifugen	Heraeus, D-Hanau
Zytozentrifuge	Shandon, D-Frankfurt

---

## Danksagung

Herrn PD Dr. U. Maus danke ich ganz besonders für die experimentelle Betreuung dieser Arbeit. Für die Etablierung der Tierversuche und die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken waren sein fachliches Wissen und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion unerlässlich.

Herrn Prof. Dr. J. Lohmeyer möchte ich meinen Dank für die Überlassung des Themas aussprechen. Seine Hilfsbereitschaft und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit haben diese in hohem Maße geprägt.

Frau R. Maus möchte ich sehr herzlich für ihre Hilfe bei der Durchführung zellbiologischer und immunologischer Methoden sowie für das angenehme Arbeitsklima danken, das ihre freundliche und hilfsbereite Art maßgeblich beeinflusst hat.

Frau S. Wellmann möchte ich ganz besonders für die gute Zusammenarbeit beim experimentellen Teil der Arbeit danken. Ohne Frau Wellmann wären viele Versuche, vor allem die tierexperimentellen nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. M. Steinmüller danke ich für wertvolle Anregungen zum schriftlichen Teil meiner Arbeit.

Herrn Dr. M. Kriewald möchte ich für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

---

## Lebenslauf

Name Christine Sibylle Hampl  
Geburtstag/-ort 28.02.1976 in Esslingen a. N.  
Adresse Rehbergstr. 10, D-30173 Hannover  
Telefon 0511/5342797  
e-mail christinehampl@gmx.de

### Schule

9/1983 – 8/1986 Herderschule, Esslingen a. N.  
9/1986 – 8/1987 Grundschule Hegensberg-Liebersbronn, Esslingen a. N.  
9/1987 – 8/1996 Georgii-Gymnasium, Esslingen a. N.; Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium

10/1996 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen  
8/1998 Ärztliche Vorprüfung  
8/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
9/1999 – 4/2000 Auslandssemester in den Niederlanden, Vrije Universiteit Amsterdam, Studiengang: Humanmedizin  
4/2000 Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen  
9/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2002-  
11/2003 Praktisches Jahr  
1. Terzial Innere Medizin (Universitätsklinik Giessen)

---

2. Terzial Chirurgie (7 Wochen an der University of the Free State in Bloemfontein, Südafrika, 7 Wochen an der University of Pretoria in Pretoria, Südafrika; 6 Wochen an der Justus-Liebig-Universität Giessen)

3. Terzial Pädiatrie (Kinderspital Wildermeth, Spitalzentrum Biel-Bienne, Universität Bern, Schweiz)

12/ 2003

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Berufstätigkeit**

11/2001-  
12/2002

Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit im Sonderforschungsbereich 547 „Kardiopulmonales Gefäßsystem“ an der Justus-Liebig-Universität Giessen

1/2004

Ärztin im Praktikum in der chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses Giessen

4/2005-  
12/2006

Assistenzärztin in der kinderchirurgischen Abteilung des Bürgerhospitals Frankfurt a. M.

Seit 2/2007

Assistenzärztin in der Kinderchirurgie des Kinderkrankenhauses auf der Bult, Hannover

---

## Eidesstattliche Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Giessen, im Mai 2007