

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

DISSERTATION

**Experimentelle Untersuchung der Rolle des 18R-
HEPE-Resolvin E1-ChemR23/BLT1 Signalwegs in der
Pneumokokkenpneumonie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Martin Krause

aus Siegen

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract	7
1.0 Einleitung	9
1.1 Pneumonie	9
1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.3 Anatomie der Lunge	12
1.4 Erregerabwehr der Lunge	13
1.5 Resolution der Entzündungsreaktion	15
1.6 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Derivate	17
1.6 18R-HEPE und Resolvin E1	19
1.7 Fragestellung	20
2.0 Material und Methoden	22
2.1 Studiendesign	22
2.2 Versuchstiere	23
2.3 Tierhaltung	24
2.4 Herstellung des Nährmediums zur Bakterienkultur	25
2.5 Anzucht der Pneumokokken	25
2.6 Einstellen der Infektionsdosis	26
2.7 Infektion der Tiere	26
2.8 Klinische Überwachung der Tiere	27
2.9 18R-HEPE	29
2.10 Behandlung mit 18R-HEPE	29
2.11 Präparation und Probengewinnung	30
2.12 Quantifizierung und Differenzierung der Leukozyten in der BALF	31
2.13 Quantifizierung und Differenzierung der Leukozyten im Blut	32
2.14 Zytokinquantifizierung im BALF-Überstand mittels ProcartaPlex-Immunoassay	33
2.15 Bestimmung der Bakterienanzahl	34
2.15.1 BALF	34

2.15.2 Blut	35
2.16 Phagozytose-Assay	35
2.16.1 Isolation von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark	35
2.16.2 Gewinnung von L929-Zellüberstand	36
2.16.3 Herstellung des M-CSF Mediums	36
2.16.4 Kultivierung und Differenzierung der Knochenmarkszellen	37
2.16.5 Ernte der Knochenmarksmakrophagen	37
2.16.6 Ansetzen der 18R-HEPE Stimulationlösungen und Stimulation der Makrophagen.....	38
2.16.7 Infektion der Makrophagen mit <i>S. pneumoniae</i>	38
2.17 Quantitative Bestimmung der Rezeptorexpression in Lungenhomogenaten mittels qPCR.....	39
2.18 Immunhistochemie.....	42
2.19 Statistische Analysen	42
3.0 Ergebnisse	44
3.1 BLT1 und ChemR23-Rezeptoren werden in der murinen Lunge exprimiert	44
3.2 Quantitative Bestimmung der BLT1 und ChemR23 Rezeptorexpression nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in der Mauslunge.....	48
3.3 Die Rolle des endogenen 18R-HEPE-RvE1-ChemR23/BLT1-Signalweges in der murinen Pneumokokkenpneumonie	49
3.3.1 Klinischer Verlauf.....	50
3.3.2 Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge.....	52
3.3.3. Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion.....	53
3.4 Präventive und therapeutische 18R-HEPE-Behandlung in der murinen Pneumokokkenpneumonie.....	55
3.4.1 Auswirkungen der subkutanen 18R-HEPE-Applikation auf das klinische Bild in der murinen Pneumokokkenpneumonie.....	56
3.4.2. Bestimmung der zellulären Entzündungsreaktion in der Lunge	58
3.4.3 Analyse der Zytokine in der BAL-Flüssigkeit	59
3.4.3 Bestimmung des Einflusses von 18R-HEPE auf die systemische Entzündungsreaktion	62
3.5 Einfluss von 18R-HEPE auf die Phagozytose der Pneumokokken <i>in vitro</i>	63

3.6. Einfluss einer therapeutischen oder präventiven 18R-HEPE-Behandlung auf die Bakterienelimination in der murinen Pneumokokkenpneumonie <i>in vivo</i>	65
4.0 Diskussion	67
4.1 Die Rezeptorexpression von BLT1 und ChemR23 in der murinen Lunge ist abhängig von der Phase der Inflammationsreaktion	67
4.2 Eine Defizienz des ChemR23- oder BLT1-Rezeptors sowie ein endogen erhöhter ω -3-PUFA-Spiegel zeigten keine Auswirkung auf den Verlauf einer milden Pneumokokkeninfektion	70
4.3 Eine exogene Zufuhr von 18R-HEPE hatte keinen Einfluss auf die murine Pneumokokkenpneumonie.....	72
4.4 18R-HEPE stimuliert Makrophagen <i>in vitro</i> zur Phagozytose, hat jedoch keinen Effekt auf die pulmonale Erregerelimination <i>in vivo</i>	75
4.5 Ausblick	77
5.0 Literaturverzeichnis.....	80
6.0 Anhang	95
6.1 Materialien.....	95
6.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	95
6.1.2 Antikörper	96
6.1.3 Geräte und Apparaturen	97
6.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	98
6.2 Abkürzungsverzeichnis	99
6.3 Abbildungsverzeichnis	104
6.4 Tabellenverzeichnis.....	105
Eidesstaatliche Versicherung.....	106
Danksagung	107
Lebenslauf.....	108

Zusammenfassung

Experimentelle Untersuchung zum Einfluss des 18R-HEPE-ResolvinE1-ChemR23/BLT1 Signalwegs in der Pneumokokkenpneumonie

Die Pneumonie ist eine der Haupttodesursachen weltweit mit *Streptococcus pneumoniae* als häufigstem Erreger. Die physiologische Reaktion des Körpers auf eine Pathogenexposition ist die Induktion einer Entzündungsreaktion mit dem Ziel, die Gewebshomöostase wiederherzustellen. Prolongierte oder unkontrollierte Entzündung kann zu akuten und chronischen Organschäden, wie akutem Lungenschaden oder chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), führen. Deshalb ist es von außerordentlicher Bedeutung, dass die Inflammation adäquat reguliert und zeitgerecht terminiert wird und die Resolutionsphase einsetzt. Die Resolution einer Entzündung wurde lange als passiver Prozess angesehen, bis sogenannte *specialized pro-resolving mediators* (SPM) entdeckt wurden. Diese Mediatoren, namentlich Resolvine, Maresine, Lipoxine etc., werden aus mehrfach ungesättigten ω -3-Fettsäuren (ω -3-PUFA) produziert. Sie initiieren und steuern die Resolutionsphase unter anderem durch Attenuierung der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Modulation der Zytokinausschüttung und Initiierung der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Detritus durch Makrophagen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des SPM Resolvin E1 (RvE1), dessen Rezeptoren ChemR23 und BLT1 und des RvE1-Vorläufers 18R-HEPE in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht.

Zunächst konnte durch eine immunhistochemische Untersuchung von Lungengewebschnitten die Verteilung der Rezeptoren ChemR23 und BLT1 in der murinen Lunge dargestellt werden. Mittels qPCR wurde die Regulation der Expression dieser Rezeptoren im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie analysiert. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von BLT1 in der Akutphase der Inflammation, eine Hochregulation des ChemR23-Rezeptors dagegen vorrangig in der späten Entzündungsphase. Darüber hinaus wurden weibliche C57BL/6N Wildtyp, ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} und fat-1^{+/+}-Mäuse mit einer LD30 *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Weder ein endogen erhöhter ω -PUFA-Spiegel der fat-1-Mäuse noch eine Rezeptordefizienz hatten jedoch Einfluss auf die klinischen Parameter oder

Leukozytenpopulationen in Blut und bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) im Rahmen einer milden Pneumonie.

In einer weiteren Versuchsreihe mit exogener Substitution der RvE1-Vorläuferfettsäure 18R-HEPE in der murinen Pneumokokkenpneumonie bei C57BL/6N Wildtypmäusen konnte keine klinische Überlegenheit der präventiv oder therapeutisch behandelten Versuchsgruppen gesehen werden. Bakterienlast und Leukozytenzahlen in Blut und BALF zeigten keinen Unterschied. In der Analyse der Zytokine fand sich einzig ein reduziertes Level von IFN- γ in der BALF der behandelten Tiere, das möglicherweise auf eine 18R-HEPE-vermittelte Suppression der Entzündungsreaktion in der frühen Phase der Infektion zurückzuführen sein könnte. Die *in vitro*-Stimulation von aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen mit 18R-HEPE induzierte eine erhöhte Phagozytoserate von Bakterien.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, im Gegensatz zu den Daten in der bisher publizierten Literatur, nur eine kleine Rolle des 18R-HEPE-RvE1-Signalwegs in der murinen Pneumokokkenpneumonie. Die hier bestimmten Einflüsse müssen in Folgeversuchen eingehender analysiert werden.

Abstract

Experimental study on the role of the 18R-HEPE-ResolvinE1-ChemR23/BLT1 pathway in pneumococcal pneumonia

Pneumonia is one of the world's leading causes of death. It is primarily caused by *Streptococcus pneumoniae*. Pathogen-induced infection leads to an inflammatory response in order to restore tissue homeostasis, however a prolonged or uncontrolled inflammation may lead to acute or chronic organ damage, such as acute lung injury or COPD. Therefore, it is paramount that the inflammation is adequately controlled and timely terminated to initiate the resolution phase. Resolution of inflammation has long been considered a passive process until specialized pro-resolving mediators (SPM) have been discovered. These mediators such as Resolvins, Maresins, Lipoxins, etc. are produced from ω -3-polyunsaturated fatty acids (ω -3-PUFA). They initiate and control the resolution of inflammation by preventing activation and diapedesis of neutrophils, and induction of cytokine release, and phagocytosis of apoptotic cells and detritus by macrophages.

The objective of the present study was to determine the role of SPM Resolvin E1 (RvE1), its receptors ChemR23 and BLT1 and its precursor 18R-HEPE in murine pneumococcal pneumonia.

In a first set of experiments, immunohistochemical staining of lung tissue sections revealed the distribution of BLT1 and ChemR23 in the murine lung. Using qPCR, the impact of infection on the regulation of BLT1 and ChemR23 in the lung was determined. The results show an upregulation of BLT1 expression in the acute inflammatory phase and an increased expression of ChemR23 in the late stage of infection. Moreover, female C57BL/6N wild type, ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} and fat-1^{+/+} mice were infected with *Streptococcus pneumoniae* (LD30). Neither endogenous elevation of ω -PUFA in fat-1-mice nor deficiency of the RvE1-receptors resulted in significant changes of clinical parameters or leukocyte populations in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and blood.

To study the effect of an exogenous treatment with the RvE1-precursor fatty acid 18R-HEPE, female C57BL/6N wild type mice were infected with *Streptococcus pneumoniae* (LD100). However, neither the preventive nor therapeutic treatment with 18R-HEPE showed a significant clinical benefit. Bacterial burden and number of leukocytes in

blood and BALF were unaffected. However, a decreased level of IFN- γ was detected in the BALF of treated mice, which is most likely due to a 18R-HEPE-mediated suppression of inflammation in the early stage of infection. Moreover, the *in vitro* stimulation of bone-marrow-derived macrophages with 18R-HEPE led to an increased phagocytosis of bacteria after incubation with 18R-HEPE.

In summary, the results of this study, in contrast to published circumstantial evidence, show only a minor role of the 18R-HEPE-RvE1-pathway in murine pneumococcal pneumonia. The findings shown in this study need to be further investigated in future experiments.

1.0 Einleitung

1.1 Pneumonie

Die Pneumonie ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten und die häufigste Todesursache durch Infektion weltweit.¹ Dabei betrug die Mortalität durch die bakteriell bedingte Pneumonie im Jahr 2015 in Deutschland insgesamt 2,1% und steht somit auf Rang 8 der Gesamttodesursachen.² Die Hospitalisierungsrate der ambulant erworbenen Pneumonie beträgt 46,5% und führt damit ebenso häufig zu einem stationären Aufenthalt wie Schlaganfall oder Myokardinfarkt.^{3,4} Die Anzahl der stationären Fälle mit Pneumonien wurde 2016 mit 304.632 und einer durchschnittlichen stationären Verweildauer von 9,2 Tagen angegeben.⁵ Es versterben 12,9% der hospitalisierten Patienten.⁶ Die Pneumonie ist demnach auch heute noch von großer Bedeutung für die öffentliche Gesundheit trotz einer breiten Verfügbarkeit antibiotischer Therapien.

Die Pneumonie kann nach verschiedenen Kriterien unterteilt werden, unter anderem nach Lokalisation, Infektionsweg und ursächlichem Erreger. Da Bakterien mit Abstand die häufigsten Erreger der Pneumonie sind, spielt die Einteilung nach dem zugrundeliegenden Pathogen in der Regel nur eine untergeordnete Rolle. Für den klinischen Alltag hat sich die Unterteilung in ambulant erworbene Pneumonie (CAP = *community acquired pneumonia*) und nosokomiale Pneumonie (HAP = *healthcare acquired pneumonia/hospital acquired pneumonia*) bewährt, da sich hiermit auch das zu erwartende Erregerspektrum ändert.⁷ Eine CAP liegt bis 48h nach stationärer Aufnahme und bei Auftreten ab 3 Monate nach Entlassung vor.⁸

Das mittlere Alter eines stationär behandelten Patienten mit Pneumonie beträgt 76 Jahre.⁸ Betroffen von der Lungenentzündung sind darüber hinaus Patienten mit Komorbiditäten wie einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), Diabetes mellitus, neurologischen Erkrankungen, Herzinsuffizienz oder Leber- und Nierenerkrankungen.⁹ Zusätzlich wird das Risiko an einer Pneumonie zu erkranken durch Immundefekte (AIDS, Organtransplantationen, Autoimmunkrankheiten) erhöht.¹⁰ Begleiterkrankungen tragen zu Organdysfunktionen bei und sind daher für

die Sterblichkeit im Rahmen einer Pneumonie von erheblicher Bedeutung. So beträgt die komorbiditätsassoziierte Mortalität bis 30 Tage nach stationärer Aufnahme 4,7%.¹¹

Das Erregerspektrum von CAP und HAP ist sehr unterschiedlich. Als häufigster Erreger der CAP tritt *Streptococcus pneumoniae* in 40-50% der Fälle auf.^{7,10} Von weiterer Bedeutung sind *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* und saisonal Influenzaviren. Dagegen kommen als Erreger der HAP unter anderem Enterobakterien (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* in Frage.⁸

1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Die Bakterien der Art *Streptococcus pneumoniae*, auch als Pneumokokken bezeichnet, zählen zu der Familie der *Streptococcaceae* (kettenförmig angeordnete Kugelbakterien). Die kettenförmige Konfiguration entsteht durch die Zellteilung entlang einer Achse. Sie sind grampositiv, unbeweglich, fakultativ anaerob und nicht zur Sporenbildung befähigt. Der Oropharyngealraum von ungefähr 50% der Kinder und 12% aller Erwachsener ist asymptomatisch von Pneumokokken besiedelt.¹² Von Mensch zu Mensch übertragen werden sie vornehmlich über Tropfeninfektion, wobei die pulmonale Infektion letztendlich durch einen Abstieg der Pneumokokken in die Lunge erfolgt.^{4,13}

Pneumokokken sind alpha-hämolisierend und besitzen keine zellwandständige Lancefieldgruppenantigene. Der grüne Hämolysehof bei Anzucht auf einer Blutagarplatte entsteht durch die Reduktion des Eisens des im Nährboden erhaltenen Hämoglobins. Optimal für das Wachstum sind eine Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5% sowie eine Temperatur von 37°C. Darüber hinaus wird eine Katalasequelle benötigt. Morphologisch wachsen bekapselte Pneumokokken auf festem, bluthaltigem Nährboden als glatte, mukoide Kolonien.¹³

Als grampositive Bakterien besitzen Pneumokokken eine Zellwand und verfügen darüber hinaus meist über eine Polysaccharidkapsel, die gleichzeitig der wichtigste Pathogenitätsfaktor ist, da die Pneumokokken sich hierüber der Phagozytose entziehen können. Je nach Subtyp ist die Polysaccharidkapsel von unterschiedlicher Stärke. Weitere Virulenzfaktoren wie Pneumokokken-Oberflächenprotein A,

Pneumokokken-Inhibitor H stören die Opsonierung und Lyse durch den Komplementfaktorsignalweg. Darüber hinaus verstärken Pneumokokkenoberflächenprotein C, Neuraminidase, Pneumolysin, Pneumokokkenoberflächenadhäsion A die Oberflächenadhäsion der Bakterien an die Wirtszelle. Durch Peptidoglykane und Teichonsäure der bakteriellen Zellwand wird eine invasive Entzündung ausgelöst, indem die Ausschüttung zahlreicher Zytokine und die Aktivierung des Komplementfaktorsignalweges induziert werden, was wiederum neutrophile Granulozyten anlockt. Pneumolysin, ein von den Pneumokokken sezerniertes Protein, wirkt zytotoxisch und stimuliert die Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen von Monozyten.⁴

Anhand der Polysaccharidkapsel können die Pneumokokken in über 90 verschiedene Serovaren unterteilt werden. Das pathogene Potenzial ändert sich mit dem jeweiligen Serotyp.¹⁴ Es wird eine lokale, nicht-invasive Infektion (Otitis, Sinusitis, Pneumonie) von einer invasiven unterschieden. Die invasive Pneumokokkeninfektion ist definiert durch einen Nachweis von *Streptococcus pneumoniae* in einer physiologisch sterilen Umgebung (Blut oder Liquor).¹⁵ Bisher galten unbekapselte Pneumokokken nicht als Auslöser einer invasiven Pneumokokkeninfektion, neuere Daten zeigen auch hier ein invasives Potenzial.¹⁶ Vor der Einführung des PCV7-Impfstoffs in den Jahren 2000-2001 wurden die meisten Pneumokokkeninfektionen durch die sieben in der Impfung enthaltenen Serotypen ausgelöst (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F).¹⁵ Nach Einführung hat sich das Spektrum geändert, mit Serotyp 19A als häufigstem isolierten Erreger. Dieser wurde in dem neuen Impfstoff PCV13 mit abgedeckt (2010).¹⁵ Insgesamt sind 23 der bekannten Serotypen für ca. 90% der Infektionen verantwortlich.¹² Der in den vorliegenden Versuchen verwendete Serotyp 3 wird ebenfalls durch PCV13 abgedeckt. Allerdings bleibt er von erheblicher globaler Bedeutung, da er über eine äußerst starke Polysaccharidkapsel verfügt und schwere invasive Pneumokokkeninfektionen verursacht (nekrotisierende Pneumonie, septischer Schock).¹⁷ Zudem scheint PCV13 keinen ausreichenden Impfschutz zu bieten.^{18,19}

1.3 Anatomie der Lunge

Die Lunge vermittelt die Oxygenierung des Blutes und Elimination des in hohen Konzentrationen toxischen Kohlenstoffdioxids aus dem Körper. Sie besteht aus zwei Flügeln, die sich wiederum in Lungenlappen mit mehreren funktionellen Segmenten einteilen lassen. Man unterscheidet außerdem das konduktive, luftleitende Bronchialsystem, mit den *Bronchioli respiratorii* als kleinster Einheit, von den Alveolen, in denen der Gasaustausch stattfindet. Die rechte Lunge des Menschen umfasst 3 Lungenlappen und insgesamt 10 Lungensegmente, die linke Lunge, bedingt durch die Lage des Herzens, 2 Lungenlappen und 9 Segmente.^{20,21}

Der Bronchialbaum (*Arbor bronchialis*) des Menschen spaltet sich ab der Trachealbifurkation ca. 20-mal dichotom auf. Der rechte und der linke *Bronchus principalis* gehen dabei in Lappenbronchien (*Bronchi lobares*), danach in Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*), *Bronchioli* und schließlich in die *Bronchioli terminales* (Durchmesser 0,5 – 0,8mm) über. Die nachfolgenden *Bronchioli respiratorii* münden jeweils in den *Ductus alveolaris*, von dem die Alveolen traubenförmig abgehen. Hier beginnt der respiratorische Endabschnitt der Lunge. Eine Alveolengruppe, die von einem *Bronchiolus terminalis* versorgt wird, nennt man Azinus. Untereinander sind die Alveolen von Alveolarsepten getrennt. Im interalveolaren Bindegewebe (Interstitium) finden sich ein dichtes Netz aus elastischen Fasern und die Kapillaren der *Vasa publica*, die kohlendioxidreiches Blut zu den Alveolen transportieren und dann am Gasaustausch teilnehmen.^{20,21}

Histologisch ist beim Menschen der Aufbau der Bronchien dem der Trachea sehr ähnlich. Die innere Schicht besteht aus einer *Tunica mucosa* mit Flimmerepithel. In den *Bronchioli terminales*, *Bronchioli respiratorii* und *Ductus alveolares* finden sich neben den einreihigen kubischen Epithelzellen sogenannte Club- oder Keulenzellen. Diese verfügen über protektive Eigenschaften. Sie sezernieren, neben Proteasen und anti-mikrobiellen Peptiden, das *Club cell secretory protein* (CCSP) sowie die Surfactant-Apoproteine A, B und D.²² Becherzellen sind nur bis zu den *Bronchioli*, aber nicht mehr ab den *Bronchioli terminales* vorhanden. Als mittlere Schicht schließt sich in den Bronchien die *Tunica fibromusculocartilaginea* an. Die *Tunica adventitia* als äußerste Schicht besteht aus lockerem Bindegewebe. Die Knorpelspangen der *Tunica fibromusculocartilaginea*, die die Trachea hufeisenförmig umgeben, werden nach

distal unregelmäßiger und sind im Verlauf der *Bronchi lobares* nur noch als Knorpelinseln vorhanden. Die Bronchioli sind knorpelfrei, bilden aber eine kräftige Tunica muscularis aus, mit der die Lumenweite aktiv reguliert werden kann.^{20,21}

Die Alveolen sind wabenartige Ausstülpungen des Bronchialbaums und haben einen Durchmesser von ca. 250-300µm. Zwischen zwei angrenzenden Alveolarräumen befinden sich Bindegewebe, ein elastisches Fasernetz sowie Kapillaren. Der Gasaustausch findet über die Blut-Luft-Schranke, auch endoepitheliale Barriere genannt, statt. Diese besteht aus den Endothelzellen der Kapillare, miteinander verschmolzenen Basallaminae und den Alveolarepithelzellen. Das Alveolarepithel selbst besteht aus Typ I und Typ II Alveolarepithelzellen. Typ-I-Zellen sind sehr flache Plattenepithelzellen, bedecken ca. 90% der Alveolenoberfläche und werden deshalb als „Deckzellen“ bezeichnet. Typ-II-Zellen sind größer, aber weniger zahlreich vorhanden. Sie produzieren das *Surfactant*, welches die Oberflächenspannung der Alveolen deutlich herabsetzt und so einen Kollaps verhindert. *Surfactant* wird kontinuierlich gebildet und von Typ-I-Zellen und residenten Makrophagen resorbiert. Darüber können sich Typ-II-Zellen mitotisch teilen und zu Typ-I-Zellen differenzieren.^{20,21}

1.4 Erregerabwehr der Lunge

Aufgrund der konstanten Exposition des Menschen gegenüber Noxen, Infektionserregern und anderen Umwelteinflüssen über die Atemluft ist eine adäquate Erregerabwehr der Atemwege von höchster Bedeutung.

Hier kommen physikalische, chemische und biologische Mechanismen zum Tragen. Es besteht darüber hinaus eine enge Interaktion zwischen humoralen und zellulären Mechanismen. Im oberen Respirationstrakt ist das beschriebene zilientragende Schleimhautepithel vorhanden. Intraepithelial liegen Becherzellen, die zusammen mit den *Glandulae nasales* pro Tag 10–100ml Mukus produzieren. Die Kinozilien transportieren diesen Mukus oralwärts, wo er dann heruntergeschluckt wird. Der Mukus enthält verschiedene antimikrobielle Stoffe, unter anderem Defensine, Lactoferrin und Lysozym. Im Rahmen einer Infektion kann die Konzentration der Defensine um das Hundertfache steigen.^{23–25}

Das Immunsystem kann in ein angeborenes (unspezifisches) und erworbenes (adaptives) eingeteilt werden. Das unspezifische Immunsystem umfasst alle Mechanismen, die dem Körper seit Geburt an zur Verfügung stehen und unmittelbar aktiv werden können. Zellen des unspezifischen Immunsystems können Erreger bereits bei Erstkontakt angreifen. Die Erkennung sogenannter *pathogen associated molecular patterns* erfolgt mittels membranständiger, intrazellulärer oder löslicher *pattern recognition receptors* (u. a. *toll-like-Rezeptoren*, *scavenger-Rezeptoren*). Daraufhin werden Signalkaskaden der Immunantwort ausgelöst.

Auf humoraler Ebene der unspezifischen Immunantwort sind verschiedene Proteine beteiligt, hierzu gehören Akute-Phase-Proteine, proinflammatorische Zytokine und das Komplementsystem. Ihre Aufgabe besteht in der Ausbildung einer Immunantwort (Chemotaxis, Vasodilatation, Steigerung der Gefäßpermeabilität, Opsonierung). Wichtige Vertreter der proinflammatorischen Zytokine sind Interleukine, *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) und Interferone. Sie wirken autokrin, parakrin, oder auch endokrin, je nachdem, in welcher Konzentration sie gebildet werden, und ob sie die Blutbahn erreichen. Kein Zytokin wirkt für sich alleine, es herrscht immer ein Zusammenspiel mehrerer Mediatoren, die additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken. Zudem sind sie pleiotrop, haben also je nach Zielzelle einen unterschiedlichen Effekt. Sie spielen in der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Funktion von Zellen des Immunsystems eine große Rolle. Exemplarisch sollen die wichtigsten Zytokine kurz vorgestellt werden. Interleukin-1 und Interleukin-6 werden von Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen nach Pathogenkontakt ausgeschüttet und aktivieren unter anderem Lymphozyten und induzieren Fieber. Interleukin-8 wird durch infizierte Epithelzellen gebildet und wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten. TNF- α wird von Makrophagen, Monozyten und T-Zellen produziert. Er stimuliert neutrophile Granulozyten, induziert die Ausschüttung weiterer inflammatorischer Zytokine und verursacht Fieber. Interferone sind Botenstoffe mit primär antiviraler und antitumoraler Wirkung. Sie wirken vor allem autokrin und parakrin. Ihre Funktion ist die Hemmung des Pathogenwachstums der eigenen und umliegenden Zellen.^{23–25}

Das Komplementsystem ist sowohl Teil des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems. Es besteht aus über 30 Proteinen, die überwiegend in der Leber produziert werden. Die Proteine zirkulieren als Vorstufen in der Blutbahn und können

Pathogene direkt lysieren (über den *membrane attack complex (MAC)*), wirken proinflammatorisch über Chemotaxis und vermitteln die Phagozytose durch Opsonierung. Das Komplementsystem wird über einen klassischen (durch den Antigen-Antikörper-Immunkomplex), einen alternativen oder den Lectinreaktionsweg aktiviert. Die gemeinsame Endstrecke bleibt bei allen Reaktionswegen die Bildung des MAC durch die Komplementfaktoren C5b, C6, C7, C8 und C9.

Da die angeborenen Mechanismen bei einigen Pathogenen nicht zur Elimination ausreichen, werden über die sogenannten antigenpräsentierenden Zellen die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems aktiviert, um so eine spezifische Abwehrreaktion ausbilden zu können. Somit entsteht eine enge Verbindung mit dem erworbenen Immunsystem. In der Lunge sind hier vor allem die Alveolarmakrophagen zu nennen, die neben Erregern auch Fremdpartikel phagozytieren.

Nach Einleitung der spezifischen Immunabwehr durch das angeborene Immunsystem erfolgt eine komplexe Kaskade aus Interaktion und Stimulation der T- und B-Lymphozyten, aus denen die Produktion erregerspezifischer Immunglobuline hervorgeht. Die durch differenzierte B-Lymphozyten (Plasmazellen) produzierten Antikörper unterstützen die Zellen des angeborenen Immunsystems bei der Neutralisation der Erreger.²³⁻²⁵

1.5 Resolution der Entzündungsreaktion

Die physiologische Entzündungsreaktion ist ein selbstlimitierter, regulierter und kontrollierter Vorgang und dient als eine adäquate Antwort auf Infektion, Trauma und Barrierestörung mit dem Ziel der Wiederherstellung der Homöostase.^{26,27}

Lange wurde davon ausgegangen, dass die Terminierung der Entzündungsreaktion passiv vonstattengeht, indem weniger proinflammatorische Mediatoren produziert und so deren Konzentrationen verdünnt werden mit der Folge, dass die Inflammation „abebbt“. Diese Ansicht hat sich gewandelt, nachdem die Familie der sogenannten *specialized proresolving mediators (SPM)* beschrieben wurde.²⁸ Es konnte gezeigt werden, dass die Resolution einer Entzündung ein aktiver Prozess ist, eingeleitet und lokal gesteuert von den SPM.^{29,30} Diese Lipidmediatoren leiten sich von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acid = PUFA*) ab.²⁸ Grundlage für die

Synthese sind Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure.²⁹ Definitionsgemäß werden die SPM während der Resolutionsphase gebildet, inhibieren unter anderem die Granulozyteninfiltration und -aktivierung, stimulieren Makrophagen zur Phagozytose und verfügen über erweiterte antimikrobielle Wirkungen.³¹ Es sind bislang mehrere SPM bekannt, unter anderem Resolvine (E und D), Protectine, Lipoxine und Maresine.³²

Den SPM gegenüber stehen die proinflammatorischen Mediatoren, unter anderem Leukotriene und Prostaglandine, welche Derivate der ω -6-Fettsäure Arachidonsäure sind. Sie sind starke Chemoattraktanten, aktivieren den sogenannten *respiratory burst* und initiieren die Degranulation von polymorphkernigen Granulozyten (PMNs).³³

Während der Initiationsphase einer akuten Entzündung kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren. Es folgt die Ausbildung der bekannten Kardinalzeichen einer Entzündungsreaktion durch Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Ödembildung und Diapedese der neutrophilen Granulozyten entlang des chemotaktischen Gradienten von intravasal nach extravasal.²⁷

Im physiologischen Verlauf einer Inflammationsreaktion kommt es zu einem sogenannten Mediatorswitch; die Synthese von inflammatorischen Lipidmediatoren wechselt zugunsten von Resolutionsagonisten.³⁴ Als Folge wird die Neutrophilenmigration gestoppt. Die neutrophilen Granulozyten unterlaufen eine Apoptose. Es kommt zu einer Makrophageninvasion an den Ort der Entzündung und konsekutiver Phagozytose und Efferozytose der apoptotischen Zellen und des Detritus. Die Entzündungsreaktion endet damit, dass die Makrophagen den Entzündungsort verlassen und die Gewebshomöostase wiederhergestellt wird.³¹

Eine adäquate und selbstlimitierende Entzündungsreaktion ist lebensnotwendig. Im Falle eines Kontrollverlustes und einer prolongierten oder chronischen Entzündungsreaktion können akute oder chronische Organschäden wie ARDS, Abszesse oder COPD entstehen.²⁷

1.6 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Derivate

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind aliphatische Monocarbonsäuren mit überwiegend unverzweigter Carbonkette von unterschiedlicher Länge, die von einer Carboxyl- und Methylgruppe begrenzt werden. Unterschieden werden die Fettsäuren zum einen anhand der Länge der Kohlenstoffkette, diese kann von 2 bis 30 Kohlenstoffatomen variieren, und zum anderen anhand der Form der kovalenten Bindungen zwischen den Carbonatomen. Die kovalenten Bindungen liegen als Einfach- oder Doppelbindung vor. Im Unterschied zu gesättigten Fettsäuren, die keine Doppelbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen aufweisen, verfügen einfach ungesättigte Fettsäuren über eine Doppelbindung in ihrer Carbonkette und mehrfach ungesättigte Fettsäuren über mehrere Doppelbindungen. Benannt werden die PUFA anhand der Anzahl der Kohlenstoffatome, der Anzahl der Doppelbindungen und der Lokalisation der ersten Doppelbindung. Aufgrund der Relevanz für die vorliegenden Versuche ist folgend exemplarisch die Nomenklatur von Eicosapentaensäure (EPA) dargestellt. Sie lautet 20:5 n-3. In den ω -n-Fettsäuren steht n für das erste Kohlenstoffatom der ersten Doppelbindung. Gezählt wird ab dem Omega(ω)-Kohlenstoffatom, welches Teil der terminalen Methylgruppe ist (Abbildung 1).³⁵

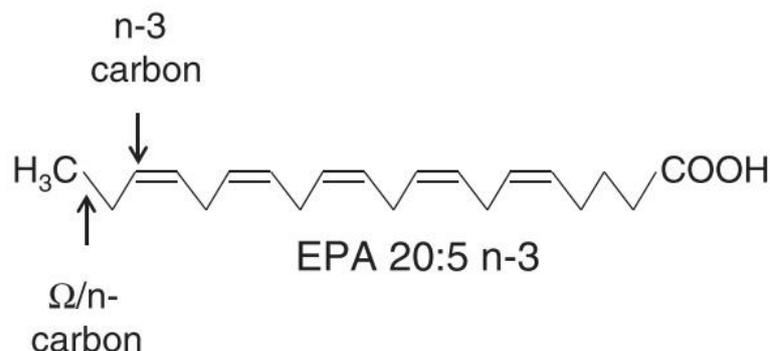


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der ω -3-Fettsäure EPA (Eicosapentaensäure).** Eine ω -6-Fettsäure würde die erste Doppelbindung am 6. Kohlenstoffatom tragen. Modifiziert nach Yates, C. M., *et al.*³⁶

Die beiden ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (ω -6-Fettsäure) und alpha-Linolensäure (ω -3-Fettsäure) sind die einzigen PUFA, die für den Menschen essentiell sind, da sie nicht endogen synthetisiert werden können und somit mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Aus ihnen können die ω -3-Fettsäuren EPA,

Docosahexaensäure (DHA) und die ω -6-Fettsäure Arachidonsäure (AA) synthetisiert werden. Linolsäure kommt häufig in Pflanzenölen wie Sonnenblumenöl oder Sojaöl vor. ω -3-PUFA-reiche Nahrungsmittel sind unter anderem Leinöl, Fisch, Chia-Samen und Quinoa. In der westlichen Diät liegt ein Ungleichgewicht zugunsten von erhöhter ω -6-Fettsäure-Aufnahme vor.³⁵ ω -3-Fettsäuren werden antiinflammatorische und resolutionsfördernde Eigenschaften zugeschrieben, wohingegen ω -6-Fettsäurederivate vorrangig proinflammatorische Wirkung zeigen.^{37,38}

Positive Eigenschaften der ω -3-Fettsäuren sind bereits länger bekannt, lange vor der Erstbeschreibung der SPM. Erste Hinweise auf die Bedeutung bestimmter Fette gab es bereits 1929, als durch Burr und Burr eine Mangelkrankung durch fettlose Diät in Ratten ausgelöst werden konnte.³⁹ ω -3-PUFA wurden zwischen 1978-1993 in Japan, Grönland und Alaska, in Bezug auf die reduzierte kardiovaskuläre Mortalität bei erhöhtem Fischkonsum, erstmalig genauer beschrieben.^{40,41-43} Es zeigte sich darüber hinaus eine verminderte Prävalenz anderer entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Asthma, Psoriasis oder entzündliche Darmerkrankungen.⁴⁴⁻⁴⁶ Es wurde daraufhin eine antiinflammatorische Komponente der ω -3-Fettsäuren vermutet. Im Tiermodell wurde der Einfluss der PUFA vielfach untersucht. So wurde gezeigt, dass durch eine Verschiebung der Lipidmediatoren hin zu ω -3-Fettsäurederivaten die endoepitheliale Barrierestörung durch bakterielles Endotoxin oder Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF) in der isoliert ventilierten Lunge reduziert und die Ödembildung verringert wird.^{47,48} Weiterhin wurde eine verringerte Leukozyteninvasion und niedrigere Proteinkonzentrationen im Alveolarraum nachgewiesen.⁴⁹ Die Produktion der proinflammatorischen und resolutionsfördernden Lipidmediatoren ist abhängig von der Verfügbarkeit der Vorläuferfettsäuren. Im Jahr 2004 gelang es Kang, *et al.* eine transgene Maus zu züchten, die das *C. elegans* fat-1-Gen exprimiert. Dieses kodiert für eine ω -3-Desaturase, die es der Maus ermöglicht, ω -6 in ω -3-PUFA umzuwandeln.⁵⁰ Dies ist insbesondere für das vorliegende Versuchsvorhaben interessant, da auch die Derivate von EPA, wie 18R-HEPE und RvE1, in diesen Mäusen vermehrt nachweisbar sind.⁵¹ In fat-1-transgenen Mäusen war außerdem der Endotoxin-induzierte akute Lungenschaden reduziert.⁵²

Darüber hinaus wurde die parenterale Substitution von ω -3-Fettsäuren in der humanen Sepsis untersucht. Hier konnte der Vorteil einer erhöhten ω -3-Fettsäurenkonzentration

nachgewiesen werden, bedingt durch eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch Monozyten.^{53,54,55}

1.6 18R-HEPE und Resolvin E1

Die entzündungsmodulierende Wirkung der PUFA wird über die Bildung von potenten Lipidmediatoren, den SPM, ermöglicht. In dem vorliegenden Versuch wurde die Wirkung des 18R-HEPE-Resolvin E1-Signalwegs untersucht. Die Bildung von Resolvin E1 (RvE1), dessen Name von *resolution phase interaction products* abgeleitet ist, erfolgt aus Eicosapentaensäure in 2 Schritten. In einem ersten Reaktionsschritt wird EPA in 18R-HEPE über Dioxygenierung durch acetylierte endotheliale COX-2 oder Cytochrom-p450 umgewandelt.^{56,33} Im Anschluss entsteht RvE1 lokal am Entzündungsort durch Oxygenierung in neutrophilen Granulozyten, wenn diese mit vaskulären Endothelzellen interagieren.^{27,57}

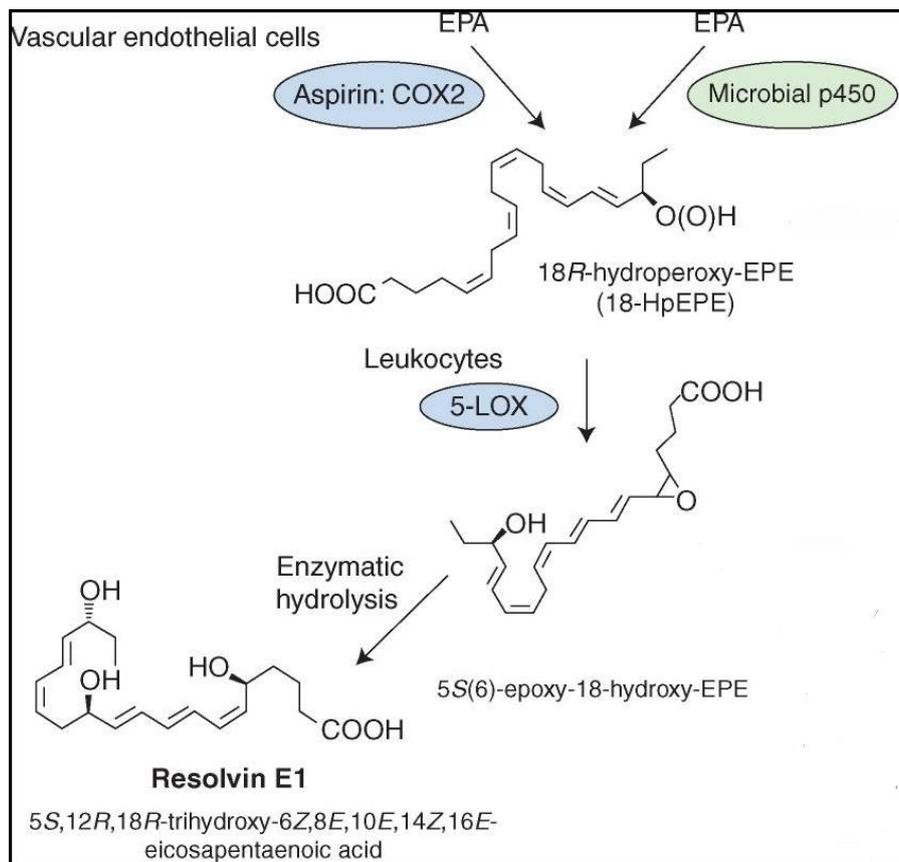


Abbildung 2: **Darstellung der RvE1-Synthese aus Eicosapentaensäure (EPA).** Modifiziert nach Serhan, C.N., *et al.*⁵⁸

RvE1 wirkt vornehmlich über den G-Protein-gekoppelten Chemerin-Rezeptor 23 (ChemR23) und kompetitiv über den Leukotrien-B4(LTB4)-Rezeptor BLT1.⁵⁹ ChemR23 wird in unterschiedlichen Geweben wie Gehirn, im kardiovaskulären System, der Niere, im Gastrointestinaltrakt und vor allem auf Makrophagen und dendritischen Zellen und seltener auch auf T-Lymphozyten exprimiert.^{60,61} Mittels Stimulation von ChemR23 wird die Wirkung von TNF- α -induzierter NF-kappa-B-Aktivierung abgeschwächt, wodurch RvE1 die Migration und Zytokinproduktion von Makrophagen und dendritischen Zellen reguliert.^{33,62} Zusätzlich werden spezielle chemoattraktiv oder chemotaktisch wirksame Proteine, die sogenannten Chemerine, über ChemR23 gebunden. Chemerine besitzen, wie RvE1, entzündungshemmende Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass die Applikation von anti-Chemerin-Antikörpern die Entzündung in einem Peritonitismodell bei Mäusen um ein Vielfaches verstärkt.⁶³ BLT1 Rezeptoren werden primär auf neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und T-Lymphozyten exprimiert.⁶⁴ Durch die RvE1-vermittelte Blockade des BLT1-Rezeptors, exprimiert auf polymorphkernigen Granulozyten, wird die LTB4-induzierte Transmigration der PMNs gehemmt.³³ Darüber hinaus wird durch RvE1 die Phagozytose-induzierte Apoptose von neutrophilen Granulozyten unterstützt, indem intrazelluläre überlebensfördernde Signale blockiert werden. So förderte RvE1 die Caspase-8/Caspase-3-Aktivierung und schwächte darüber hinaus ERK und Akt-vermittelte Apoptose-unterdrückende Signale ab, was über mitochondriale Dysfunktion zu einer Apoptose führte.⁶⁵

Die Effekte von RvE1 sind bislang überwiegend in Tiermodellen untersucht. So schützte RvE1 vor Entwicklung einer Schwefelsäure-induzierten Colitis im Mausmodell.⁶⁶ Weiterhin kam es zu einer RvE-1-vermittelten Verbesserung der Erregerbeseitigung aus der Blutbahn in der murinen systemischen Candidose.⁶⁷

1.7 Fragestellung

Der physiologische Ablauf der Inflamationsreaktion ist essentiell für eine adäquate Erregerelimination und Wiederherstellung der regelrechten Funktion der Lunge. Im Falle einer persistierenden oder überschießenden Entzündungsreaktion oder bei beeinträchtigter Resolution können akute oder dauerhafte Lungenschäden auftreten.

Wie bereits dargestellt spielen RvE1 als Teil der spezialisierten resolutionsfördernden Mediatoren sowie dessen Zielrezeptoren BLT1 und ChemR23 eine zentrale Rolle in der Regulation inflammatorischer Prozesse und insbesondere für die Auflösung der Entzündungsreaktion. Welche Bedeutung die ω -3-PUFA im Allgemeinen und der Signalweg über 18R-HEPE und RvE1 im Speziellen bei der pulmonalen Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* und somit für den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie haben, ist jedoch bisher nicht hinreichend bekannt und soll im aktuellen Versuchsvorhaben untersucht werden. Für diese Fragestellung stehen das etablierte murine Modell der Pneumokokkenpneumonie sowie die speziell genetisch veränderten Modelle (fat-1^{+/+}; ChemR23^{-/-}; BLT1^{-/-}) im Mausmodell zur Verfügung.

2.0 Material und Methoden

Die tierexperimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen der vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigten Versuchsvorhaben G0324/11, G0327/12, T0081/1 durchgeführt.

2.1 Studiendesign

Für die immunhistologische Darstellung und quantitative Bestimmung der BLT1- und ChemR23-Rezeptorexpression (Versuchsteile 3.1 und 3.2) wurden bereits vorhandene Gewebe- und RNA- Proben verwendet, die im Rahmen des Dissertationsvorhabens von Dr. Sandra-Maria Wienhold generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.^{68,69} Diese Versuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigt (Antragsnummer G0356/10).

Tabelle 1: **Studiendesign Versuchsteil 3.3**

Versuchsgruppe		Untersuchungszeitpunkt p.i.	Leukozyten BALF/Blut
WT	+ PBS	72 h	n=8
ChemR23 ^{-/-}	+ PBS	72 h	n=8
BLT1 ^{-/-}	+ PBS	72 h	n=8
Fat-1 ^{+/+}	+ PBS	72 h	n=8
WT	+ <i>S. pneumoniae</i>	72 h	n=8
ChemR23 ^{-/-}	+ <i>S. pneumoniae</i>	72 h	n=8
BLT1 ^{-/-}	+ <i>S. pneumoniae</i>	72 h	n=8
Fat-1 ^{+/+}	+ <i>S. pneumoniae</i>	72 h	n=8

Tabelle 2: **Studiendesign Versuchsteile 3.4 und 3.6**

Versuchsgruppe			Untersuchungszeitpunkt p.i.	Leukozyten BALF/Blut Zytokine BALF Bakterienlast BALF/Blut
WT	Kontrolle	+ PBS	48 h	n=8
WT	HEPE präventiv	+ PBS	48 h	n=8
WT	HEPE therapeutisch	+ PBS	48 h	n=8
WT	Kontrolle	+ <i>S. pneumoniae</i>	48 h	n=8
WT	HEPE präventiv	+ <i>S. pneumoniae</i>	48 h	n=8
WT	HEPE therapeutisch	+ <i>S. pneumoniae</i>	48 h	n=8

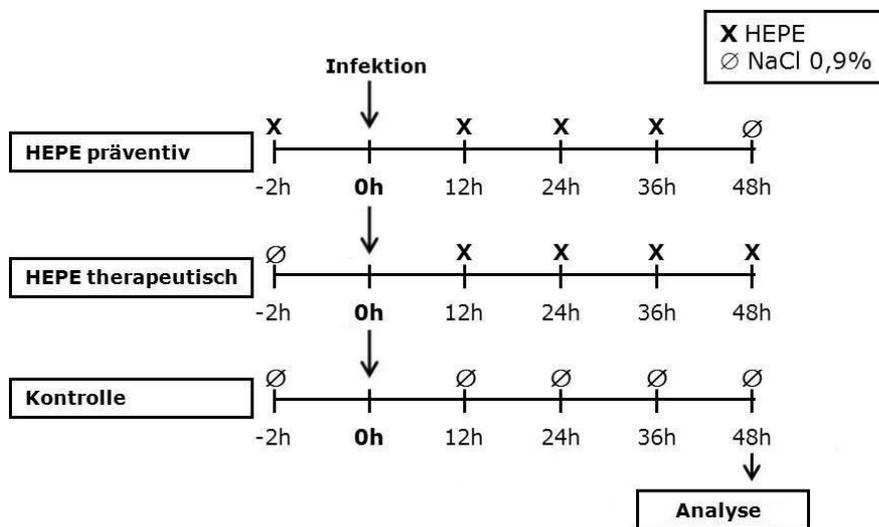


Abbildung 3: **Systematischer Versuchsablauf für die Versuchsteile 3.4 und 3.6**

2.2 Versuchstiere

Für die Untersuchungen in den Versuchsteilen 3.3, 3.4 und 3.6 wurden weibliche, spezifiziert-pathogen-freie (SPF) Wildtyp-Mäuse vom Stamm C57BL/6N im Alter von 8-10 Wochen und einem Gewicht von 18-22 g verwendet. Die Tiere stammten von Charles River Deutschland, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld.

Darüber hinaus fanden im Versuchsteil 3.3 neben den Wildtyptieren, weiterhin weibliche, genetisch veränderte SPF-Mäuse (ChemR23- und BLT1-defiziente Mäuse sowie transgene Mäuse, in deren Genom das *C. elegans* fat-1-Gen zur Expression der ω -3-Desaturase inseriert wurde) Verwendung. Dabei sind die C57BL/6-Ltb4r1^{tm1Adl}

(Kurzbezeichnung: BLT1^{-/-}) Tiere nicht zur BLT1 Rezeptorexpression und die C57BL/6-Cmklr1^{tm1} (Kurzbezeichnung: ChemR23^{-/-}) Tiere nicht zur ChemR23-Rezeptorexpression befähigt. Die C57BL/6-tg(fat-1) Mäuse (Kurzbezeichnung: fat-1^{+/+}) exprimieren dagegen die ω -3-Desaturase, so dass diese Tiere eigenständig ω -6 Fettsäuren in ω -3 Fettsäuren umwandeln können.⁵⁰

Die genetisch modifizierten Mäuse wurden in einem Alter von 8-10 Wochen und einer Körpermasse von 14,9-25,2g verwendet.

Die ChemR23^{-/-} wurden ursprünglich von Takeda, Cambridge, England, die BLT1^{-/-} im Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA und die fat-1^{+/+} von J. Kang aus Boston, Massachusetts, USA generiert. Alle genetisch modifizierten Tiere wurden von Prof. Dr. Konstantin Mayer, Justus-Liebig-Universität Gießen, Zentrales Tierlabor, Frankfurter Straße 105, 35392 Gießen, für wissenschaftliche Zwecke gezüchtet und uns zur Verfügung gestellt.

Die geplanten Tierzahlen (Tabelle 1) konnten in den Gruppen der genetisch veränderten Mäusen nicht erreicht werden, da die Zucht während des Versuchsvorhabens von einem Milbenbefall betroffen war, welcher aufwendig und langwierig saniert werden musste und ab diesem Zeitpunkt keine Mäuse dieser Linien mehr zur Verfügung gestellt werden konnte.

Darüber hinaus wurden im Versuchsteil 3.3 drei infizierte fat-1^{+/+} Mäuse von den Analysen nachträglich ausgeschlossen, da sie bereits vor Versuchsende eine Pneumoniesymptomatik entsprechend der vorab festgelegten Tötungskriterien zeigten und daher unmittelbar euthanasiert werden mussten. Darüber hinaus wurden im Versuchsteil 3.3 die Analysewerte einer scheininfizierten fat-1^{+/+} Maus aufgrund eines technischen Fehlers in der Probenaufbereitung von der Auswertung ausgeschlossen.

2.3 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in der versuchsbezogenen experimentellen Tierhaltung der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin. Der Stall war klimatisiert mit einer streng kontrollierten Temperatur von 20-24°C und Luftfeuchte von 45-65%. Die Beleuchtungszeit betrug

12h am Tag. Die Mäuse wurden in geschlossenen, isoliert ventilierten Käfigen (IVC) vom Typ II long gehalten und hatten *ad libitum* freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

2.4 Herstellung des Nährmediums zur Bakterienkultur

Für das Zusammenstellen des ersten Teils des Nährmediums wurden 30g Todd Hewitt-Bouillon (THY), 5g Hefeextrakt-Suspension und 1l destilliertes Wasser benötigt.

Zuerst wurde die benötigte Menge THY und Hefeextrakt mit einer Waage bestimmt und in einen ausreichend großen Glaskolben gegeben. Anschließend wurde 1l destilliertes Wasser hinzugefügt und die Suspension mithilfe eines Magnetrührgerätes solange vermennt, bis eine klare bräunliche Flüssigkeit entstand. Anschließend erfolgte die Sterilisation der Lösung mittels Autoklaven bei 115°C, 101kDa für 10-15min.

Als zweiter Teil wurde steril-filtriertes fötales Kälberserum (FCS) benötigt. Das FCS wurde zuvor 60min bei 56°C Hitze-inaktiviert, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Ein Aliquot wurde aus der -20°C Lagerung entnommen und im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde es unter einer sterilen Sicherheitswerkbank durch einen 42µm-Filter in ein neues 50ml-Falcon steril filtriert.

Abschließend wurden zu 18ml der Todd-Hewitt-Hefeextrakt Suspension 2ml der sterilen FCS-Lösung hinzugegeben, um die finale Nährlösung mit 10% FCS zu erhalten.

2.5 Anzucht der Pneumokokken

Die Pneumokokken-Stammlösung wurde aus dem -80°C Gefrierschrank entnommen. Mittels Einweg-Plastiköse (1µl) wurde Pneumokokken-Suspension entnommen, auf Columbia-Blutagarplatten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ 9-10h inkubiert. Vor der Bakterienernte wurde die Nährlösung mit 10% FCS in einem 50ml-Referenzgefäß auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens Einzelkolonien von *S. pneumoniae* von der Blutagarplatte in die Nährlösung überführt bis eine optische Dichte (OD) von 0,03-0,04, die unter Verwendung eines Photometers bei einer Wellenlänge von 600nm bestimmt

wurde, erreicht war. Als nächstes erfolgte die Inkubation der Bakteriensuspension für 2h bei 37°C.

2.6 Einstellen der Infektionsdosis

Nach Erreichen der gewünschten OD im Bereich von 0,3 bis 0,4 und Bestimmung des Gesamtvolumens wurde anschließend die Pneumokokken-Suspension bei 3100rpm für 10min zentrifugiert. Mit Hilfe der vorab bestimmten finalen OD (eine OD von 0,1 entspricht einer Bakterienkonzentration von 1×10^8 koloniebildende Einheit/ml (KbE/ml)) und dem Gesamtvolumen wurde das für eine Zielkonzentration von 1×10^9 KbE/ml benötigte Volumen an PBS errechnet. Nach der Zentrifugation und dem Entfernen des Überstandes wurde der verbliebene Bakterienniederschlag in dem entsprechend berechneten Volumen PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien in einer Verdünnungsreihe zunächst mit PBS und abschließend nochmals 1:2 mit 100µl Hyaluronidase (Konzentration 9000 Units/ml) auf die jeweilige Endkonzentration zur Infektion eingestellt.

2.7 Infektion der Tiere

Die Versuchstiere in den Versuchsteilen 3.3 und 3.4/3.6 wurden nach dem gleichen Protokoll infiziert. Die Infektionsdosis in Versuchsteil 3.3 betrug 5×10^4 KbE/Maus, in Versuchsteil 3.4/3.6 1×10^6 KbE/Maus.

Zuerst wurde das Tier unter einer Sterilbank aus dem Käfig entnommen und Körpertemperatur sowie Körpergewicht bestimmt. Anschließend erfolgte die intraperitoneale Injektion des Narkosegemisches, bestehend aus 80mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin und 25mg/kg KG Xylazin verdünnt in 0,9%iger steriler Natriumchlorid-Lösung. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung wurde Thilo-Tears® Augengel vorsichtig auf die Augen der narkotisierten Tiere aufgetragen. Nach Erreichen der entsprechenden Narkosetiefe erfolgte die transnasale Applikation von jeweils 10µl der finalen Bakteriensuspension oder PBS (Kontrollinfektion, 1:2 mit Hyaluronidase vermischt) in jedes der beiden Nasenlöcher mittels 10µl-Pipette

(insgesamt 20µl pro Maus). Unmittelbar im Anschluss wurden die Mäuse in ihren Käfig gelegt und unter Rotlicht solange beobachtet, bis sie wieder vollständig erwacht waren.

2.8 Klinische Überwachung der Tiere

Die Versuchstiere wurden im gesamten Versuchsverlauf im Abstand von 12h klinisch überwacht und die Körpertemperatur, das klinische Bild und die Körpermasse protokolliert. Für den Fall, dass die Erkrankung bei einem Tier wider Erwarten vor Versuchsende soweit fortgeschritten war, dass absehbar war, dass sein Leiden ein ethisch vertretbares Maß überschreiten wird, wurde das Tier anhand der vorab festgelegten Tötungskriterien mittels letaler intraperitoneal injizierter Ketamin/Xylazin-Dosis getötet.

Tabelle 3: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren

Tiernummer:		Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit	Datum/ Uhrzeit
Versuchsbeginn:					
Ausgangsgewicht:					
Tag seit Versuchsbeginn:					
Symptome	Kat.				
Keine Symptome	A				
Beobachtung in Ruhe im Käfig					
Tier isoliert sich	A				
Struppiges/ungepflegtes Fell	A				
Aufgetriebener Leib	A				
Kot abweichend in Farbe, Konsistenz	A				
Atmung n/t/s *	A/B/C				
Schmerzen (gekrümmte Haltung oder Leib aufgezogen, Laufen auf Zehenspitzen)	B				
Krustige Belege am Augenrand, eingesunkene trübe Augen	B				
Blässe (Augen, Ohren)	B				
Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot	B				
Krämpfe, Torkeln	B				
Paresen	B				
Paralysen, spätestens sobald die Gefahr besteht, dass die Tiere aus eigener Kraft Wasser und Futter nicht mehr erreichen	C				
Beim Umsetzen					
Verletzungen, Hautveränderungen	A				
Fehlstellung der Zähne	A				
Tier vermeidet Bewegung	A				
Reaktionsminderung auf äußere Reize (Teilnahmslosigkeit)	A				
Ruhelosigkeit	A				
Circling	A				
Stelzgang	A				
Lokale äußerlich sichtbare Infektionen	B				
Abszesse	B				
Leib hart oder gespannt	B				
Hautfalten bleiben stehen	B				
Ödembildung	B				
Automutilation	B				
Schmerzen beim Anfassen	B				
Moribund	C				
Leib hart und aufgetrieben	C				
Körpertemperatur-Bestimmung [°C]					
Hypothermie	B				
Körpermasse-Bestimmung [g]					
Ungewöhnliche Zunahme	B				
Körpermasseabnahme von $\geq 10\%$	B				
Körpermasseabnahme von $= 20\%$	C				
Unterschrift					

Legende: * Atmung: n = normal; t = beschleunigt/ flach (gilt als Kategorie B); s = schwerfällige/ stark pumpende Atmung (gilt als Kategorie C)

Tötungskriterien (nach Kategorien):

- A** Das Tier weiter beobachten.
- B** Bei Kombination eines B mit Torkeln, Schmerzen oder Blässe ist das Tier unverzüglich schmerzlos zu töten
- C** Tier unverzüglich schmerzlos töten

2.9 18R-HEPE

18R-HEPE (18-hydroxy-5Z,8Z,11Z,14Z,16-Eicosapentaensäure) wurde von der Firma Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA bezogen. Ausgeliefert wurden 250µg gelöst in 2,5ml Ethanol mit einer Reinheit von >97%. Sofort nach Ankunft wurde es unter einer sterilen Sicherheitswerkbank in sterile 0,5ml-Reaktionsgefäße zu je 20µl (2µg 18R-HEPE) auf Eis aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.10 Behandlung mit 18R-HEPE

Pro Maus und Therapiezeitpunkt wurde ein kleines 0,5ml-Reagenzgefäß mit 20µl 18R-HEPE aus der -20°C Lagerung entnommen, aufgetaut und unter einer sterilen Sicherheitswerkbank mit 180µl steriler 0,9%-NaCl-Lösung vermischt. Danach wurde die Injektionslösung in eine 1ml Spritze aufgenommen und bis zur Applikation steril gelagert. Die Injektion bei der Maus erfolgte im Bereich der Kniefalte subkutan unter die Haut. Den präventiv-behandelten Tieren wurden 2h vor Infektion 200µl der 18R-HEPE-Lösung appliziert. Danach erfolgten weitere Applikationen ab 12h nach Infektion im Abstand von 12h bis zum Versuchsende 48h. Als letzte Applikation in der präventiv behandelten Gruppe erhielten die Tiere 200µl 0,9% NaCl vor der Präparation zur Probengewinnung.

Die therapeutisch-behandelte Gruppe bekam als erste subkutane Applikation 2h vor Infektion zunächst nur 200µl 0,9% NaCl verabreicht. Danach ab 12h nach Infektion folgten Behandlungen mit 200µl der 18R-HEPE-Lösung im Abstand von 12h bis zur finalen Probengewinnung 48h *post infectionem*.

Die Kontrollgruppe wurde an allen Zeitpunkten entsprechend nur mit 180µl steriler 0,9% NaCl-Lösung vermischt mit 20µl Ethanol (insgesamt 200µl Kontrolllösung) behandelt.

2.11 Präparation und Probengewinnung

Die Versuchstiere aus Versuchsteil 3.3 wurden nach 72h, in Versuchsteil 3.4/3.6 nach 48h anhand des gleichen Protokolls präpariert:

Nach Bestimmung des Körpergewichts und der Temperatur der Mäuse unter einer sterilen Sicherheitswerkbank erfolgte die intraperitoneale Applikation von Ketamin (160mg/kg KG) und Xylazin (75mg/kg KG) in einem Gesamtvolumen von 200µl. Nach Überprüfen der ausreichenden Narkosetiefe mittels Reflexkontrolle wurden Hals, Thorax und Abdomen der Maus ventral mit Braunol® desinfiziert. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf einer sauberen Schaumstoffunterlage mit Aluminiumfolienüberzug fixiert.

Die Präparation startete mit einem Hautschnitt in der Medianlinie, vom kaudalen Anteil des Abdomens bis unterhalb der Mandibula. Danach erfolgte im Halsbereich die Darstellung der Trachea, wobei die die Luftröhre umgebende Muskelschlauch median mit einer kleinen Schere längs gespalten wurde. Nach Legen einer Ligatur um die Trachea wurde diese ventral unterhalb des Larynx quer zu 2/3 eingeschnitten. Danach wurde die Beatmungspumpe eingeschaltet, die Trachealkanüle in die Trachea eingeführt und die Ligatur verknotet, um die Trachealkanüle zu fixieren. Die Beatmung der Maus erfolgte per Überdruck mit 150µl Raumluft pro Atemzug und 150 Atemzügen pro Minute. Anschließend wurde das Peritoneum bis zum *Processus xyphoideus* längs eingeschnitten, der *Processus* angehoben und das Diaphragma entlang des Rippenbogens eröffnet. Als nächstes wurde Heparin 125IE/50µl intrakardial mit einer Spritze verabreicht. Danach erfolgte die Darstellung der *Vena cava caudalis* und 2min nach Heparinisierung die Punktion der Vene und Blutentnahme. Nach dem vollständigen Blutentzug zur Tötung der Maus erfolgte die mediane Sternotomie. Beide Thoraxhälften wurden fixiert und pleurale Verklebungen, die sich im Rahmen der Pneumonie bildeten, vorsichtig von der Thoraxwand gelöst. Danach erfolgte die Resektion des Thymus und des Perikards. Eine Ligatur wurde um die *Arteria pulmonalis* gelegt und die Herzspitze entfernt. Nach Erweiterung des linken Ventrikels wurde ein Katheter über die rechte Herzkammer bis zur *Arteria pulmonalis* vorgeschoben und mit der Ligatur fixiert. Anschließend wurde die Lunge mit steriler 0,9% Natriumchloridlösung für 3min perfundiert. Als letztes wurde die Lunge über die Trachealkanüle zweimal mit je 800µl eiskaltem sterilem PBS versetzt mit

Proteaseinhibitoren (cOmplete Mini®, Roche) langsam und sorgfältig lavagiert. Abschließend erfolgte noch die sterile Entnahme der kompletten Lunge.

2.12 Quantifizierung und Differenzierung der Leukozyten in der BALF

Nach Durchführung der broncho-alveolären Lavage (BAL) wurde das zurückgewonnene Volumen der beiden BAL-Flüssigkeiten (BALF 1 und BALF 2) bestimmt und in je einem 5ml Polypropylen-Rundbodenröhrchen auf Eis bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Für die Bestimmung der Erregerlast wurden 30µl BALF 1 in ein steriles Mikroreaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Nach Beendigung der Probengewinnung wurden BALF 1 und 2 für 10min bei 2200rpm und 4°C zentrifugiert. Aus den beiden Röhrchen wurde der Überstand bis auf 50µl entnommen, um das Zellpellet zu schonen. Die Überstände von BALF 1 und BALF 2 wurden jeweils in 1,5ml-Reagenzgefäße aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die zurückgebliebenen Zellpellets von BAL 1 und 2 wurden in insgesamt 1ml eiskaltem PBS resuspendiert. Danach erfolgte die Auszählung der Leukozyten in der BALF. Dazu wurden je 5µl Zellsuspension mit 5µl Methylviolett vermischt und in einer Neubauerkammer unter dem Mikroskop ausgezählt (die Leukozytenzahl aus 4 Großquadraten wurde durch 4 geteilt und danach mit 20.000 multipliziert).

Anschließend wurde die Zellsuspension mit sterilem, eiskaltem PBS auf ungefähr 4ml aufgefüllt und bei 4°C und 1500rpm für 5min zentrifugiert. Um die unspezifische Bindung der nachfolgend verwendeten Antikörper-Fluoreszenzfarbstoff-Konjugate an Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Leukozyten zu verhindern, wurde nach Abgießen des Überstandes das Zellpellet mit 2µl Fc-Block (ausreichend für 1×10^6 Zellen) versetzt und 10min bei 4°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde der Mastermix mit den zu verwendenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern hergestellt. Dazu wurde pro BALF-Probe (= pro Maus an dem Versuchstag) je 3µl Antikörper (Ak) und einmal 3µl Pipettierverlust pro Antikörper mit FACS-Puffer vermischt. Es wurden GR-1 (Klon: RB6-8C5) PE-konjugiert, CD45 (Klon: 30-F11) PerCP-konjugiert und F4/80 (Klon: BM8) APC-konjugiert verwendet. Von diesem Antikörpergemisch wurden dann je 3µl in ein 5ml-

Polystyren-Rundbodenröhrchen vorgelegt und schließlich die entsprechende BALF-Zellsuspension hinzu pipettiert, vermischt und bei 4°C 20min im Dunkeln inkubiert.

Als nächstes wurden pro BALF-Probe je 500µl BD-FACS Lysing Solution hinzugegeben und 10min in Dunkelheit und bei 4°C inkubiert, um eventuell vorhandene Erythrozyten zu lysieren und die Zellen sowie die Antikörper-Antigen-Komplexe zu fixieren. Anschließend wurden die Röhrchen bis auf ca. 4ml mit FACS-Puffer aufgefüllt und dann bei 4°C und 1500rpm mit Bremse 5min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und die gefärbten Zellen in 500µl FACS-Puffer resuspendiert.

Abschließend erfolgte die Differenzierung der Leukozytensubpopulationen und Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten im Durchflusszytometer FACS-Calibur der Firma BD Biosciences (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Die Unterscheidung der Zellen erfolgte anhand des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter*, FSC), des Seitwärtsstreulichtes (*side scatter*, SSC) und dem Muster der Antikörperfärbung.

2.13 Quantifizierung und Differenzierung der Leukozyten im Blut

Nach Blutentnahme aus der *Vena cava caudalis* ungefähr 2min nach Heparinisierung, wurde das Blutvolumen bestimmt und 60-100µl in ein EDTA-Röhrchen transferiert, gut geschwenkt und bis zur Weiterverarbeitung (Bestimmung Leukozyten bzw. Erregerlast) auf Eis gelagert.

Das restliche Blut wurde bei 4°C und einer Drehzahl von 4000rpm 10min zentrifugiert, das Plasma in 3 kleine 0,5ml-Reagenzgefäße aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Leukozytendifferenzierung im Blut mittels Durchflusszytometrie wurde ein Fluoreszenzantikörper-Gemisch hergestellt. Dazu wurden pro Blutprobe 5µl jedes Antikörpers plus einmalig 3µl verwendet, um den Pipettierverlust auszugleichen. CD3e (Klon: i45-2C11) FITC-konjugierter, GR-1 (Klon: RB6-8C5) PE-konjugierter, CD45 (Klon: 30-F11) PerCP-konjugierter und CD19 (Klon: 1D3) APC-konjugierter Antikörper wurden verwendet.

Anschließend wurden vom hergestellten Antikörper-Mastermix für jede Blutprobe 20µl des Gemisches auf die Siebchen der BD Trucount®-Röhrchen vorgelegt. Nach vorsichtigem Durchmischen der Blutproben in den EDTA-Röhrchen mit einer Pipette wurden pro Probe 50µl Blut zu den Antikörpern dazu pipettiert. Nach sanftem Durchmischen auf einem Rüttelgerät wurden die Proben 20min im Dunkeln bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 450µl BD Lyse Puffer pro Blutprobe und 10min lichtgeschützte Inkubation bei 21°C, um die Erythrozyten zu lysieren, die Antikörperbindungen zu festigen und die Zellen zu fixieren. Danach wurde die Suspension erneut auf einem Rüttelgerät vorsichtig gemischt und in ein 5ml-Polystyren-Röhrchen überführt. Abschließend wurde die Leukozytenkonzentration im Blut im Verhältnis zu den in den Trucount®-Röhrchen enthaltenen fluoreszierenden *counting beads* bestimmt und die einzelnen Leukozytensubpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung des FACS-Calibur der Firma BD Biosciences differenziert. Die Unterscheidung der Zellen erfolgte anhand des Vorwärtsstreulichtes (*forward scatter, FSC*), des Seitwärtsstreulichtes (*side scatter, SSC*) und dem Muster der Antikörperfärbung.

2.14 Zytokinquantifizierung im BALF-Überstand mittels ProcartaPlex-Immunoassay

Die Zytokinquantifizierung wurde mit zellfreiem Überstand der ersten BAL (BALF 1) durchgeführt. Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung der Zytokine in der BALF wurde ein Multiplex Immunoassay (ProcartaPlex®) der Firma affymetrix eBioscience für folgende Zytokine verwendet: TNF- α , RANTES, IL-1 β , MCP-1, IL-10 und INF- γ . Die Durchführung des Assays erfolgte entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

Als erste Schritte wurden die Gebrauchslösungen des Waschpuffers entsprechend der Herstellerangaben hergestellt. Der Zytokinstandard wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll mit PBS und 0,5% entfettetem BSA rekonstituiert und in einer Verdünnungsreihe auf Eis in 7 Schritten jeweils 1:4 verdünnt. Für die Messung wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Als erster Schritt wurden je 50µl der *magnetic beads* -

Lösung in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurde die Platte unter Verwendung eines manuellen *magnetic-plate washers* mit 150µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen. Danach wurden je 50µl der auf Eis aufgetauten BALF1-Überstände pur, der Standardverdünnungen sowie 50µl PBS mit 0,5% entfettetem BSA (Blank) als Doppelbestimmung in die jeweilige Vertiefung transferiert und 60min bei Raumtemperatur und 500rpm lichtgeschützt inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der 96-*well*-Platte wurden 25µl des Detektionsantikörpers (1X) in jede Vertiefung pipettiert und noch einmal 30min bei Raumtemperatur und 500rpm lichtgeschützt inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten wurden 50µl *streptavidin-phycoerythrin conjugate* (SAPE)-Lösung pro Vertiefung hinzugefügt und 30min bei Raumtemperatur und 500rpm lichtgeschützt inkubiert. Nachfolgend wurde die Platte dreimal gewaschen. Schlussendlich wurden 150µl *reading buffer* pro Vertiefung hinzugefügt, die Platte weitere 5min bei RT und 500rpm inkubiert und anschließend im Bio-Plex *array reader* mit der Bioplex Manager 6.0 Software analysiert und ausgewertet.

2.15 Bestimmung der Bakterienanzahl

2.15.1 BALF

Um die Erregerlast in der BALF zu quantifizieren, wurde die Anzahl der KbE pro Lunge bestimmt.

Die BALF wurde auf einem Rüttelgerät gemischt und eine Verdünnungsreihe jeweils 1:10 bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 angesetzt. Aus den einzelnen Verdünnungsstufen wurden jeweils 10µl BALF-Suspension mit 180µl sterilem PBS auf Columbia-Agarplatten mit 5%-Schafsblut aufgetragen und verstrichen. Nach dem Trocknen der Platten wurden diese im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert und am nächsten Morgen die Bakterienkolonien ausgezählt. Die Auswertung erfolgte anhand der Formel:

$$(\text{Anzahl KbE} \times \text{Verdünnungsstufe}) / 10 = \text{KbE}/\mu\text{l}$$

2.15.2 Blut

Das Blut im EDTA-Röhrchen wurde vorsichtig mit einer Pipette gemischt und eine Verdünnungsreihe schrittweise 1:10 bis zu einer Verdünnung von 1:1000 hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden anschließend jeweils 10µl Suspension mit je 180µl PBS auf Blutagarplatten aufgetragen, verstrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Auszählung der Bakterienkolonien erfolgte am nächsten Tag. Die Pneumokokken-Konzentration im Blut wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet: $(\text{Anzahl KbE} \times \text{Verdünnungsstufe}) / 10 = \text{KbE} / \mu\text{l}$

2.16 Phagozytose-Assay

2.16.1 Isolation von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark

Nach Euthanasie der C57BL/6N Wildtyp-Mäuse wurden Humerus, Femur und Tibia der Maus entnommen.

Anschließend erfolgte die Extraktion der Knochenmarkszellen unter einer sterilen Arbeitsbank. Dazu wurden die Knochen in eine Petrischale mit sterilem Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% HEPES) gegeben und der Markraum unter Verwendung einer 1ml-Spritze und 24G Nadel solange gespült, bis sich dieser entfärbt hatte. Anschließend wurde die Zellsuspension aus der Petrischale in ein 50ml Röhrchen pipettiert und bei 1500rpm 5-6min zentrifugiert. Als nächstes wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 3ml Erythrozyten-Lysepuffer (BioLegend, Lot: B229740, 1:10 verdünnt) resuspendiert und für 3-5min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Lyse mit 30ml PBS abgestoppt und die Zellsuspension erneut bei 1500rpm für 5-6min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in 10ml FCS resuspendiert.

Die Zellen wurden anschließend unter dem Mikroskop gezählt, die Zellsuspension erneut bei 1500rpm für 5-6min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit FCS und 10% DMSO in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml resuspendiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension aliquotiert und schrittweise erst bei -20°C, dann bei -80°C weggefroren.

2.16.2 Gewinnung von L929-Zellüberstand

Zur Herstellung von L929-Zellüberstand, welches *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) enthält, wurde zunächst L-Zell Medium (RPMI 1640 + 10% FCS + 1% Glutamin) auf 37°C vorgewärmt. Danach wurden 19ml in ein 50ml-Reagenzröhrchen und 8ml in eine T75-Zellkulturflasche vorgelegt. Ein Gefrierstock mit 1×10^7 L-Zellen wurde aus der Lagerung genommen. Mit Hilfe des vorgewärmten Mediums wurden die L-Zellen behutsam aufgetaut, indem immer 1ml Medium im Lagerungsgefäß auf- und abpipettiert und dann in das 50ml-Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurde das 50ml-Röhrchen bei 20°C und 1300rpm für 5min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte eine Resuspension der Zellen in 5ml Medium und schließlich Übertragung in die T75-Zellkulturflasche. Nach 3 Tagen Kultivierung unter täglicher Kontrolle wurde der Zellüberstand abgesaugt und verworfen. Zu den adhärennten Zellen wurde 2ml Trypsin/EDTA gegeben und 5min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden 8,5ml Medium hinzugegeben und mehrmals auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde aufgeteilt, sodass 5x2ml Suspension zur Überstandproduktion in T175-Zellkulturflaschen mit jeweils 100ml Medium gegeben wurden. Die übrigen 0,5ml konnten zur weiteren Zellproduktion verwendet werden. Die T175-Zellkulturflaschen wurden zunächst bei 37°C inkubiert, bis die Zellen konfluent waren. Danach erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 10 Tage. Abschließend wurde der Zellüberstand entnommen, steril filtriert, aliquotiert und bei -80°C weggefroren oder zur Differenzierung der isolierten Knochenmarkszellen verwendet.

2.16.3 Herstellung des M-CSF Mediums

Für das Zellkulturmedium mit M-CSF wurden 350ml im Wasserbad erwärmtes, steriles RPMI 1640, 10% warmes FCS, 30% warmer L929-Zell-Überstand (M-CSF), 1% L-Glutamine, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% HEPES und 1% NEAA (nicht-essentielle Aminosäuren) vermischt.

2.16.4 Kultivierung und Differenzierung der Knochenmarkszellen

Zum Auftauen und Kultivieren der Knochenmarkszellen wurden 10ml M-CSF Medium in ein 50ml Falcon gegeben und 19ml Medium in ein weiteres 50ml Falcon. Anschließend wurde ein 1ml-Aliquot der Knochenmarkszellsuspension aus der -80°C-Lagerung entnommen und zügig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen sofort zu den 19ml M-CSF Medium hinzu pipettiert und bei Raumtemperatur und 1300rpm 5min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Zentrifugat in 1ml M-CSF Medium resuspendiert und dann auf 10ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde danach in eine sterile Zellkulturschale überführt und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag wurden noch einmal 10ml M-CSF Medium in die Schale hinzugegeben und die Zellen durch langsames Auf- und Abpipettieren vom Boden der Schale gelöst. Als nächstes erfolgte die Aufteilung der Makrophagen-Suspension auf zwei sterile Petrischalen. Danach wurden die Knochenmarkszellen 7 Tage lang im Brutschrank inkubiert.

2.16.5 Ernte der Knochenmarksmakrophagen

Nach Entfernen des Überstandes aus den Petrischalen mit einer Vakuumpumpe wurden die am Schalenboden adhärenen Makrophagen mit 2,5ml eiskaltem PBS mit 0,4% EDTA (0,5M) 10min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden nochmals 7,5ml eiskaltes PBS zugegeben und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden gelöst.

Danach wurde die Zellsuspension in ein 50ml-Röhrchen übertragen und die Makrophagen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer und Trypanblau-Färbung ausgezählt. Dazu wurden 10µl Trypanblau und 10µl Zellsuspension vermischt und in die Kammer gegeben. Die Zahl ungefärbter viable Zellen wurde in 4 großen Quadranten ausgezählt, das arithmetische Mittel pro Großquadrat gebildet und mit 10.000 sowie dem Verdünnungsfaktor (1:2) multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu errechnen. Anschließend wurde die Lösung bei 20°C und einer Drehzahl von 1300rpm 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit dem

benötigten Volumen von RPMI 1640 mit 10% FCS resuspendiert, um eine Zellzahl von 1×10^6 /ml zu erhalten.

Nachfolgend wurden von der Zellsuspension je 600µl, was 600.000 Makrophagen entspricht, in je 1 Well einer 24-Well-Platte gegeben. Danach wurde die Platte für eine Minute bei 1200rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ und danach die Stimulation mit 18R-HEPE.

2.16.6 Ansetzen der 18R-HEPE Stimulationslösungen und Stimulation der Makrophagen

Um die gewünschten Konzentrationen von 0,1µM, 1µM und 10µM pro Well zu erhalten, wurden zunächst 100µl 18R-HEPE aus der Lagerung bei -20°C aufgetaut. Das zur Lösung des lipophilen 18R-HEPE verwendete Ethanol wurde mittels Stickstoffgas evaporiert. Es blieb 10µg reines 18R-HEPE im 0,5ml-Reagenzgefäß zurück (entspricht 0,031µmol). Anschließend wurde 1µl DMSO als Lösungsmittel hinzu pipettiert, um eine 31,3mM Lösung zu erhalten. Diese wurde dann mit RPMI 1640 plus 10% FCS weiter verdünnt und die Zellen mit 0,1, 1 und 10µM 6h vor Infektion mit *S. pneumoniae* stimuliert.

2.16.7 Infektion der Makrophagen mit *S. pneumoniae*

Zur Infektion wurde der unbekapselte *S. pneumoniae* Serotyp 2 Stamm R6X verwendet. Die Bakterienanzucht erfolgte analog zu dem oben beschriebenen Protokoll (siehe Kapitel 2.5). Die so hergestellte Ausgangskonzentration von 1×10^9 KbE/ml wurde bis 1×10^6 KbE/ml in RPMI 1640 verdünnt.

Vor Infektion der Knochenmarksmakrophagen wurde der Überstand der kultivierten Zellen aus den Wells der 24-well-Platte entfernt und mit frischem 450µl RPMI/10% FCS Medium aufgefüllt. Danach wurden 50µl der Pneumokokken-Suspension hinzu pipettiert, sodass eine Bakterienkonzentration von 1×10^5 KbE/ml und well erreicht wurde. Nach Zentrifugation für 5min bei 1000rpm und 20°C wurden die Zellen eine Stunde lang im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die adhärenen Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor 500µl Gentamicin-Lösung (Verdünnung 1:1000 in RPMI 1640, fc=50µg/ml) pro *well* hinzugegeben und eine weitere Stunde inkubiert wurde, um die restlichen extrazellulären Bakterien zu inaktivieren.

Anschließend wurde erneut mit PBS dreimal gewaschen, danach 500µl 0,1% Saponin pro Vertiefung hinzugefügt, 10min bei 37°C inkubiert, um die Makrophagen anschließend mittels Auf- und Abpipettierens zu lysieren.

Abschließend wurden pro *well* 10µl der Zellysate auf eine 5%-Schafsblutagar-Platte gegeben, verstrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten ausgezählt und die Konzentration der KbE pro Vertiefung berechnet.

2.17 Quantitative Bestimmung der Rezeptorexpression in Lungenhomogenaten mittels qPCR

Um die Regulation der Expression des Leukotrien-B₄-Rezeptor 1 (LTB₄R1 = BLT1) und des Chemerin-Rezeptor 23 (ChemR23) in Mauslungen im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie zu analysieren, stellte Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold dem aktuellen Projekt freundlicherweise cDNA Proben, gewonnen von mRNA isoliert aus Lungenhomogenaten, für die Real Time PCR (qPCR) Untersuchungen zur Verfügung.^{69,68}

Durchgeführt wurde die qPCR mit dem AB 7300-Real Time PCR-System und dem TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®). Darüber hinaus wurde der TaqMan Gene Expression Assay für LTB₄R1 von der Firma Applied Biosystems® (AssayID Mm00521839_m1) verwendet.

Primer und Sonden für den Rezeptor ChemR23 wurden in unserem Labor designed (Programm: PrimerExpress 3.0® (Applied Biosystems)) und von der Firma Metabion international AG® wie folgt hergestellt.

Tabelle 4: **Sequenzen des TaqMan Assay on Demand für ChemR23**

Name	Sequenz
ChemR23 <i>mouse forward primer (fw)</i>	5'-TGAAAG GTC TCC AAA GAG ATG GA-3'
ChemR23 <i>mouse reverse primer (rv)</i>	5'-ACA AAG TAG CCA AAG CCA TCA GA-3'
ChemR23 <i>mouse probe</i>	5'Fam-TAC GAC GCT TAC AAC GAC TCC GGC ATC TAT-Tamra-3'

Als endogene Kontrolle (Referenzgen) diente die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Tabelle 5: **Sequenzen des TaqMan Assay on Demand für GAPDH**

Name	Sequenz
GAPDH <i>mouse forward primer (fw)</i>	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
GAPDH <i>mouse reverse primer (rv)</i>	5'CCTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' '
GAPDH <i>mouse probe</i>	5'-FAM-CCGCCTGGAGAAACCTGCCAAG- TATG-TAMRA-3'

Zunächst wurden Primer und Sonde des ChemR23-Assay entsprechend Herstellerangaben in einer Konzentration von 180nmol/ml (Primer, 10X) bzw. 50nmol/ml (Sonde, 10X) in Nuklease-freiem sterilem Wasser gelöst. Anschließend wurden die Bestandteile zusammengefügt, um den ChemR23 Assay on Demand herzustellen:

80µl fw + 80µl rv + 80µl *probe* + 560µl A. dest = 800µl Assay on Demand (AoD)

Hiernach erfolgte sowohl für den TaqMan Gene Expression Assay für LTB4R1, wie auch für den ChemR23 Assay on Demand die Herstellung eines Gesamtmastermixes entsprechend Tabelle 6.

Tabelle 6: **Herstellung des Gesamtermixes pro Probenansatz**

Reagenz	Menge
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10µl
Nuklease-freies Wasser	4µl
TaqMan® Gene Expression Assay oder Assay on Demand	1µl
Gesamtvolumen pro Probenansatz: 15µl	

Für die Analyse wurde eine 96-well-Platte (Prism® 96-well-optical-reaction-plate (Applied Biosystems®, USA)) verwendet. In jede Vertiefung wurden 5µl cDNA plus 15µl Gesamtermix pipettiert. Die cDNA wurde hiernach vorsichtig heruntergeklopft. Die Platte wurde kurz bei 1000g zentrifugiert und anschließend im ABI 7300-Real Time PCR System (Applied Biosystems®, USA) gemessen. Zuerst erfolgte eine Inkubation für 2min bei 50°C, danach eine Inkubation von 10min bei 95°C. Hiernach erfolgten 40 Amplifikationszyklen (Denaturierung bei 95°C für 15sec, Elongation 1min bei 60°C). An das 5'-Ende der TaqMan Sonde ist ein fluoreszierender Reporterfarbstoff (FAM) gebunden, an das 3'-Ende ist ein Quencher-Farbstoff (TAMRA) gebunden. Zur Vermeidung einer Extension des 3'-Endes während der PCR wird das 3'-Ende mit einem Phosphat-Rest versehen. Durch die Nähe des Reporterfarbstoffs zum Quencher während der Hybridisierungsphase wird die Fluoreszenz unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase in der Elongationsphase eine Sonde am 5'-Ende erreicht, wird die Sonde durch die Nukleaseaktivität der Polymerase geschnitten. Dadurch wird der Farbstoff vom Quencher getrennt und das Signal nimmt zu. Mit jedem Zyklus nimmt das Signal zu. Die Messung erfolgte zweifach in Einzelwerten, woraus dann der Mittelwert gebildet wurde. Die Auswertung und Bestimmung der relativen Quantifizierung erfolgten unter Verwendung der Delta-Delta-CT-Methode. Die Berechnung wurde mit folgender Formel wie folgt durchgeführt:

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

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

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

2.18 Immunhistochemie

Für die immunhistologische Evaluierung der Expression des BLT1 und des ChemR23 Rezeptors in der Mauslunge stellte Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold dem aktuellen Projekt freundlicherweise bereits vorhandene Gewebeschnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Mauslungen zur Verfügung.⁶⁹ Die histologische Aufarbeitung und Untersuchung erfolgte durch Frau Kristina Dietert, PhD und Dr. Corinne Gurtner am Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Die Präparation der Tiere wurde wie in der Dissertation von Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold beschrieben durchgeführt.⁶⁹ Dabei wurde die intakte Lunge mit Trachea entnommen und in 3,7% Formaldehydlösung für 24h – 48h immersionsfixiert. Im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin wurden die fixierten Lungen in Paraffin eingebettet und ca. 2µm-dicke Gewebsschnitte hergestellt. Für die immunhistochemische Färbung von BLT1 und ChemR23 wurden die Lungenschnitte mit *rabbit anti-mouse* BLT1 (1:25, LifeSpan BioSciences, LS-A1494) bzw. *rabbit anti-mouse* ChemR23 (1:100, Cohesion Biosciences, CPA1246) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Anschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem biotinylierten *goat anti-rabbit* Sekundärantikörper (1:200; Fa Vector, BA-1000) und nachfolgend mit Meerrettichperoxidase-gebundenem Streptavidin zur Darstellung des BLT1 oder alkalischer Phosphatase-gebundenem Streptavidin zur Darstellung des ChemR23 für 30min bei Raumtemperatur nochmals inkubiert. Die Chromogene 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) bzw. Triamino-Tritolyl-Methanchlorid (Neufuchsin) dienten als Substrat der Meerrettichperoxidase- bzw. alkalischen Phosphatase zur Farbentwicklung der BLT1 und ChemR23-Färbung. Die Schnitte wurden anschließend mittels Hämatoxylin (zur Darstellung der Zellkerne) gegengefärbt. Die histologische Beurteilung erfolgte verblindet durch die Mitarbeiter des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin.

2.19 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Daten wurde GraphPad PRISM 6.00 der Firma Graph Pad Software Incorporated verwendet. Die Ergebnisse der Leukozytendifferenzierung, der Zytokinquantifizierung der klinischen Parameter und

die Bakterienanzahl des Phagozytose-Assay sind als Mittelwert und Standardabweichung (SD), die Bakterienlast ist als *scatter dot plot* mit Median angegeben. Die statistische Testung erfolgte für Versuchsreihen mit lediglich zwei experimentellen Gruppen zu einem einzigen Zeitpunkt mit dem Mann-Whitney U-Test. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte die Testung mittels One-Way ANOVA (Kruskal- Wallis-Test mit Dunns post-hoc Test für relevante Gruppen). Für die statistische Auswertung der Zytokinquantifizierung wurden Werte unter dem Detektionslimit als 0 definiert. p-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3.0 Ergebnisse

3.1 BLT1 und ChemR23-Rezeptoren werden in der murinen Lunge exprimiert

BLT1 und ChemR23 stellen als Zielrezeptoren von Resolvin E1 wichtige Elemente der Inflammationsregulation dar. Zum Nachweis der Expression der beiden RvE1-Rezeptoren in der murinen Lunge wurden mit Pneumokokken infizierte und nicht infizierte Lungen immunhistologisch untersucht.

Dafür erfolgte die Aufarbeitung und Beurteilung der Mauslungen im Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin. Die Begutachtung der immunhistochemischen Färbung des BLT1-Rezeptors und verblindete immunhistologische Begutachtung durch die Tierpathologen ergab, dass sich BLT1 vor allem in Bronchialepithelzellen der Lunge (Abbildung 4A, roter Pfeil) sowie Alveolarmakrophagen (Abbildung 4B/C, roter Pfeil), vereinzelt auf der Zelloberfläche von Makrophagen im Bereich der Alveolarsepten und in Makrophagen im Bereich von Entzündungsherden darstellen ließ. Darüber hinaus wurde eine vereinzelte Expression von BLT1 auf der Zelloberfläche von Endothelzellen beobachtet (in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt).

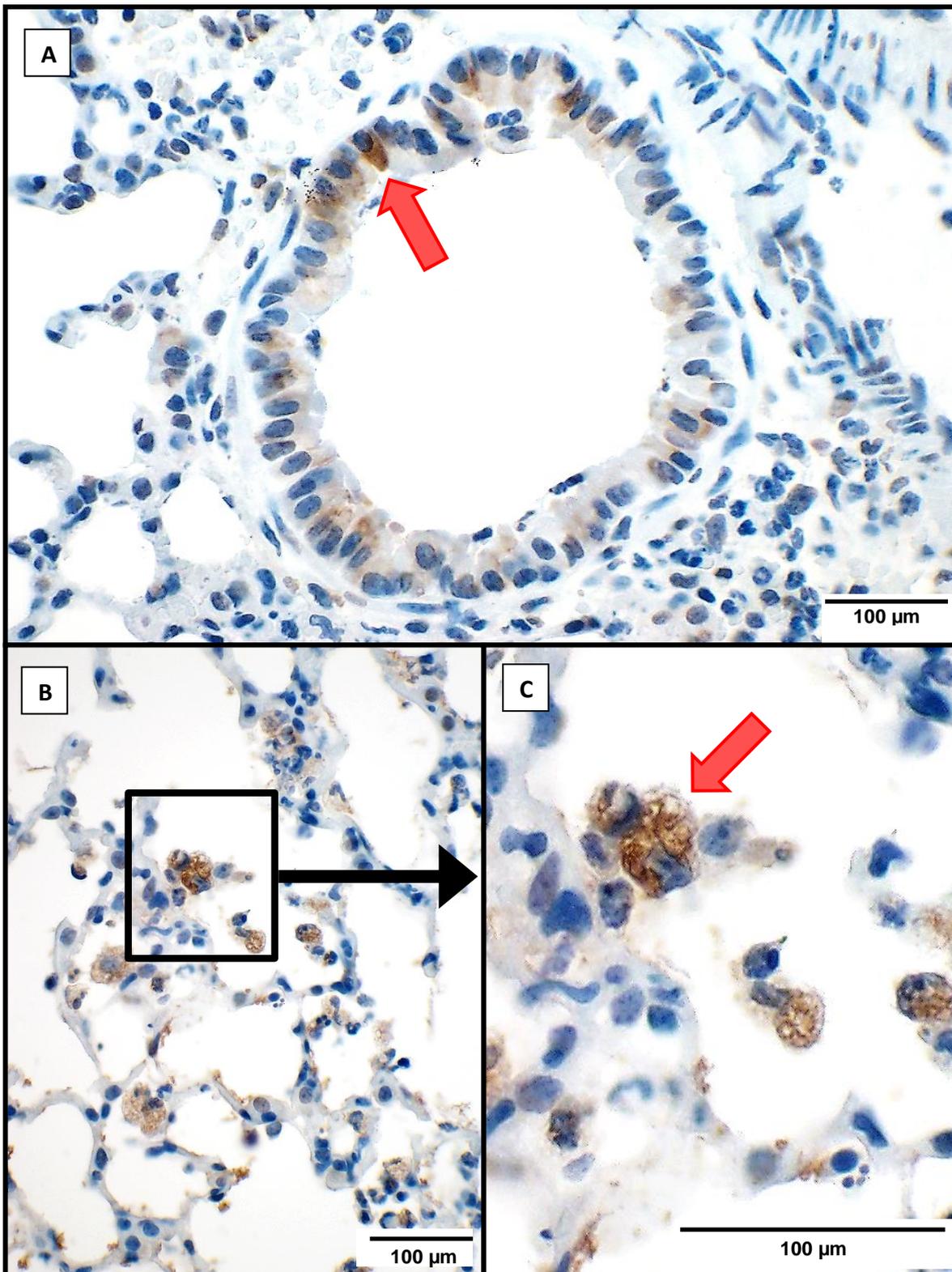


Abbildung 4: Immunhistologische Darstellung der Expression des BLT1-Rezeptors in der murinen Lunge. C57BL/6N Wildtyp-Mäuse wurden mit PBS transnasal infiziert. Am Versuchsende (36h nach PBS-Kontrollinfektion) wurde die Lunge als Ganzes entnommen, Formalin-fixiert, geschnitten und BLT1 immunhistochemisch gefärbt (braun). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (dunkelblau-violett). Positive Signale für eine BLT1 Expression zeigten vorrangig Bronchialepithelzellen (A, roter Pfeil) sowie Makrophagen (B, C roter Pfeil) der murinen Lunge. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte (n = 3).

Darüber hinaus ergab die verblindete Beurteilung der immunhistologischen Färbung der Lungen durch die Tierpathologen, dass ChemR23 vor allem von Bronchialepithelzellen sowohl in unverändertem Lungengewebe (Abbildung 5A, roter Pfeil) als auch im Bereich von Entzündungsherden mittel- bis hochgradig, von Makrophagen im Bereich von unveränderten Alveolarsepten (Abbildung 5B und C, roter Pfeil) sowie im Bereich von Entzündungsherden gering- bis mittelgradig exprimiert wird. Ferner wurde eine Expression in einzelnen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen nachgewiesen (in der vorliegenden Arbeit nicht abgebildet).

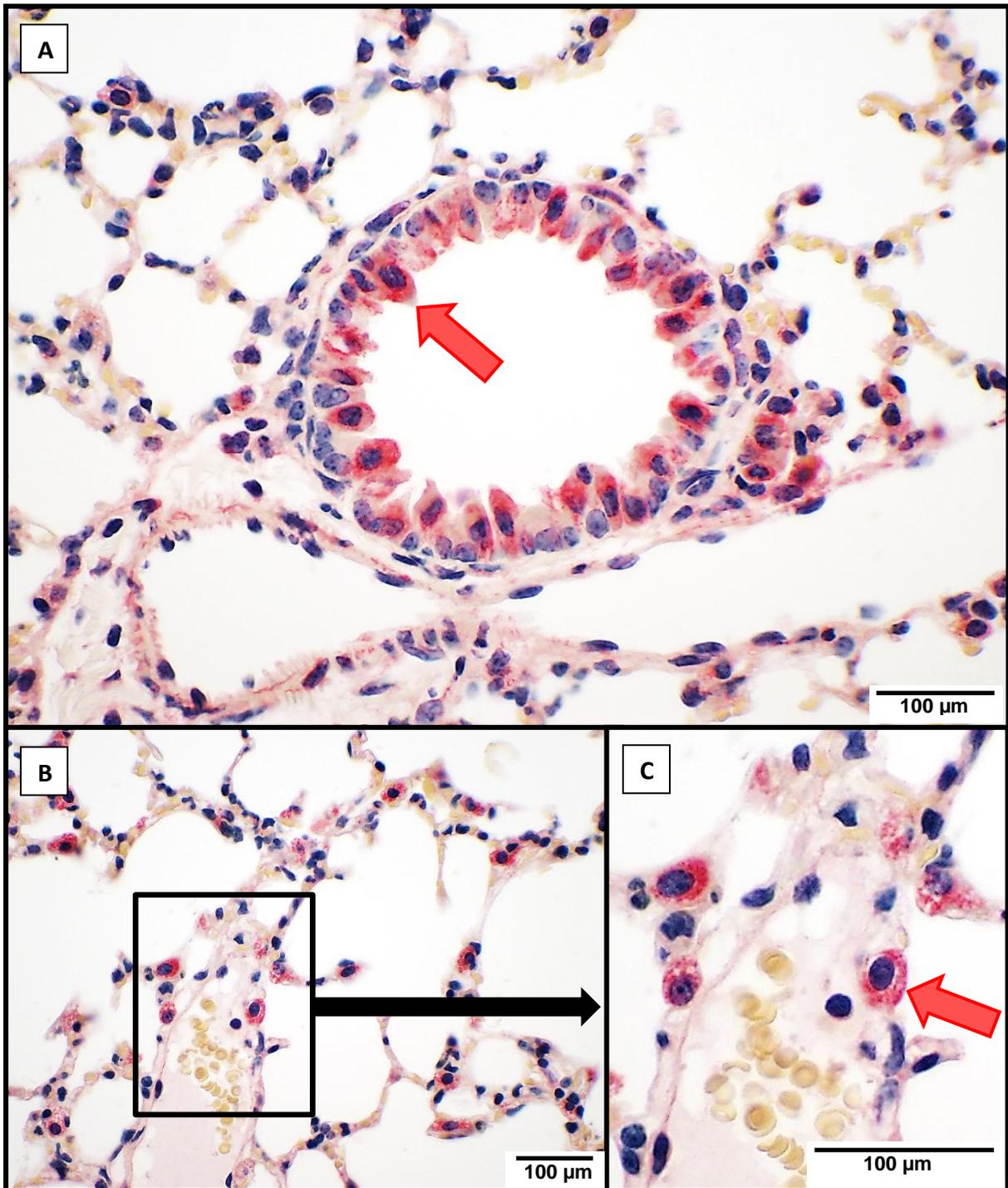


Abbildung 5: **Immunhistologische Darstellung der Expression des ChemR23-Rezeptors in der murinen Lunge.** C57BL/6N Wildtyp-Mäuse wurden mit PBS transnasal infiziert. Am Versuchsende (36h nach PBS-Kontrollinfektion) wurde die Lunge als Ganzes entnommen, Formalin-fixiert, geschnitten und ChemR23 immunhistochemisch gefärbt (rot). Die Zellkernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (dunkelblauviolett). Positive Signale für eine ChemR23-Expression zeigten vorrangig Bronchialepithelzellen (A, roter Pfeil) sowie Makrophagen (B, C roter Pfeil) der murinen Lunge. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte (n = 3).

3.2 Quantitative Bestimmung der BLT1 und ChemR23 Rezeptorexpression nach Infektion mit *S. pneumoniae* in der Mauslunge

Um einen möglichen Effekt der Pneumokokkeninfektion auf die Expression der RvE1-Rezeptoren BLT1 und ChemR23 per se und ihre Regulation im Verlauf der Infektion in der Mauslunge zu evaluieren, erfolgte eine quantitative Bestimmung der Rezeptorexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *S. pneumoniae* mittels *real-time* PCR. Dafür wurden Mäuse transnasal mit 5×10^6 KbE *S. pneumoniae* infiziert. Kontrolltiere wurde entsprechend phosphat-gepufferte sterile Kochsalzlösung (PBS) transnasal appliziert. Ab 24h nach Infektion wurden die Tiere intraperitoneal mit Ampicillin oder steriler Kochsalzlösung (NaCl) im Abstand von 12h bis zum Versuchende behandelt. Die Präparation und Probenentnahme erfolgten 24, 36, 72 oder 120h nach Infektion. In der Versuchsgruppe der infizierten und kontrollbehandelten Tiere wurden die Analysen bis max. 48h nach Infektion durchgeführt. Die aus den entnommenen Lungen isolierte RNA wurde freundlicherweise von Frau Dr. Sandra-Maria Wienhold für die aktuelle Untersuchung zur Verfügung gestellt.^{68,69}

Die Infektion mit Pneumokokken induzierte eine erhöhte Expression des BLT1 Rezeptors in der murinen Lunge im Vergleich zu den kontroll-infizierten Tieren 24h und 36h nach Infektion. Die Ampicillinbehandlung im weiteren Verlauf der Pneumokokkeninfektion führte zu einer Reduktion der BLT1-Expression bis 72h nach Infektion (Abbildung 6A).

Die Analyse der ChemR23-Expression ergab dagegen, dass die Infektion zunächst zur Reduktion der Expression in der Lunge mit einem signifikanten Unterschied zwischen nicht-infizierten Kontrolltieren und infizierten unbehandelten Versuchstieren zum Zeitpunkt 48h *post infectionem* führte. Auch die infizierten, mit Ampicillin-behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen zunächst eine signifikant reduzierte Expression des ChemR23-Rezeptors in der Lunge zum Zeitpunkt 48h und 72h nach Infektion, die jedoch deutlich über dem Level der infizierten unbehandelten Vergleichsgruppe lag (48h p.i.) und im weiteren Verlauf 120h nach Infektion wieder das Expressionsniveau der nicht-infizierten Kontrolltiere erreichte (Abbildung 6B).

Zusammenfassend induzierte die Infektion mit *S. pneumoniae* in der akuten Phase der Entzündung die BLT1-Rezeptorexpression, welche im weiteren Verlauf unter

Anibiotikatherapie wieder abfiel. Dagegen reduzierte die Infektion mit *S. pneumoniae* die ChemR23 Expression in der Lunge, die sich unter Antibiotikatherapie jedoch wieder deutlich erholte.

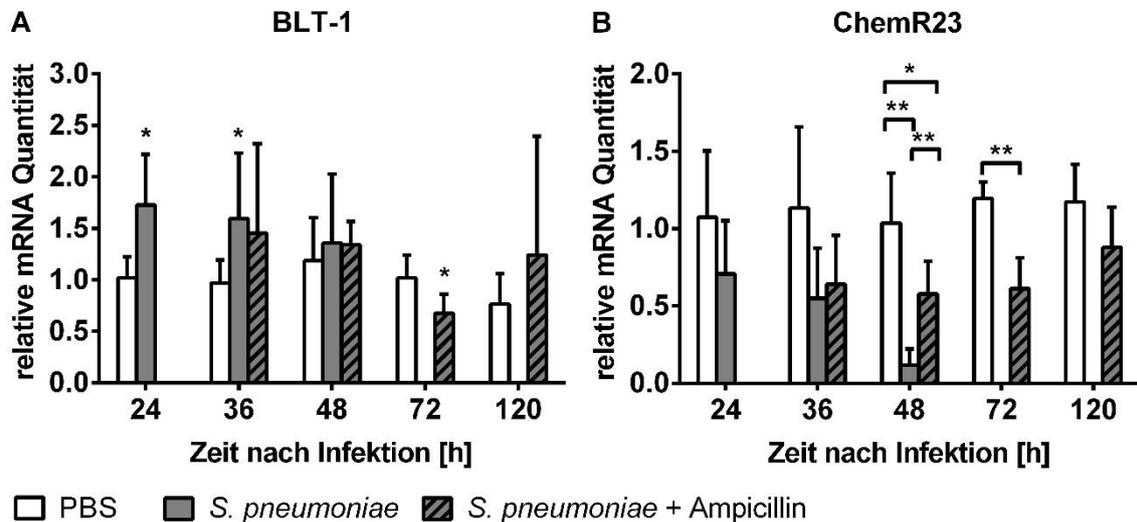


Abbildung 6: **Genexpression des murinen BLT1-Rezeptors und ChemR23-Rezeptors in der Lunge nach Infektion mit Pneumokokken.** Mäuse wurden mit PBS (Kontrollinfektion) oder 5×10^6 KBE *S. pneumoniae* transnasal infiziert und ab 24h nach Infektion mit Ampicillin oder Kontrolllösung (NaCl 0,9%) im Abstand von 12h intraperitoneal behandelt. Am Versuchsende 24h, 36h, 48h, 72h und 120h wurden die Lungen entnommen und die Genexpression von BLT1 (A) und ChemR23 (B) mittels qPCR in Lungenhomogenaten quantifiziert. Infizierte, kontrollbehandelte Tiere wurden nur bis zum Zeitpunkt 48h untersucht, wohingegen infizierte, Ampicillin-behandelte Gruppen erst ab dem Zeitpunkt 36h nach Infektion mitgeführt wurden. Die Werte sind angegeben als Mittelwert + SD (n=5-6); *p < 0,05 und **p < 0,01 (Vergleich zu nicht-infizierten Kontroll-behandelten Tieren, sofern nicht anders angegeben)

3.3 Die Rolle des endogenen 18R-HEPE-RvE1-ChemR23/BLT1-Signalweges in der murinen Pneumokokkenpneumonie

Da in den vorangegangenen Untersuchungen eine deutliche Regulation der RvE1-Rezeptoren BLT1 und ChemR23 im Verlauf der Pneumokokkeninfektion gezeigt werden konnte, wurde nachfolgend die Rolle des endogenen 18R-HEPE-RvE1-ChemR23/BLT1 Signalweges in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. Hierfür wurden ChemR23-defiziente (ChemR23^{-/-}) und BLT1-defiziente (BLT1^{-/-}) Mäuse sowie entsprechende Wildtypmäuse desselben Mausstammes (C57BL/6N WT) transnasal mit 5×10^4 KBE *S. pneumoniae* Serotyp 3 oder PBS (Kontrolle) infiziert.

Darüber hinaus wurden transgene Mäuse verwendet, die das fat-1 Gen exprimieren (fat-1^{+/+}). Das fat-1 Gen kodiert für eine ω -3-Desaturase, die es diesen Mäusen ermöglicht, ω -6 in ω -3-PUFA umzuwandeln und so endogen auf erhöhte Mengen an EPA-Derivaten wie 18R-HEPE und RvE1 zurückgreifen zu können.^{50,70} Die Infektionsdosis von 5×10^4 KbE ist hierbei im Bereich einer letalen Dosis von ca. 30% (LD30) für weibliche C57BL/6N Tiere im Alter von 8-10 Wochen einzuordnen und wurde ausgewählt, um im Analysezeitraum von 72h einen subletalen Verlauf der Infektion mit beginnenden Resolutionsprozessen abzubilden.

3.3.1 Klinischer Verlauf

Die Tiere wurden zur objektiven Bewertung des Gesundheitszustandes nach der transnasalen Infektion mit *S. pneumoniae* über einen Zeitraum von 72h klinisch überwacht und Körpermasse und -temperatur wurden in einem 12h Intervall bestimmt.

Die Körpermasse der ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} und fat-1^{+/+} Tiere unterlag ohne bakterielle Infektion keinen signifikanten Veränderungen im Verlauf der 72h im Vergleich zu den nicht-infizierten Wildtyp-Tieren. Nach Infektion mit *S. pneumoniae* zeigte sich in den Wildtyp-Tieren keine signifikante Reduktion der mittleren Körpermasse. Ebenso unterlagen die ChemR23^{-/-} und BLT1^{-/-} Tiere nach Pneumokokkeninfektion im Vergleich der Mittelwerte zu den Wildtyp-Tieren keinen signifikanten Körpermasseveränderungen. Die fat-1-transgenen Mäuse, welche zu endogener Konversion von ω -6-PUFA in ω -3-PUFA im Stande sind, zeigten eine den Wildtyp-Tieren vergleichbare Körpermasseentwicklung nach Infektion mit *S. pneumoniae* (Tabelle 7). Ein Teil der Versuchstiere wies jedoch, wie erwartet und aus Infektionsversuchen unter Verwendung einer LD100 bekannt, einen messbaren Körpermasseverlust nach Infektion auf, wodurch sich die Standardabweichung zu den Zeitpunkten 48h und 72h erhöhte (Tabelle 7).^{71,68}

Die Evaluation der Körpertemperatur im Verlauf der Untersuchung zeigte in allen scheininfizierten Versuchsgruppen keine Unterschiede im Verlauf und im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe. Alle bestimmten Messwerte der Körpertemperatur lagen im physiologischen Bereich gesunder Tiere. Auch nach Infektion mit *S. pneumoniae* wiesen die Wildtyp-Mäuse im Verlauf keine signifikanten

Veränderungen der Körpertemperatur auf. Ebenso konnten in den infizierten ChemR23^{-/-} und BLT1^{-/-} Tieren sowie den fat-1^{+/+}transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen nach Infektion keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 8).

Zusammenfassend ist es anhand der Vitalparameter bei einem Großteil der Versuchstiere zu keiner klinisch sichtbaren Infektion gekommen. Darüber hinaus kann ebenfalls festgehalten werden, dass die ChemR23- und BLT1-defizienten und fat-1-transgenen Versuchstiere sich in den Vitalparametern nicht von Wildtypen unterscheiden (Tabelle 8).

Tabelle 7: Körpermasse [%] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder *S. pneumoniae*

Versuchsgruppe	Körpermasse (%)							
	Zeit (h) nach Infektion							
	0		24		48		72	
Wildtyp + PBS	100 ± 0	(6)	98,3 ± 4,2	(6)	99,7 ± 4,8	(6)	100,2 ± 2,7	(6)
ChemR23 ^{-/-} + PBS	100 ± 0	(4)	96,4 ± 3,5	(4)	98,6 ± 4,8	(4)	101,7 ± 4,0	(4)
BLT1 ^{-/-} + PBS	100 ± 0	(8)	95,2 ± 2,1	(8)	97,5 ± 2,9	(8)	99,9 ± 4,1	(8)
fat-1 ^{+/+} + PBS	100 ± 0	(7)	94,1 ± 2,4	(7)	93,0 ± 6,6	(7)	94,2 ± 5,9	(7)
Wildtyp + <i>S.pn.</i>	100 ± 0	(7)	95,7 ± 1,7	(7)	97,2 ± 4,2	(7)	93,4 ± 7,7	(7)
ChemR23 ^{-/-} + <i>S.pn.</i>	100 ± 0	(4)	96,9 ± 1,4	(4)	95,4 ± 2,6	(4)	94,1 ± 8,2	(4)
BLT1 ^{-/-} + <i>S.pn.</i>	100 ± 0	(8)	93,8 ± 3,7	(8)	93,8 ± 8,1	(8)	93,4 ± 12,0	(8)
fat-1 ^{+/+} + <i>S.pn.</i>	100 ± 0	(5)	99,5 ± 2,4	(5)	98,8 ± 3,7	(5)	99,2 ± 7,1	(5)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD, Gruppengröße (n)

Tabelle 8: **Körpertemperatur [°C] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder *S. pneumoniae***

Versuchsgruppe	Körpertemperatur [°C]							
	Zeit (h) nach Infektion							
	0		24		48		72	
Wildtyp + PBS	37,7 ± 0,3	(6)	38,3 ± 0,3	(6)	37,7 ± 0,4	(6)	37,2 ± 0,3	(6)
ChemR23 ^{-/-} + PBS	38,6 ± 0,8	(4)	38,5 ± 0,3	(4)	38,0 ± 0,8	(4)	37,9 ± 0,4	(4)
BLT1 ^{-/-} + PBS	37,7 ± 0,6	(8)	37,8 ± 0,3	(8)	37,5 ± 0,4	(8)	37,3 ± 0,5	(8)
fat-1 ^{+/+} + PBS	37,6 ± 0,4	(7)	38,0 ± 0,6	(7)	37,6 ± 0,5	(7)	36,9 ± 0,7	(7)
Wildtyp + <i>S.pn.</i>	37,1 ± 0,5	(7)	38,0 ± 0,2	(7)	37,3 ± 0,5	(7)	37,2 ± 0,6	(7)
ChemR23 ^{-/-} + <i>S.pn.</i>	37,9 ± 0,6	(4)	38,2 ± 0,4	(4)	38,2 ± 0,4	(4)	37,4 ± 0,4	(4)
BLT1 ^{-/-} + <i>S.pn.</i>	37,3 ± 0,6	(8)	37,5 ± 0,8	(8)	37,1 ± 0,6	(8)	37,1 ± 0,8	(8)
fat-1 ^{+/+} + <i>S.pn.</i>	37,0 ± 1,1	(5)	36,9 ± 2,2	(5)	34,3 ± 4,7	(5)	37,0 ± 1,5	(5)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD, Gruppengröße (n)

3.3.2 Einfluss auf die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge

Zusätzlich zu den klinischen Parametern wurde am Versuchsende 72h nach Infektion die lokale Entzündungsreaktion in der Lunge eingehender analysiert. In der gewonnenen BAL-Flüssigkeit wurden mittels Durchflusszytometrie (FACS) die Gesamtleukozyten quantifiziert sowie die Anzahl der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bestimmt.

Die im bronchoalveolären Raum ermittelten Leukozytenzahlen der PBS-infizierten ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} und fat-1^{+/+} Tiere zeigten keine signifikante Differenz zu den Wildtyptieren. Eine Infektion mit einer LD30 von *S. pneumoniae* induzierte nur eine marginale Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in der Gruppe der Wildtyptiere im Vergleich zur nicht-infizierten Vergleichsgruppe. Die Zahl der Makrophagen und Lymphozyten blieben dagegen unverändert. Die infizierten ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} und fat-1^{+/+} Mäuse zeigten keine signifikante Veränderung in allen untersuchten Leukozytensubpopulationen im Vergleich zu den infizierten Wildtypmäusen (Abbildung 7).

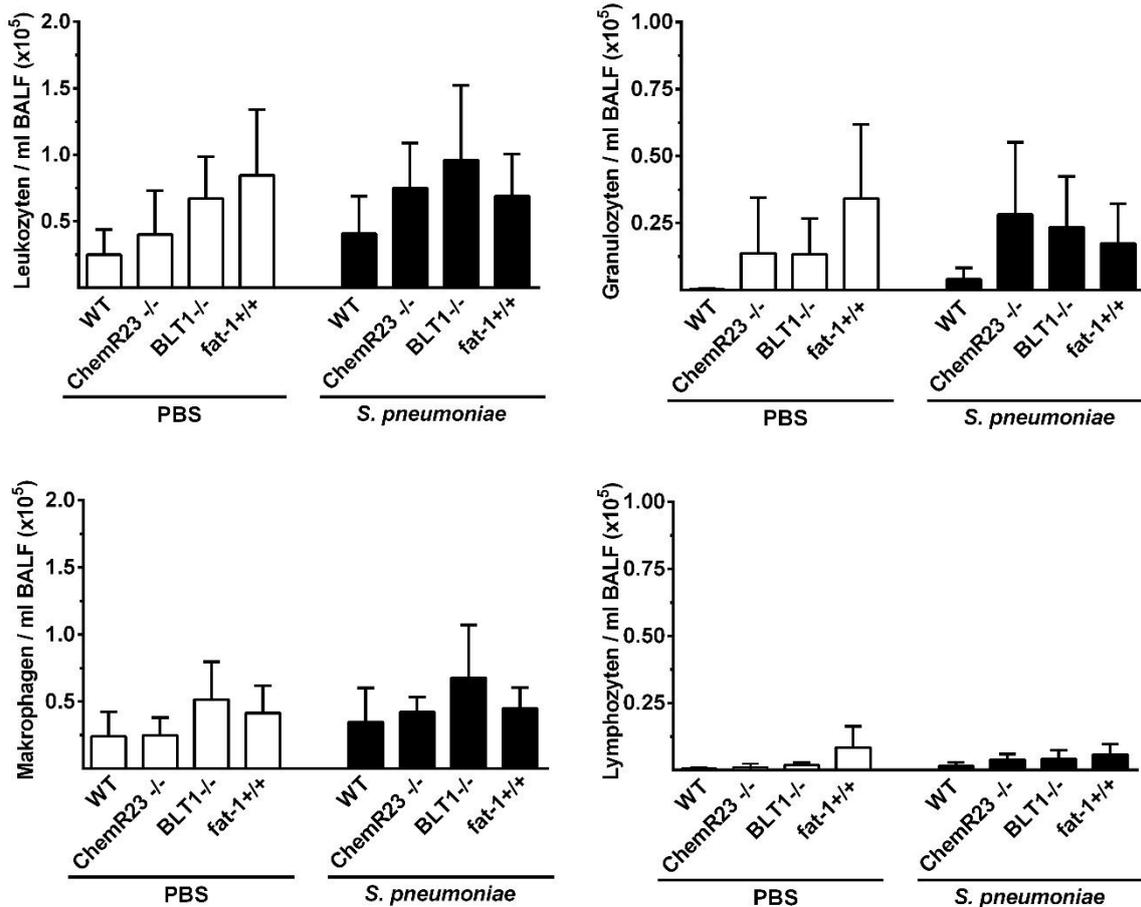


Abbildung 7: **Bestimmung der Leukozytenzahlen und Differenzierung der Subpopulationen in der BAL-Flüssigkeit mittels Durchflusszytometrie.** Die C57BL/6N Wildtyp, ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} und fat-1^{+/+} Tiere wurden transnasal mit PBS (Kontrolle) oder *S. pneumoniae* (5x10⁴ KbE) infiziert. Nach 72h erfolgte eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) und nachfolgend die Quantifizierung der Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in der BAL Flüssigkeit (BALF) mittels Durchflusszytometer. Die Werte sind als Mittelwert + SD angegeben (n = 4-8).

3.3.3. Einfluss auf die systemische Entzündungsreaktion

Neben den Entzündungszellen der BAL-Flüssigkeit wurde auch das Leukozytendifferentialzellbild im Blut mittels Durchflusszytometer untersucht. Im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie unter Verwendung einer LD100 ist bekannt, dass es in der akuten Phase der Infektion zu einer Leukozytopenie mit deutlich reduzierten Lymphozytenzahlen bei erhöhter Granulozytensubpopulation als Zeichen einer systemischen Beteiligung der Infektion mit Bakteriämie kommt.^{68,72} In der vorliegenden Studie zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den

einzelnen Versuchsgruppen, weder zwischen den infizierten Tieren und ihren scheininfizierten Kontrollen, noch bei den ChemR23^{-/-}, BLT1^{-/-} oder fat-1^{+/+} Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe (Abbildung 8).

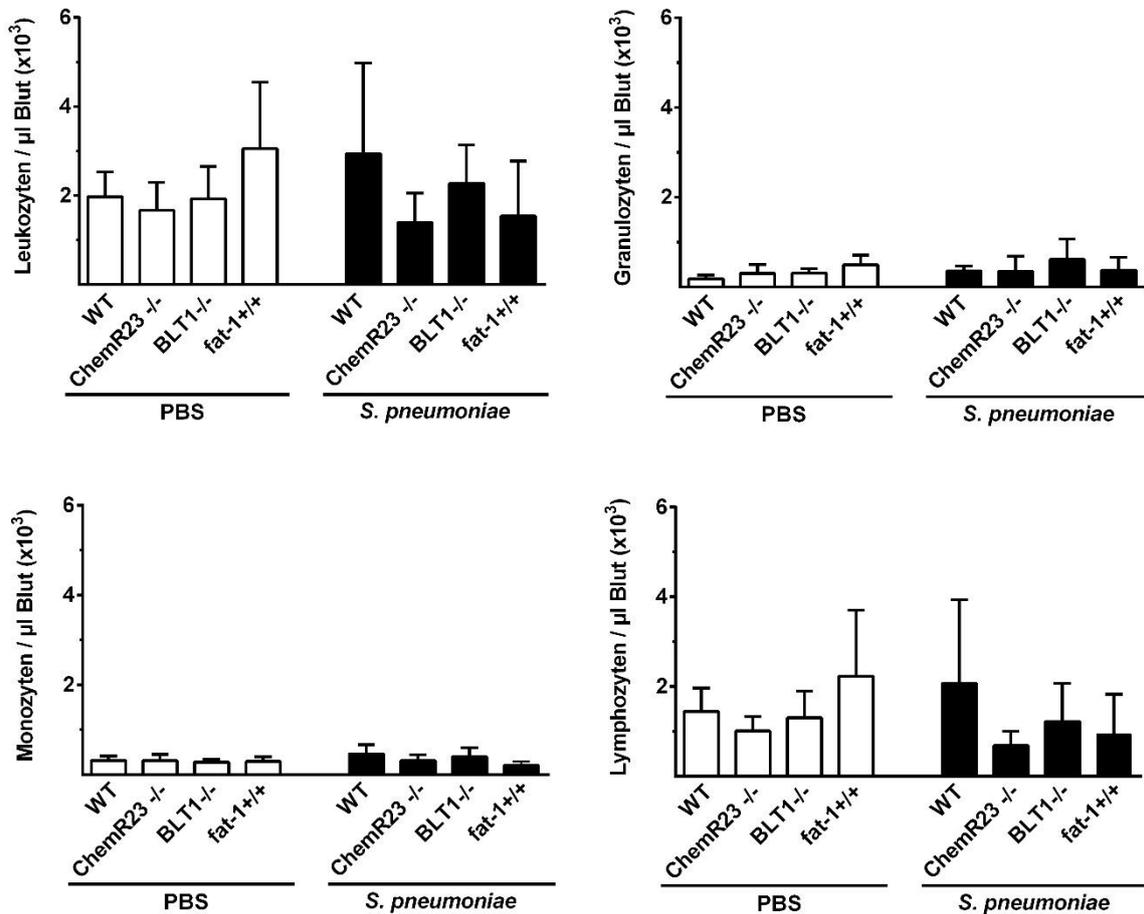


Abbildung 8: **Bestimmung der Leukozytenzahlen und des Differentialzellbildes im Blut mittels Durchflusszytometrie.** Die Tiere wurden mit PBS (Kontrolle) oder *S. pneumoniae* (5×10^4) infiziert. Nach 72h erfolgte die Blutentnahme im Rahmen der finalen Dissektion und anschließend die Quantifizierung der Gesamtleukozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten mittels Durchflusszytometer. Die Werte sind als Mittelwert + SD angegeben (n = 4-8).

3.4 Präventive und therapeutische 18R-HEPE-Behandlung in der murinen Pneumokokkenpneumonie

Die bisher dargestellten Ergebnisse der Infektionsversuche unter Verwendung der ChemR23- und BLT1-defizienten sowie fat-1-transgenen Mäuse erbrachten vorerst keine Hinweise darauf, dass der endogene 18R-HEPE–RvE1–ChemR23/BLT1–Signalweg allein einen zentralen Einfluss auf den Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie ausübt. So zeigten sich weder bei Fehlen der RvE1-Rezeptoren ChemR23 und BLT1 und damit deutlicher Beschränkung der RvE1-Wirkung, noch bei permanentem endogenen Überangebot von RvE1 und seiner Vorläuferfettsäuren in der fat-1-transgenen Mauslinie signifikante Unterschiede in den analysierten Parametern im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypkontrollen.^{59,73,50}

Offen ist jedoch die Frage, ob eine exogene Behandlung mit RvE1 und damit eine gezielte von außen zugeführte und zeitlich festgelegte Erhöhung des RvE1-Angebotes lokal am Ort der Entzündung einen Einfluss auf die Ausprägung und den Verlauf der murinen Pneumokokkenpneumonie hat und damit einen weitaus vielversprechenderen Ansatz insbesondere auch hinsichtlich der Entwicklung einer adjunktiven Therapie dargestellt. Aus diesem Grund wurde in einem weiteren Versuch der Effekt einer 18R-HEPE-Behandlung in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. Dafür wurde die Behandlung mit 18R-HEPE gewählt, da es als direkte Vorstufe von RvE1 erst am Ort der Inflammation durch die 5-Lipoxygenase neutrophiler Granulozyten in RvE1 umgewandelt wird und seine Wirkung somit nur lokal in Anwesenheit aktivierter Granulozyten entfaltet.⁷⁴ Hierfür wurden C57BL/6N-Wildtypmäuse jeweils mit 2µg 18R-HEPE subkutan behandelt. Die Versuchsgruppen wurden hierfür in 2 Versuchsarme mit infizierten versus schein-infizierten Versuchsgruppen, und dann weiter in jeweils 3 Behandlungsgruppen aufgeteilt.

Die entsprechenden drei Behandlungsgruppen unterschieden sich im Zeitpunkt der 18R-HEPE-Behandlung. Eine erste Versuchsgruppe (HEPE präventiv) erhielt 2h vor Infektion sowie 12h, 24h und 36h nach Infektion jeweils eine subkutane (s.c.) Injektion von 2µg 18R-HEPE. In einer zweiten Behandlungsgruppe (HEPE therapeutisch) erfolgten alle vier subkutanen 18R-HEPE-Behandlungen nach der Infektion (12h, 24h, 36h, 48h). Die Kontrollbehandlung erfolgte mit dem entsprechenden Volumen Kontrolllösung s.c. Die Wahl einer präventiven sowie einer therapeutischen

Behandlungsstrategie sollte hierbei näher beleuchten, welche Rolle der Applikationszeitpunkt in Relation zur Infektion spielt.

Da in den vorangegangenen Untersuchungen in Punkt 3.3 unter Verwendung von 5×10^4 KbE *S. pneumoniae* nur bei einem Teil der Tiere eine klinisch apparente Pneumonie induziert wurde, und auch die Entzündungsparameter nicht, wie für das Modell erwartet und beschrieben, signifikant induziert wurden, fand in den nun nachfolgend beschriebenen Experimenten die Infektion mit 1×10^6 KbE *S. pneumoniae* Serotyp 3 statt.⁷¹ Die Verwendung dieser höheren Infektionsdosis, die in den Bereich einer LD100 einzuordnen ist, zielt hierbei darauf ab, in allen Tieren der Wildtypkontrollgruppe eine nachweisbare und reproduzierbare, lokale und systemische Inflammationsreaktion zu induzieren, um so potentielle Effekte der 18R-HEPE Behandlung überhaupt analysieren zu können und die Streuung der erhobenen Daten innerhalb der Versuchsgruppen zu reduzieren. Die Kontrollgruppen erhielten eine Scheininfection mit PBS transnasal. Als Versuchsendzeitpunkt wurde 48h *post infectionem* gewählt, um den Einfluss der 18R-HEPE-Behandlung im Vollbild der Pneumonie zu erfassen.

3.4.1 Auswirkungen der subkutanen 18R-HEPE-Applikation auf das klinische Bild in der murinen Pneumokokkenpneumonie

Als objektive Beurteilung des klinischen Bildes der Versuchstiere zur Evaluation des Einflusses der 18R-HEPE-Behandlung auf die Krankheitsausprägung wurden Körpermasse (Tabelle 9) und Körpertemperatur (Tabelle 10) der Tiere bestimmt.

Die Körpermasse der mit PBS scheininfizierten Versuchstiere zeigte keine Abnahme über den Zeitraum von 48h. Dagegen induzierte die Infektion mit 1×10^6 KbE *S. pneumoniae* einen deutlichen Abfall der Körpermasse verglichen mit den jeweiligen scheininfizierten Tieren. Weder die präventive noch therapeutische 18R-HEPE-Behandlung führte zu einer signifikanten Veränderung der Körpermasseentwicklung nach Scheininfection mit PBS oder *S. pneumoniae* im Vergleich zur kontrollbehandelten Versuchsgruppe (Tabelle 9).

Tabelle 9: Körpermasse [%] von C57BL/6N Wildtyp-Mäusen im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder *S.pneumoniae*

Zeit [h] nach PBS Scheininfektion	Körpermasse [%]		
	Kontrolle (n)	HEPE präventiv (n)	HEPE therapeutisch (n)
0	100 ± 0 (8)	100 ± 0 (8)	100 ± 0 (8)
24	96,5 ± 2,2 (8)	96,5 ± 1,8 (8)	96,0 ± 3,8 (8)
48	95,4 ± 1,5 (8)	95,7 ± 2,2 (8)	96,6 ± 1,6 (8)
Zeit [h] nach Infektion			
0	100 ± 0 (8)	100 ± 0 (8)	100 ± 0 (8)
24	90,2 ± 1,1*** (8)	90,3 ± 2,7*** (8)	91,5 ± 1,3*** (8)
48	82,9 ± 3,2*** (8)	82,5 ± 2,6*** (8)	83,5 ± 3,1*** (7)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD, Gruppengröße (n). ***p < 0,001 (Vergleich zu nicht-infizierten kontroll-behandelten Tieren)

Analog zur Körpermasse zeigten die mit PBS kontroll-infizierten Versuchstiere aller Behandlungsgruppen keine Veränderungen in der Körpertemperatur bis 48h nach Scheininfektion. Die infizierten Tiere wiesen dagegen einen Abfall der Körpertemperatur mit signifikanten Unterschieden im Vergleich zu den jeweiligen nicht-infizierten Vergleichsgruppen zum Zeitpunkt 48h auf. Die Behandlung mit 18R-HEPE zeigte weder bei präventivem noch bei therapeutischem Behandlungsstart eine Wirkung auf den Abfall der Körpertemperatur (Tabelle 10).

Zusammenfassend ist anhand der klinischen Parameter von einer erfolgreichen Infektion auszugehen. Eine präventive oder therapeutische Behandlung mit 18R-HEPE erbrachte jedoch keine Veränderungen hinsichtlich der klinischen Ausprägung der Erkrankung.

Tabelle 10: **Körpertemperatur [°C] von C57BL/6N Wildtyp-Mäusen im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder *S. pneumoniae***

Zeit [h] nach PBS	Körpermasse [°C]		
	Kontrolle (n)	HEPE präventiv (n)	HEPE therapeutisch (n)
0	37,2 ± 0,4 (8)	37,3 ± 0,6 (8)	37,4 ± 0,5 (8)
24	38,1 ± 0,4 (8)	37,8 ± 0,2 (8)	37,7 ± 0,4 (7)
48	37,3 ± 0,6 (8)	37,5 ± 0,8 (8)	37,6 ± 0,5 (8)
Zeit [h] nach Infektion			
0	37,2 ± 0,4 (8)	37,2 ± 0,7 (8)	37,3 ± 0,4 (8)
24	36,3 ± 0,7*** (8)	36,6 ± 0,4*** (8)	36,6 ± 0,9*** (8)
48	33,8 ± 1,4*** (8)	33,0 ± 1,5*** (8)	34,9 ± 1,6** (7)

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SD, Gruppengröße (n) **p < 0,01, ***p < 0,001 (Vergleich zu nicht-infizierten kontroll-behandelten Tieren)

3.4.2. Bestimmung der zellulären Entzündungsreaktion in der Lunge

Weiterführend wurde der Einfluss der 18R-HEPE-Applikation auf die lokale Inflammationsreaktion in den Atemwegen untersucht. Hierzu erfolgten die Präparation und Durchführung der BAL 48h nach Infektion. Anschließend wurde die BALF mit Hilfe des Durchflusszytometers hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialzellbildes als Zeichen der zellulären Immunantwort untersucht.

Die Analyse der BALF zeigte zwischen den mit 18R-HEPE- bzw. Kontrolllösung-behandelten, scheininfizierten Versuchsgruppen keine Unterschiede in der Zahl der Gesamtleukozyten, der neutrophilen Granulozyten, der Makrophagen und der Lymphozyten. Die Betrachtung der infizierten Gruppen ergab einen signifikanten Anstieg der Gesamtleukozytenzahl mit deutlicher Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, aber auch der Makrophagen und Lymphozyten in der Wildtypkontrollgruppe. Zwischen den Behandlungsgruppen der infizierten Versuchstiere zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (Abbildung 9).

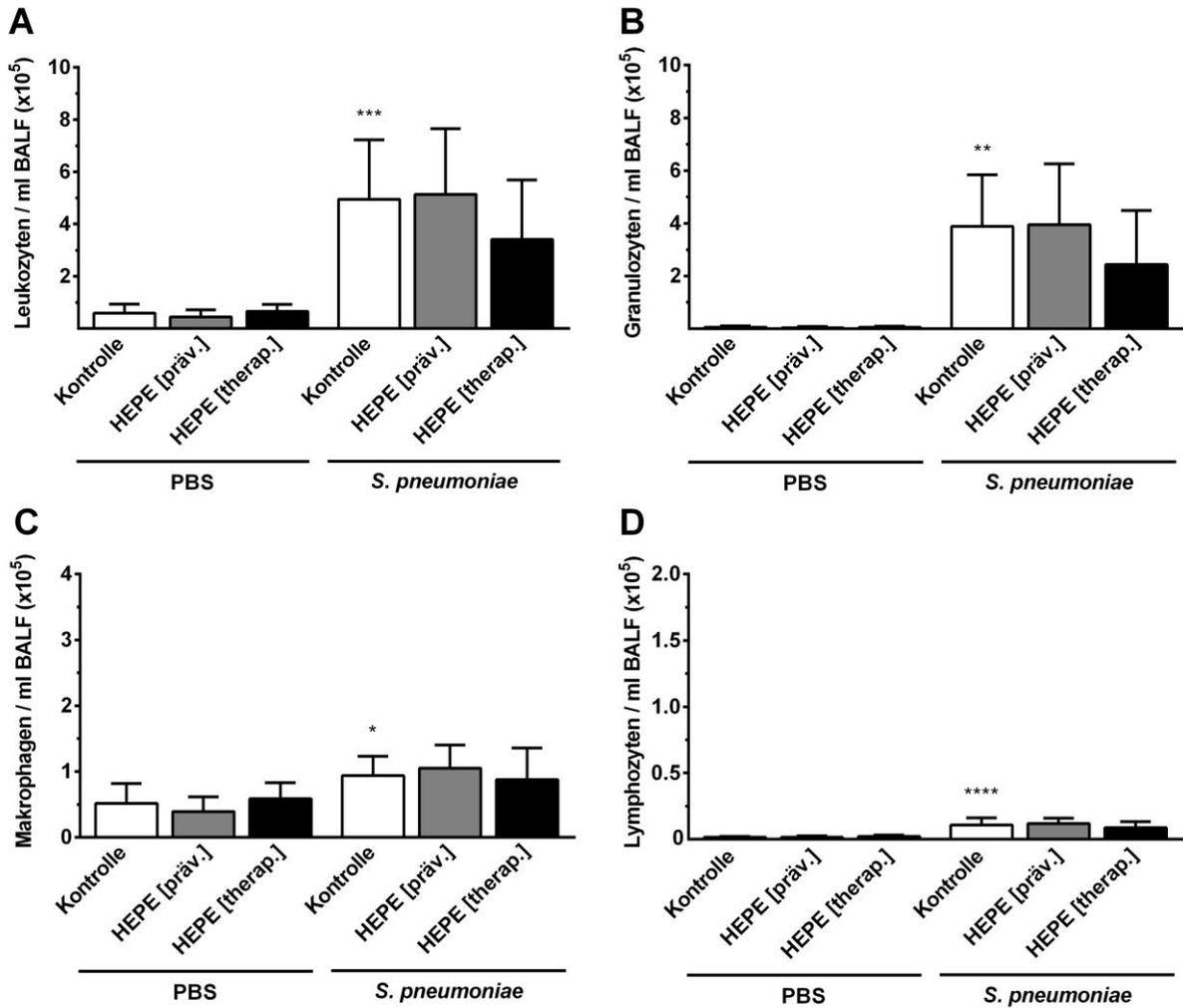


Abbildung 9: **Analyse der Gesamtleukozytenzahl und des Differentialzellbildes in der BAL-Flüssigkeit mittels Durchflusszytometrie.** Die Tiere wurden mit PBS (Kontrolle) oder *S. pneumoniae* (1×10^6) transnasal infiziert und subkutan mit $2 \mu\text{g}$ 18R-HEPE präventiv (Behandlungsstart 2h vor Infektion) oder therapeutisch (Behandlungsstart 12h nach Infektion) insgesamt 4x im Abstand von 12h behandelt. kontroll-behandelte Tiere wurden entsprechend mit $100 \mu\text{l}$ Kontrolllösung behandelt. Am Versuchsende 48h nach Infektion erfolgte die Präparation mit Durchführung der BAL und anschließend die Analyse der Gesamtleukozyten (A), neutrophilen Granulozyten (B), Makrophagen (C) und Lymphozyten (D) mittels Durchflusszytometer. Die Werte sind als Mittelwert + SD angegeben ($n = 7-8$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Vergleich zu nicht-infizierten kontroll-behandelten Tieren).

3.4.3 Analyse der Zytokine in der BAL-Flüssigkeit

Neben möglichen Auswirkungen der 18R-HEPE-Behandlung auf die unspezifische zelluläre Immunantwort wurde auch der Effekt auf die Freisetzung von

Entzündungsmediatoren in den bronchoalveolären Raum nach Infektion und Behandlung untersucht. Hierfür erfolgte die Analyse der Zytokinkonzentrationen in der BALF 48h nach Infektion mit Pneumokokken. Die Zytokine TNF- α , RANTES, IL-1 β , MCP-1, IL-10 und INF- γ wurden in der BALF quantifiziert.

Es zeigte sich in der BALF der infizierten kontroll-behandelten Versuchsgruppe ein Anstieg der untersuchten Zytokine mit signifikanten Unterschieden zur kontroll-behandelten und mit PBS scheininfizierten Kontrollgruppe für TNF- α , RANTES, IL-1 β und INF- γ . IL-10 und MCP-1 waren in der BALF der infizierten kontroll-behandelten Tiere im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle jedoch nicht signifikant erhöht. Eine präventive oder therapeutische Behandlung mit 18R-HEPE hatte auf die Freisetzung von TNF- α , RANTES, IL-1 β , MCP-1 und IL-10 keinen nachweisbaren Einfluss. INF- γ hingegen wurde in den 18R-HEPE-behandelten infizierten Tieren sowohl bei präventivem als auch therapeutischem Behandlungsstart signifikant weniger freigesetzt (Abbildung 10).

Insgesamt zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass die Infektion mit 1×10^6 KbE *S. pneumoniae* eine Rekrutierung von Leukozyten, vorrangig von neutrophilen Granulozyten, und eine Freisetzung zahlreicher Entzündungsmediatoren in die murinen Atemwege bewirkte. Die präventive und therapeutische 18R-HEPE-Behandlung war jedoch ausschließlich mit einer Reduktion der Freisetzung von IFN- γ in den bronchoalveolären Raum assoziiert, hatte dagegen keinen Einfluss auf die übrigen Analyseparameter.

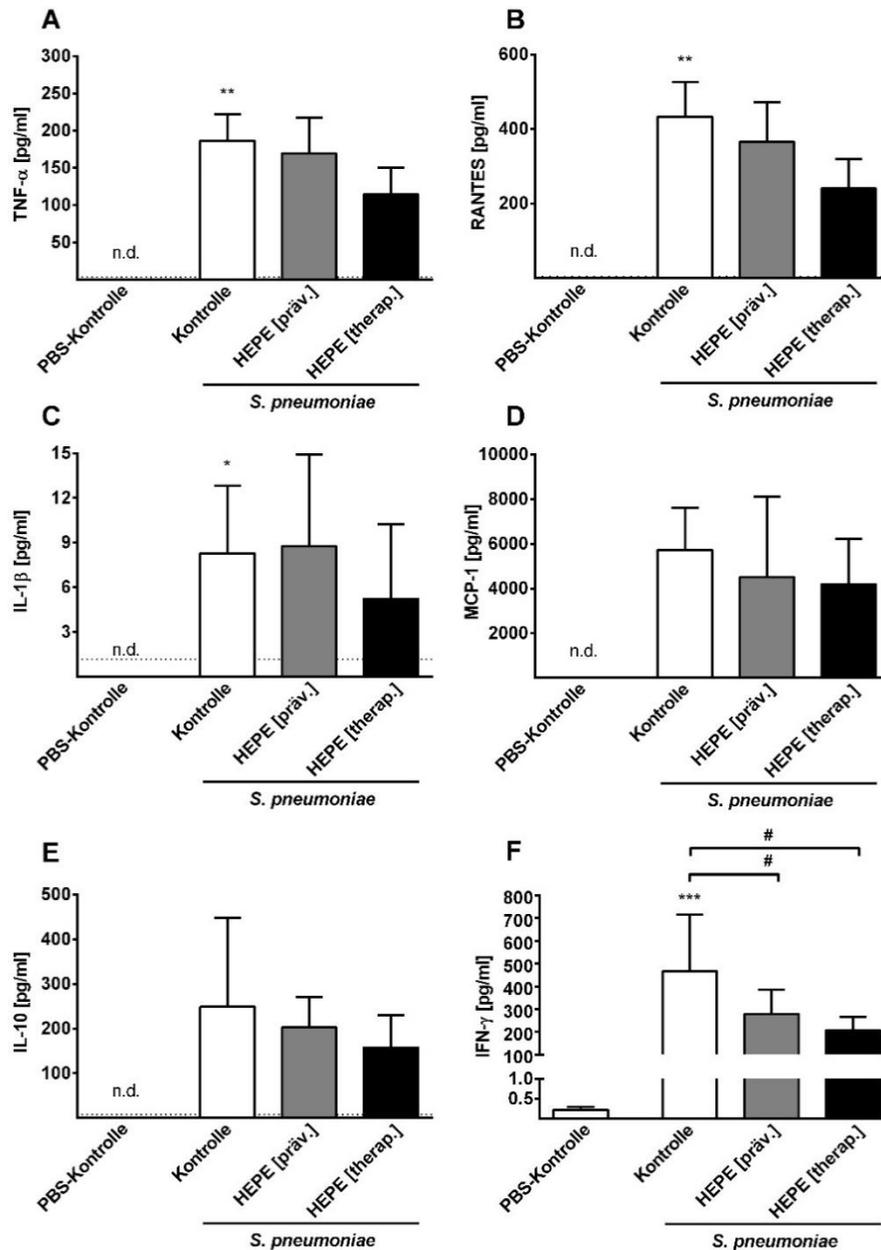


Abbildung 10: **Zytokinkonzentrationen in der BALF nach präventiver und therapeutischer Behandlung mit 18R-HEPE.** Die Tiere wurden mit PBS (Kontrolle) oder *S. pneumoniae* (1×10^6 KbE) transnasal infiziert und subkutan mit $2 \mu\text{g}$ 18R-HEPE präventiv (Behandlungsstart 2h vor Infektion) oder therapeutisch (Behandlungsstart 12h nach Infektion) insgesamt 4x im Abstand von 12h behandelt. kontroll-behandelte Tiere wurden entsprechend mit $100 \mu\text{l}$ Kontrolllösung behandelt. Am Versuchsende 48h nach Infektion erfolgte die Präparation mit Durchführung der BAL. In der BAL-Flüssigkeit wurden die Zytokine TNF- α , RANTES, IL-1 β , MCP-1, IL-10 und IFN- γ mittels Affymetrix ProcartaPlex[®] Cytokine Assay quantifiziert. Alle Werte sind als Mittelwert + Standardabweichung (SD) angeben ($n = 7-8$). Die untere Detektionsgrenze des ProcartaPlex[®] Cytokine Assays wird durch die Strichlinie angezeigt. n.d. (nicht detektierbare) Werte unterhalb der Detektionsgrenze. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ und * $p < 0,05$ (Vergleich zur nicht-infizierten, kontroll-behandelten Gruppe) bzw. # $p < 0,05$ (Vergleich zwischen den markierten Gruppen).

3.4.3 Bestimmung des Einflusses von 18R-HEPE auf die systemische Entzündungsreaktion

Nachfolgend wurde der Einfluss von 18R-HEPE auf die systemische Inflammationsreaktion in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. Dafür wurde das Blut mit Hilfe des Durchflusszytometers hinsichtlich der Gesamtleukozytenzahl und des Leukozytendifferentialzellbildes als Zeichen der systemischen zellulären Immunantwort untersucht. Dabei ergab die Behandlung der nicht-infizierten Tiere mit 18R-HEPE keine Veränderungen in der Gesamtleukozytenkonzentration, der Zahl der neutrophilen Granulozyten, der Monozyten sowie der Lymphozyten im Blut. Es konnten somit keine Hinweise auf eine 18R-HEPE-bedingte Alteration der Leukozytenverteilung im Blut gezeigt werden. Die Infektion induzierte dagegen eine signifikante Leukozytopenie in der Kontroll-behandelten Gruppe im Vergleich zur scheininfizierten Kontrollgruppe, assoziiert mit einer signifikanten Reduktion der Lymphozytenzahl im Blut. Weder eine präventive noch eine therapeutische Behandlung mit 18R-HEPE ergab Veränderungen in den Konzentrationen der Gesamtleukozyten oder der analysierten Leukozytensubpopulationen im Blut im Vergleich zur kontroll-behandelten, infizierten Gruppe (Abbildung 11).

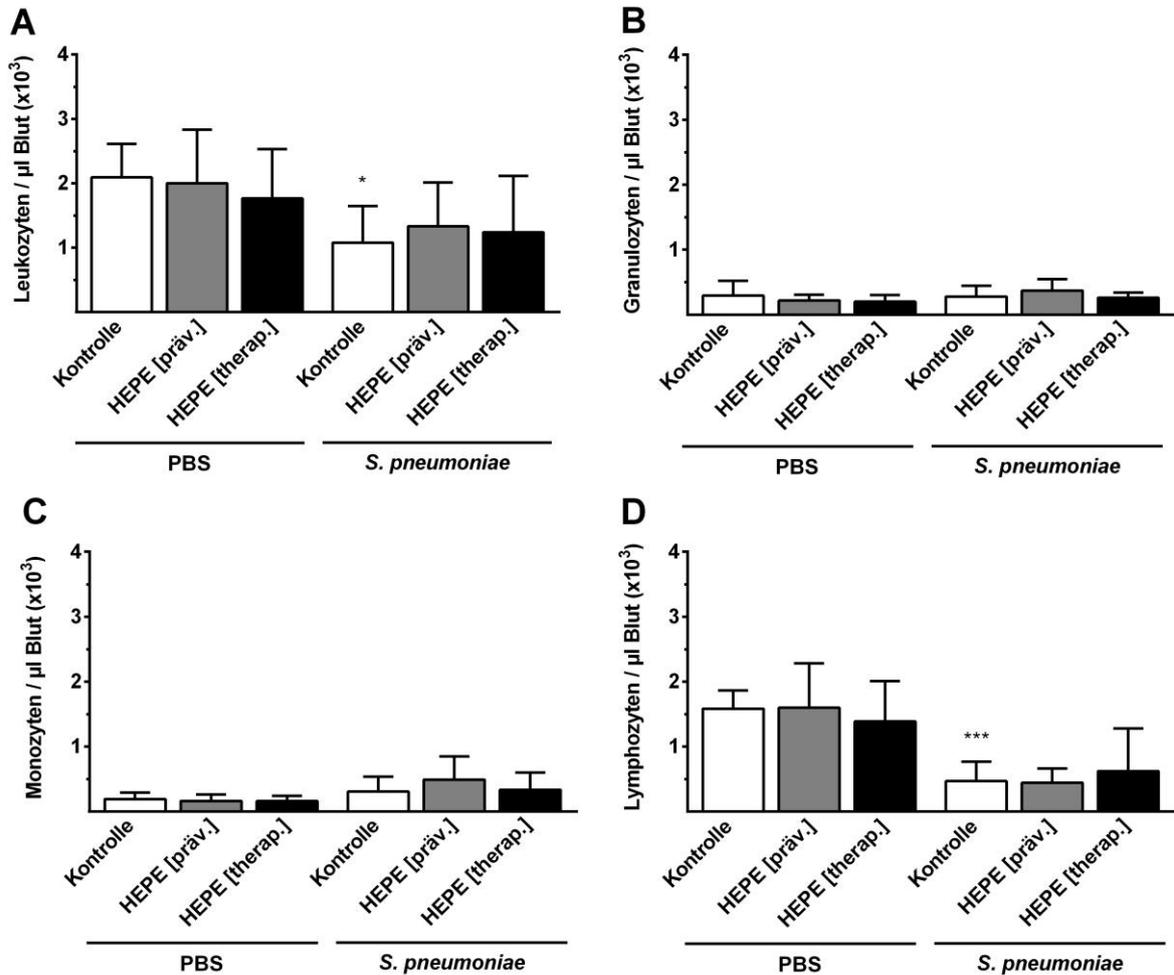


Abbildung 11: **Analyse der zellulären Immunantwort im Blut mittels Durchflusszytometrie.** Die Tiere wurden mit PBS (Kontrolle) oder *S. pneumoniae* (1×10^6) transnasal infiziert und subkutan mit $2 \mu\text{g}$ 18R-HEPE präventiv (Behandlungsstart 2h vor Infektion) oder therapeutisch (Behandlungsstart 12h nach Infektion) insgesamt 4x im Abstand von 12h behandelt. kontroll-behandelte Tiere wurden entsprechend mit $100 \mu\text{l}$ Kontrolllösung behandelt. Am Versuchsende 48h nach Infektion erfolgte die Blutentnahme im Rahmen der finalen Präparation. Anschließend erfolgte die Analyse der Gesamtleukozyten (A), neutrophilen Granulozyten (B), Monozyten (C) und Lymphozyten (D) mittels Durchflusszytometer. Die Werte sind als Mittelwert + SD angegeben ($n = 7-8$). * $p < 0,05$ und *** $p < 0,001$ (Vergleich zur nicht-infizierten kontroll-behandelten Gruppe).

3.5 Einfluss von 18R-HEPE auf die Phagozytose der Pneumokokken *in vitro*

Um den Einfluss von 18R-HEPE auf die Phagozytose von Bakterien *in vitro* zu bestimmen, wurden aus C57BL/6N-Wildtypmäusen Monozyten aus dem Knochenmark isoliert, *in vitro* kultiviert und mit M-CSF zu Makrophagen differenziert.

Diese Makrophagen wurden dann mit 18R-HEPE stimuliert und im Phagozytose-Assay verwendet. Als Grundlage der These, dass 18R-HEPE einen positiven Einfluss auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen ausübt, wurde eine aktuelle Arbeit von El Kebir, *et al.* herangezogen, die nachweisen konnte, dass 18R-HEPE durch das Enzym 5-Lipoxygenase neutrophiler Granulozyten in RvE1 umgewandelt wird, welches wiederum die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten stimuliert.⁶⁵ Ein ähnlicher Effekt ist für Makrophagen bisher noch nicht beschrieben und wurde nun in der vorliegenden Arbeit untersucht. Als Bakterienstamm wurde *S. pneumoniae* R6X verwendet, weil dieser Bakterienstamm im Vergleich zum *in vivo* verwendeten PN36 in Zellkultur weniger pathogen wirkt und die Phagozytose aufgrund der fehlenden Polysaccharidkapsel erleichtert wird.

Nach Differenzierung der Monozyten wurden diese mit 0,1µmol/l, 1µmol/l oder 10µmol/l 18R-HEPE für 6h stimuliert und anschließend mit *S. pneumoniae* inkubiert. Hiernach erfolgte die Quantifizierung der durch die Makrophagen phagozytierten Bakterienzahl, aufgeführt als koloniebildende Einheiten (KbE). An der naiven Kontrolle war erkennbar, dass eine Phagozytose von *S. pneumoniae* durch die Makrophagen stattgefunden hat. Die Stimulation mit 18R-HEPE für 6h erhöhte die Phagozytoseaktivität der Makrophagen insbesondere unter Verwendung einer 18R-HEPE-Konzentration von 10µmol/l im Vergleich zu kontroll-stimulierten Zellen (Abbildung 12).

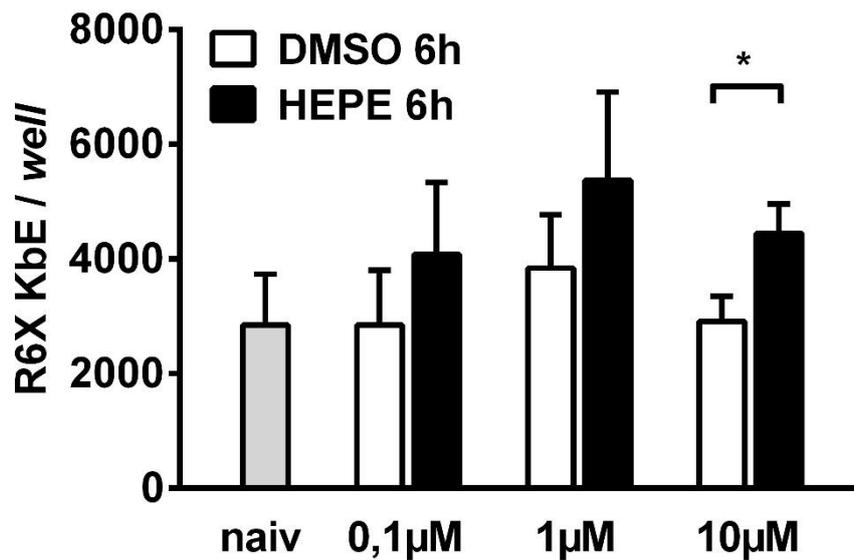


Abbildung 12: **Quantitative Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen nach Stimulation mit 18R-HEPE *in vitro*.** Differenzierte Knochenmarksmonozyten wurden für 6h mit 0,1µM, 1µM oder 10µM 18R-HEPE oder DMSO (Lösungsmittelkontrolle) stimuliert und anschließend 1h mit 1×10^4 KbE *S. pneumoniae* inkubiert. Danach erfolgte die antimikrobielle Elimination der extrazellulären Bakterien und Lyse der Makrophagen. Die intrazellulär vorhandenen Bakterien wurden dann mittels Ausstreichens auf Blutagarplatten bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert + SD angegeben (n=3). *p < 0,05 (Vergleich zwischen den beiden markierten Gruppen)

3.6. Einfluss einer therapeutischen oder präventiven 18R-HEPE-Behandlung auf die Bakterienelimination in der murinen Pneumokokkenpneumonie *in vivo*

Um zu prüfen, ob die 18R-HEPE-Behandlung auch *in vivo* in der klinisch relevanten Infektion mit *S. pneumoniae* einen Effekt auf die Erregerelimination hat, wurden BALF und Blut der mit 18R-HEPE und scheinbehandelten Tiere auf ihre Bakterienlast untersucht.

In Abbildung 13 sind die koloniebildenden Einheiten (KbE) in BALF (A) und im Blut (B) dargestellt. Alle Behandlungsgruppen wiesen 48h nach Infektion vergleichbare Bakterienkonzentrationen in BALF und Blut auf. Alle infizierten Versuchstiere entwickelten demnach eine Bakteriämie vergleichbaren Ausmaßes. Die therapeutische oder präventive 18R-HEPE-Behandlung erbrachte keine Reduktion der Erregerlast, weder lokal in den Atemwegen noch systemisch im Blut (Abbildung 13).

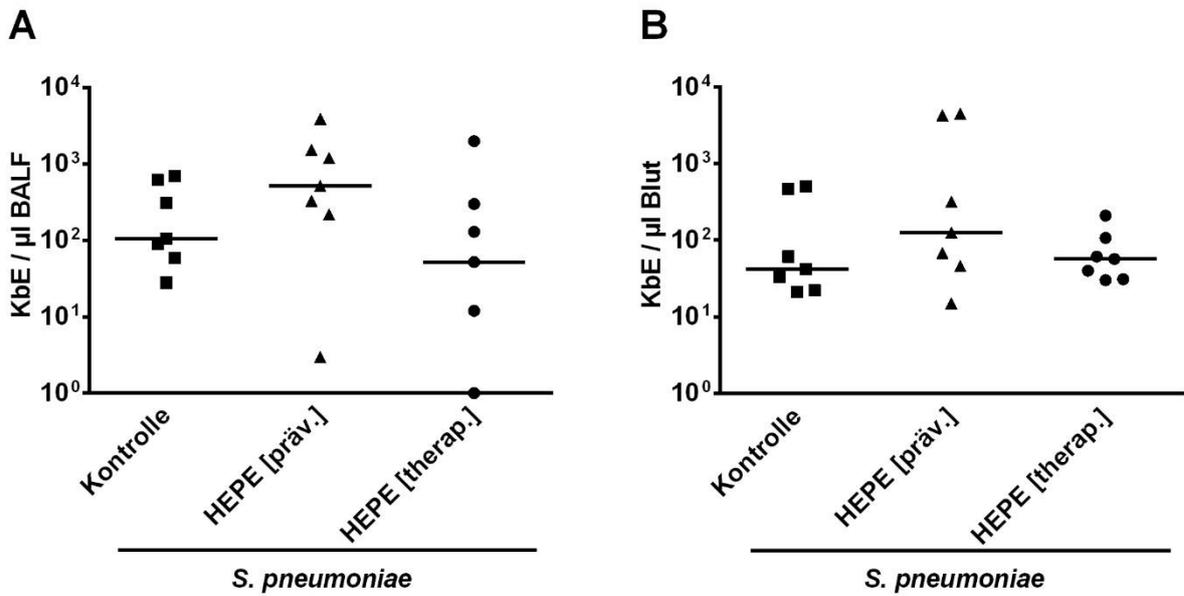


Abbildung 13: **Bakterienlast der BALF und des Blutes.** Die Tiere wurden mit *S. pneumoniae* (1×10^6 KbE) transnasal infiziert und subkutan mit 2 μ g 18R-HEPE präventiv (Behandlungsstart 2h vor Infektion) oder therapeutisch (Behandlungsstart 12h nach Infektion) insgesamt 4x im Abstand von 12h behandelt. kontroll-behandelte Tiere wurden entsprechend mit 100 μ l Kontrolllösung behandelt. Am Versuchsende 48h nach Infektion erfolgte die Präparation mit Durchführung der BAL und Blutentnahme. Anschließend wurde die Bakterienlast in BALF und Blut quantifiziert. Darstellung als *scatter dot plot* mit Median (n=7-8).

4.0 Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Rolle der 18R-HEPE/RvE1-Signalkaskade in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht. RvE1 ist ein Eicosanoid, welches in mehreren Reaktionsschritten aus der ω -3-Fettsäure Eicosapentaensäure und 18R-HEPE als Zwischenprodukt gebildet wird.³⁵ Es interagiert mit den Rezeptoren BLT1 und ChemR23, was im Rahmen einer Entzündungsreaktion unter anderem zu einer verminderten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Modulation der Zytokinfreisetzung und einem Einstrom von Makrophagen in das Inflammationsareal führt.^{33,62,75}

Es wurde die Lokalisation der RvE1-Rezeptoren BLT1 und ChemR23 in der murinen Lunge mittels Immunhistochemie dargestellt und deren pulmonale Expressionsregulation im Rahmen der murinen Pneumonie nachgewiesen. BLT1 und ChemR23 werden in der Pneumonie unterschiedlich reguliert. So wird BLT1 in der Akutphase verstärkt gebildet, während ChemR23 in der Resolutionsphase hochreguliert wird. BLT1^{-/-}, ChemR23^{-/-} und fat-1^{+/+}-Versuchstiere zeigten in der Pneumokokkenpneumonie keinen Unterschied in Gewicht und Temperatur oder Veränderungen der Leukozytenverteilungen in BAL und Blut im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Darüber hinaus hatte eine präventive oder therapeutische exogene Zufuhr von 18R-HEPE nach Infektion mit *S. pneumoniae* keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion, Vitalparameter und Bakterienlast in Blut und Lunge in Wildtypmäusen. Die Zytokinproduktion in der Pneumonie wurde bis auf IFN- γ ebenfalls nicht beeinflusst. Dagegen ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Phagozytoserate von Makrophagen nach Stimulation mit 18R-HEPE *in vitro*.

4.1 Die Rezeptorexpression von BLT1 und ChemR23 in der murinen Lunge ist abhängig von der Phase der Inflammationsreaktion

Die Zielrezeptoren von RvE1 spielen in der Regulation der angeborenen Immunantwort eine besondere Rolle.⁵⁹ Daher ist die pulmonale Expression von BLT1 und ChemR23 sowie deren Regulation im Verlauf der Pneumonie von besonderer Bedeutung. Huang, *et al.* konnten bereits 1998 mittels Northern Blot BLT1-mRNA und mittels Western Blot BLT1-Protein in verschiedenen murinen Geweben, inklusive der

Lunge, sowie in Leukozyten, vor allem in neutrophilen Granulozyten und in geringerer Ausprägung in Makrophagen, nachweisen.⁷⁶ In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass BLT1 in der naiven Lunge insgesamt geringgradig und dabei vor allem von Bronchialepithelzellen exprimiert wird. Eine Expression des Rezeptors auf Alveolarmakrophagen konnte nur vereinzelt nachgewiesen werden.

ChemR23 wird im Körper ubiquitär exprimiert. Der Rezeptor konnte mittels PCR unter anderem in Lunge, Milz, dendritischen Zellen, aus dem Blut isolierten M1-Makrophagen, humanen Endothelzellen und humanen oralen Epithelzellen nachgewiesen werden.^{73,77,78,79,80} Darüber hinaus zeigte sich ChemR23 in histochemischen Anfärbungen vereinzelt in der *Lamina propria* des murinen Ileums sowie mittels Immunfluoreszenz auf aus der Milz isolierten natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen.⁸¹ Eine histochemische Darstellung der ChemR23-Lokalisation in der Lunge lag bislang noch nicht vor. In der aktuellen Untersuchung der Mauslungen zeigte sich nun eine deutliche Expression des ChemR23 von Bronchialepithelzellen, weniger auf Makrophagen und nur vereinzelt auf Endothelzellen. Das Expressionsmuster auf Makrophagen ist vergleichbar mit der Arbeit von Luangsay, *et al.*, in der im Gegensatz zu einer starken Expression von ChemR23 in dendritischen Zellen eine geringe Expression in Knochenmarksmakrophagen nachgewiesen werden konnte.⁷³

Mittels qPCR zeigte sich im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie eine Expressionsveränderung von ChemR23 und BLT1 in der murinen Lunge. So ist BLT1 in der akuten Phase der Entzündung vermehrt nachweisbar und fällt im Verlauf der Resolution wieder ab. Dagegen reduziert ein Pathogenkontakt zunächst die Expression von ChemR23, diese wird jedoch unter Antibiotikatherapie im Verlauf der Resolution hochreguliert. Eine *in vitro* Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), CD40L oder Infektion mit Influenzavirus führte ebenfalls zu einer Herabregulation von ChemR23 in dendritischen Zellen.⁸²⁻⁸⁴ Ein ähnliches Ergebnis konnte in murinen Peritonealmakrophagen nach Inkubation mit LPS, TNF- α und anderen TLR-Liganden sowie proinflammatorischen Zytokinen erzielt werden.⁸⁵ Interessanterweise vermittelte eine Inkubation mit dem vornehmlich antiinflammatorisch wirkendem TGF- β eine Hochregulation von ChemR23.⁸⁵ Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ChemR23 sowohl im Lungengewebe als auch auf Makrophagen und dendritischen Zellen nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, also in der akuten Phase einer

Entzündung oder Infektion, zunächst vermindert exprimiert wird, bevor die Expression im Verlauf der Resolution ansteigt. Eine vermehrte Expression von ChemR23 in der Resolutionsphase ist essentiell, da hierüber Makrophagen zur Efferozytose und Phagozytose stimuliert werden.⁷⁷ Die signifikant reduzierte ChemR23-Expression nach 48h der nicht-behandelten infizierten Gruppe im Vergleich zur behandelten infizierten Gruppe ist mutmaßlich als Ausdruck einer progredienten Infektion aufgrund der fehlenden antiinfektiösen Therapie zu werten. Da zur Analyse der Rezeptorexpression Lungenhomogenate verwendet wurden, lässt sich in den aktuellen Untersuchungen nicht differenzieren, ob es sich bei der Hochregulation der Expression in der späten Phase der Entzündung vornehmlich um eine Zellrekrutierung in das Inflamationsareal, zum Beispiel von Makrophagen, handelt oder um eine veränderte Rezeptorregulation auf der Zelloberfläche. Die Herabregulation, die in der frühen Phase der Inflammation beobachtet wurde, basiert wahrscheinlich auf einer verminderten Expression von ChemR23 auf Epithelzellen, da zum einen die vorliegenden immunhistochemischen Anfärbungen gezeigt haben, dass ChemR23 vor allem auf Bronchiepithel exprimiert wird und zum anderen durch Serhan, *et al.* eine verminderte Expression von ChemR23 auf humanen Epithelzellen nach TNF- α -Stimulation detektiert werden konnte.⁸⁰

Im Gegensatz zu ChemR23 wird BLT1 in der Akutphase der Inflammation hochreguliert und fällt im Verlauf ab, bevor 120h nach Infektion in der behandelten Gruppe das Ausgangsniveau erreicht wird. Auch in der Untersuchung des Expressionsverhalten des BLT1-Rezeptors wurden Lungenhomogenate verwendet, was wiederum eine Beurteilung, ob der vermehrte Nachweis sich in einer Hochregulation auf der Zelloberfläche oder durch eine Leukozyteninfiltration begründet, erschwert. Wie bereits oben beschrieben, wurde BLT1 histochemisch insgesamt nur geringgradig in der Lunge und vereinzelt auf Alveolarmakrophagen nachgewiesen. *In vivo* Studien zur Expressionsregulation von BLT1 in Infektionsmodellen liegen nicht vor. Ein Großteil der Studien befasst sich mit steriler Inflammation wie dem Asthma bronchiale.⁸⁶ So zeigen Daten eines Modells der allergischen Entzündung eine mittels Northern Blot nachgewiesene vermehrte Expression von BLT1 nach Inhalation von *Aspergillus fumigatus* Antigen.⁸⁷ Ein deutlicher Expressionsanstieg von BLT1 konnte außerdem nach Casein-Aktivierung peritonealer Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden.⁷⁶ Dass die Stimulation von BLT1 in der Akutphase von Bedeutung ist, wurde bereits in

mehreren Arbeiten belegt, da unter anderem hierüber die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten sowie die Phagozytose und Elimination von Pathogenen gefördert wird.^{88,89} Deshalb ist der vorliegende BLT1 Anstieg in der akuten Phase der Entzündung nach Pneumokokkeninfektion sehr wahrscheinlich multifaktoriell sowohl durch einen erhöhten Influx von neutrophilen Granulozyten in das Entzündungsareal als auch durch einen Expressionsanstieg nach Aktivierung der residenten Alveolarmakrophagen bedingt.

4.2 Eine Defizienz des ChemR23- oder BLT1-Rezeptors sowie ein endogen erhöhter ω -3-PUFA-Spiegel zeigten keine Auswirkung auf den Verlauf einer milden Pneumokokkeninfektion

Es liegen mehrere Studien zu ChemR23^{-/-}-Mäusen in Inflammations- und Infektionsmodellen vor. So zeigten Bondue, *et al.*, dass ChemR23^{-/-}-Mäuse eine deutlich höhere Mortalität und Morbidität in der viralen Pneumonie aufweisen.⁹⁰ Darüber hinaus ging die ChemR23-Defizienz mit einer erhöhten pulmonalen Infiltration von neutrophilen Granulozyten nach LPS-Stimulation, bedingt durch eine verminderte Aktivierung der Makrophagen zur Phagozytose des Zelldetritus und der apoptotischen Granulozyten, einher.⁷³ Dies konnte in dem vorliegenden Experiment nicht nachvollzogen werden. Die infizierten ChemR23^{-/-}-Versuchstiere unterschieden sich weder in den klinischen Parametern noch in den Leukozytenverteilungen in Blut und BALF von der Kontrollgruppe. Ebenso wiesen sie keine erhöhte Pneumonierate bei der verwendeten LD30 auf. Schlussfolgernd hatte ein Fehlen des ChemR23-Rezeptors in der milden Pneumonie keinen Einfluss auf die Suszeptibilität gegenüber Infektionen oder die Entzündungsreaktion.

Als Rezeptor von Leukotrien B4 spielt BLT1 eine wichtige Rolle in der Erregerelimination. Der LTB4-BLT1 Signalweg fungiert als sehr potenter Aktivator von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.^{91,92} Zudem wird bei Blockade des BLT1-Rezeptors die Erregerelimination von Gram-positiven und -negativen Bakterien, Pilzen sowie Parasiten deutlich vermindert.⁹³⁻⁹⁶ In der sterilen Entzündung konnte außerdem in BLT1-defizienten Tieren eine geringere Rekrutierung von Makrophagen und eosinophilen Granulozyten in der nicht-infektiösen Zymosan- und Thioglykolat induzierten Peritonitis festgestellt werden.^{97,98} Tiere ohne Expression des BLT1-

Rezeptors zeigten eine verminderte Rekrutierung von dendritischen Zellen im Asthramodell sowie einen erniedrigten Spiegel an Zytokinen und Chemokinen in der nichtinfektiösen Arthritis.^{99,100} Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es bei Fehlen von BLT1 in der akuten Phase der Inflammation durch eine verminderte Rekrutierung von Leukozyten sowie eine verminderte Produktion von Zytokinen zu einer Immunsuppression mit abgeschwächter Erregerabwehr kommen kann. BLT1 ist außerdem zur Terminierung der akuten Inflammation und Einleitung der Resolution essentiell, da über Hemmung dieses Rezeptors durch RvE1 die Apoptose der neutrophilen Granulozyten eingeleitet wird, was bei BLT1-Defizienz in einer prolongierten Inflammationsreaktion resultieren kann.⁶⁵ In unserer Versuchsreihe zeigten die BLT1^{-/-}-Tiere keine erhöhte Pneumonierate bei einer LD30. Es wurde darüber hinaus kein signifikanter Unterschied in der Leukozytenverteilung von BALF und Blut gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt. Demnach scheint eine Defizienz von BLT1 in der milden Pneumokokkenpneumonie keinen Einfluss auf die Entzündungsreaktion zu haben. Dies wiederum spricht dafür, dass sowohl der fehlende proinflammatorische als auch der inhibierende BLT1-Signalweg durch andere Mechanismen kompensiert werden kann.

Fat-1^{+/+}-Versuchstiere, die durch Expression des *C. elegans* fat-1 Gens zu einer endogenen Konversion von ω -6- in ω -3-PUFA imstande sind, zeigten nach pulmonaler Endotoxininstillation einen reduzierten Lungenschaden mit einer verminderten Leukozyteninfiltration.⁵² Zudem zeigte sich in derselben Arbeit von Mayer, *et al.* bereits vor LPS-Instillation eine signifikant verringerte Leukozytenanzahl in der BAL-Flüssigkeit der fat-1^{+/+}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. In der vorliegenden Studie konnte dagegen kein Unterschied der Leukozytenverteilung in der BALF der infizierten und nicht-infizierten fat-1^{+/+}-Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen detektiert werden. Eine mögliche Ursache für die Diskrepanz der Ergebnisse ist, dass die Tiere in der Arbeit von Mayer, *et al.* im Gegensatz zur aktuellen Studie mit einem erhöhten ω -6- zu ω -3-PUFA-Verhältnis von 7,3:1 ernährt wurden.⁵² Hierdurch wiesen die fat-1^{+/+}-Tiere im Vergleich zu den in dieser Studie verwendeten Tieren durch die Möglichkeit der endogenen Konversion höhere ω -3-PUFA-Spiegel und letztendlich wahrscheinlich auch gesteigerte 18R-HEPE- und RvE1-Spiegel im Blut auf.⁵² Borén, *et al.* konnten ebenfalls durch eine ω -3-PUFA-reiche Ernährung von Wildtypmäusen einen Überlebensvorteil in einer *S. aureus*-Sepsis verglichen mit einer Diät erhöhter ω -6-PUFA und gesättigten Fettsäuren erreichen.¹⁰¹ Daraus folgt, dass durch eine

entsprechende Ernährung der fat-1^{+/+}-Mäuse in unserer Untersuchung möglicherweise ein Effekt induziert werden könnte.

Zusammenfassend deuten die aktuellen Ergebnisse daraufhin, dass der ChemR23- oder BLT1-Signalweg allein keine zentrale Rolle in der Pneumokokkenpneumonie einnehmen. Allerdings zeigen die erhobenen Daten, dass die verwendete Infektionsdosis von LD30 bei nicht allen Versuchstieren eine klinisch apparente Pneumonie induzierte. Aus diesem Grund ist es aktuell nicht möglich, eine endgültige Aussage über mögliche Effekte einer Defizienz der ChemR23- und BLT1-Rezeptoren sowie einem Überangebot von ω -3-Fettsäuren in der Pneumokokkenpneumonie zu treffen. Diesbezüglich sind weiterführende Untersuchungen unter Verwendung einer Infektionsdosis, die sicher eine Pneumonie induziert, notwendig.

4.3 Eine exogene Zufuhr von 18R-HEPE hatte keinen Einfluss auf die murine Pneumokokkenpneumonie

Eine positive Auswirkung eines erhöhten ω -3-Fettsäure-Spiegels der fat-1^{+/+}-Mäuse im Rahmen einer durch LPS induzierten Inflammation ist nachgewiesen.⁵² Zudem zeigen verschiedene Studien, dass durch eine entsprechende ω -3-PUFA-reiche Ernährung eine systemische Infektion in Menschen und Mäusen positiv beeinflusst werden kann.^{57,101} Fat-1-transgene Mäuse zeigten dagegen im vorliegenden Versuchsvorhaben, trotz des erhöhten ω -3-PUFA-Spiegels infolge des inserierten fat-1 Gens, keinen Vor- oder Nachteil verglichen mit der Kontrollgruppe im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich eine exogene Zufuhr von 18R-HEPE und damit eine gezielte und zeitlich determinierte Erhöhung des RvE1-Levels am Ort der Entzündung vorteilhaft auf den Verlauf der Pneumonie auswirkt. Da 18R-HEPE seine Wirkung lokal entfaltet, indem es erst am Entzündungsort im Rahmen einer Gefäßendothel-Leukozyten-Interaktion durch leukozytäre 5-Lipoxygenase in RvE1 umgewandelt wird, könnten sich so neue Behandlungsstrategien zur gezielten Beschleunigung der Resolutionsreaktion ergeben.^{60,102} Die Applikationszeitpunkte vor und nach Infektion wurden gewählt, um zu evaluieren, in welcher Phase der Infektion eine Therapie am sinnvollsten ist. So wäre es denkbar, dass eine überschießende

Inflamationsreaktion mit konsekutivem akuten Lungenschaden durch eine präventive Applikation reduziert oder vollständig verhindert wird. Andererseits kann durch eine vorzeitige kompetitive Hemmung des BLT1-Rezeptors durch RvE1 der Influx von neutrophilen Granulozyten und Aktivierung von Makrophagen beeinträchtigt werden, was mit einer reduzierten Erregerabwehr einher gehen könnte. Ein Therapiestart nach Infektion ermöglicht dagegen, dass die Akutphase der Entzündung zunächst ungestört ablaufen kann, die nachfolgende Einleitung sowie der Verlauf der anschließenden Resolutionsphase jedoch verbessert und so die Wiederherstellung der Homöostase unterstützt werden.

In dieser Versuchsreihe wurde im Gegensatz zu den Versuchen mit den gendefizienten Tieren eine LD100 verwendet, um bei allen Versuchstieren eine klinisch apparente Pneumonie und deutlich nachweisbare Inflammation zu induzieren. Ein Vergleich der Vitalparameter zeigte dabei, dass die Infektion mit der LD100 zu einer Abnahme der mittleren Körpertemperatur und der Körpermasse als Ausdruck einer klinisch ausgeprägten Pneumonie führte, wie es für das etablierte Modell beschrieben ist.⁷¹ Publierte Daten zeigen eine schnellere Normalisierung der Körpertemperatur im murinen Modell des LPS-induzierten Lungenschadens bei erhöhtem ω -3-PUFA-Spiegeln in *fat-1^{+/+}*-Tieren.⁵² Ebenso konnte eine Applikation von Resolvin D1 (RvD1), einem SPM aus Docosahexaensäure, den Gewichtsverlust in infizierten Tieren im Rahmen einer Pneumonie induziert durch *P. aeruginosa* verringern.¹⁰³ Die Behandlung mit 18R-HEPE zeigte dagegen in der aktuellen Untersuchung weder im präventiven noch im therapeutischen Therapieansatz einen Effekt auf die Vitalparameter in der murinen Pneumokokkenpneumonie.

Die signifikant erhöhten Granulozyten und Makrophagen in der BALF der infizierten Tiere entsprachen dem Bild einer bakteriellen Bronchopneumonie.⁶⁹ Zwischen den infizierten, therapierten und nicht therapierten Versuchsgruppen fand sich kein Unterschied in der Zahl der rekrutierten Leukozyten, weder in den Subpopulationen der neutrophilen Granulozyten, der Makrophagen oder Lymphozyten. Ebenso hatte eine 18R-HEPE-Behandlung keinen Einfluss auf die Verteilung der Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in der BALF der nicht-infizierten Tiere. Versuche im murinen Modell der Aspirationspneumonie zeigen dagegen eine verminderte Leukozyteninfiltration nach systemischer Therapie mit RvE1.¹⁰⁴ Zudem hatte die therapeutische Applikation von RvD1, einem weiteren Vertreter der Resolvin-Familie,

eine verminderte Leukozyteninfiltration und einen reduzierten Lungenschaden in der *P. aeruginosa*-Pneumonie zur Folge.¹⁰³ Neben der zellulären Immunantwort wurde der Einfluss auf die lokale angeborene humorale Immunantwort untersucht. Zytokine sind von essentieller Bedeutung für die physiologische Erregerabwehr. So führt die Ausschüttung unter anderem zu einer Rekrutierung und Aktivierung der unspezifischen Immunabwehr.¹⁰⁵ Ishida, *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass eine Behandlung mit RvE1 zu einer signifikanten Reduktion der Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 in der DSS (Dextran Natriumsulfat)-induzierten Colitis führte.¹⁰⁶ Auch im Rahmen einer experimentellen Aspirationspneumonie durch *E. coli* schützte eine präventive intravenöse Applikation von RvE1 vor einem akuten Lungenschaden. Die Zytokinlevel von IL-1 β , IL-6, HMGB-1, MIP-1 α , MIP-1 β , KC und MCP-1 waren dabei signifikant reduziert.¹⁰⁴ Ferner konnte gezeigt werden, dass RvD1 in der bakteriellen Pneumonie unter anderem die Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , IL-17 und VEGF verringert.¹⁰⁷ Im vorliegenden Experiment hatten dagegen weder die präventive noch die therapeutische 18R-HEPE-Substitution einen Einfluss auf die TNF- α -, RANTES-, IL-1 β -, MCP-1- und IL-10-Produktion in der murinen Pneumokokkenpneumonie. Einzig INF- γ wurde in den beiden 18R-HEPE-behandelten infizierten Versuchsgruppen weniger in der Lunge freigesetzt als in der scheinbehandelten infizierten Kontrollgruppe.

INF- γ wird physiologisch im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie gebildet.¹⁰⁸ Die Produktion erfolgt vor allem durch CD4- und CD8-positive T-Zellen, aber auch durch NK-Zellen, Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, DC und B-Zellen sowie in der frühen Phase einer Pneumonie durch neutrophile Granulozyten.^{109,108,110} INF- γ weist im Rahmen einer Entzündung duale Eigenschaften auf. Zum einen nimmt es eine wichtige Rolle in der Erregerabwehr ein, da zum Beispiel INF- γ -defiziente Mäuse eine deutlich verminderte pulmonale bakterielle *Clearance* aufweisen.¹⁰⁸ Zum anderen werden INF- γ auch antiinflammatorische und resolutionsfördernde Eigenschaften zugeschrieben.^{111,112} Die geringere INF- γ -Produktion in unserem Modell nach 18R-HEPE-Behandlung könnte mit dem Untersuchungszeitpunkt zusammenhängen. So wurde ähnlich wie in unserem Versuch und ebenfalls in einem Infektionsmodell der Maus 24h nach peritonealer Instillation von *Listeria monocytogenes*, einem intrazellulärem Erreger, ein erniedrigter Serumspiegel von INF- γ und IL-12, einem Induktor der INF- γ -Produktion, durch eine ω -3-PUFA-reiche Diät erzielt.¹¹³ Dagegen zeigte sich im Rahmen der allergischen Inflammation der Atemwege eine durch RvE1-

induzierte Erhöhung von INF- γ in der BALF durch Produktion von CD4⁺ T-Zellen in der Resolutionsphase.⁷⁵ Yamada, *et al.* wiesen in ihrer Arbeit zur Regulation von INF- γ in der Pneumokokkenpneumonie nach, dass auch neutrophile Granulozyten vor allem in der Akutphase der Infektion INF- γ produzierten.¹⁰⁸ Interessanterweise erfolgte dies aber nur nach Kontakt mit *S. pneumoniae* oder *S. aureus*, nicht nach Kontakt mit *E. coli* oder *P. aeruginosa*. Im murinen Modell des Asthma bronchiale stimulierte RvE1 CD4⁺ T-Zellen in der Resolutionsphase, 4d nach Allergenkontakt und nach 3d RvE1-Behandlung, zur INF- γ -Produktion. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass RvE1 modulatorisch auf die INF- γ -Produktion sowohl von Granulozyten als auch von T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wirkt. Da in unserem Versuch eine erniedrigte INF- γ -Produktion 48h nach Pathogenkontakt nachgewiesen wurde, lässt vermuten, dass das aus 18R-HEPE gebildete RvE1 hemmend auf die INF- γ der neutrophilen Granulozyten in der Akutphase der Inflammation wirkt. Es ist aktuell jedoch nicht auszuschließen, dass ein späterer Untersuchungszeitpunkt im Zeitraum der Resolutionsphase einen 18R-HEPE-vermittelten Anstieg der INF- γ -Produktion zeigt. Eine Aussage über die detaillierte Regulation von INF- γ im Verlauf der einzelnen Phasen der Pneumokokkeninfektion ist jedoch aktuell nicht möglich, daher sind zur genaueren Beurteilung der INF- γ -Regulation durch 18R-HEPE bzw. RvE1 im zeitlichen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie weitere *in vivo* Studien notwendig.

4.4 18R-HEPE stimuliert Makrophagen *in vitro* zur Phagozytose, hat jedoch keinen Effekt auf die pulmonale Erregerelimination *in vivo*

Die SPM sind unabdingbar für die Einleitung der Resolution und Wiederherstellung der Homöostase.²⁹ Hierfür ist es wichtig, dass neben der Terminierung der Inflammationsreaktion auch die Phagozytose zur Beseitigung der apoptotischen Zellen und des Detritus induziert wird.¹¹⁴ Ein Resolvin-E1-Zielrezeptor ist ChemR23. Publierte Daten zeigten bereits, dass es zu einer erhöhten Phagozytoseaktivität von Makrophagen durch Stimulation von RvE1 sowie n-3- und n-6-PUFA *in vitro* und *in vivo* kam.^{61,115,116} Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob neben RvE1 auch dessen Vorläuferfettsäure 18R-HEPE eine direkte resolutionsfördernde Wirkung aufweist. Daher wurde der Einfluss von 18R-HEPE auf die Phagozytoseaktivität von Makrophagen *in vitro* untersucht. Makrophagen, differenziert aus isolierten

Knochenmarkszellen, wurden mit 18R-HEPE stimuliert und anschließend mit Pneumokokken inkubiert. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Phagozytoserate nach 6h Stimulation mit 10mmol/l 18R-HEPE. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass Makrophagen auch durch 18R-HEPE zur Phagozytose stimuliert werden können. Alternativ wäre es denkbar, dass 18R-HEPE durch ein makrophageneigenes Enzym in RvE1 umgewandelt wird, wie es durch die Lipoxygenase-5 der neutrophilen Granulozyten oder Aspirin-aktivierte COX-2 der Endothelzellen beschrieben ist.^{26,117} Dass Makrophagen in Anwesenheit von DHA durch die Lipoxygenase 12/15 Maresine produzieren können, ist bekannt.²⁹ Eine Phagozytosestimulation mit Maresinen kann im vorliegenden Versuch aber ausgeschlossen werden, da den Makrophagen keine DHA angeboten wurde. Somit ist der phagozytosestimulierende Effekt bislang einzig durch das 18R-HEPE zu erklären. Wie 18R-HEPE genau auf Makrophagen wirkt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

In der murinen Pneumokokkenpneumonie kann die Erregerelimination durch Bestimmung der Bakterienlast in BALF und Blut evaluiert werden. Im Gegensatz zur *in vitro* Analyse der Phagozytoseaktivität zeigte sich *in vivo* kein Unterschied in der Erregerbeseitigung zwischen den 18R-HEPE-Behandlungsgruppen und der infizierten Kontrollgruppe nach *S. pneumoniae*-Infektion. Dagegen konnten Seki, *et al.* zeigen, dass im Rahmen einer murinen Aspirationspneumonie die intravenöse RvE1-Applikation eine reduzierte pulmonale Infiltration von neutrophilen Granulozyten, schnellere Bakterienphagozytose mit geringerer Bakterienlast und einen Überlebensvorteil erbrachte.¹⁰⁴

Dadurch, dass es in den infizierten Gruppen zu keiner veränderten Verteilung der Leukozyten in BALF und Blut unter 18R-HEPE-Behandlung kam, ist es aktuell nicht auszuschließen, dass eine nicht ausreichende 18R-HEPE Konzentration appliziert wurde, um nach Umwandlung am Entzündungsort eine biologisch wirksame RvE1-Konzentration zu erreichen. Allerdings zeigten bereits geringe Mengen RvE1 im Bereich von 25ng intraperitoneal oder 100ng intravenös lokale und systemische Effekte im Infektionsmodell.^{65,104} Es muss demnach noch geprüft werden, wieviel 18R-HEPE appliziert werden muss, um ausreichend hohe 18R-HEPE-Serumspiegel zu erhalten, damit in der Lunge am Ort der Entzündung wirksame Mengen an RvE1 gebildet werden.

Die Literatur deutet darauf hin, dass die Förderung der Resolution ein vielversprechender Ansatz zur Verbesserung des Pneumonieverlaufs ist. Auch wenn 18R-HEPE in der aktuellen *in vivo* Studie allein keine Effekte im murinen Modell der Pneumokokkenpneumonie zeigte, konnte nachgewiesen werden, dass die RvE1-Rezeptoren in der Lunge vorhanden sind und im Rahmen einer Infektion reguliert werden. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass der zugrunde liegende Signalweg eine Rolle in der Infektion spielt. Welche Bedeutung jedoch dem letztendlich wirksamen Mediator RvE1 zukommt und welchen direkten Effekt RvE1 allein oder in Kombination mit anderen SPM im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie und anderen klinisch relevanten Infektionen hat, muss in weiterführenden Untersuchungen eingehend evaluiert werden.

4.5 Ausblick

Der physiologische Ablauf einer Entzündungsreaktion ist ein essentiell für eine adäquate Erregerelimination. Diese beinhaltet eine Resolutionsphase mit Wiederherstellung der Gewebshomöostase, ohne die es zu einem andauernden proinflammatorischen Zustand mit einer protrahierten und überschießenden Entzündung kommt. Daher ist es wichtig, dass die Entzündungsreaktion zeitgerecht terminiert und Reparatursprozesse initiiert werden, um die Gewebshomöostase wiederherzustellen. Aktueller Gegenstand der Forschung ist hierbei der Einfluss von spezialisierten, die Resolution fördernden Lipidmediatoren, die erstmals von der Arbeitsgruppe um Charles N. Serhan beschrieben wurden.¹¹⁸ Obwohl in der aktuellen Arbeit kein eindeutiger Effekt des 18R-HEPE-RvE1-Signalwegs *in vivo* nachgewiesen werden konnte, legt die Literatur doch nahe, dass SPM im Tiermodell positive Auswirkungen auf den Entzündungsverlauf in verschiedenen Infektions- und Inflammationserkrankungen haben.^{27,104,119,57,120,114,121}

Die aktuelle Studie demonstriert, dass während einer effektiven antiinfektiven Behandlung ChemR23 vermehrt exprimiert wird, welcher die resolutionsfördernde Wirkung von RvE1 vermittelt und nachweislich einen stimulierenden Effekt auf die Phagozytoseaktivität verschiedener Leukozyten ausübt.^{59,73,77,81} So ist es denkbar, dass bei einer bakteriellen Infektion zusätzlich zur adäquaten antibiotischen Therapie die 18R-HEPE- oder RvE1-Substitution eine zügigere Rekonvaleszenzzeit zur Folge

hat. Weiterführende Untersuchungen sind denkbar, in denen in einer Pneumokokkenpneumonie zusätzlich zur Antibiotikabehandlung 18R-HEPE oder RvE1 appliziert werden, um die Effekte in der Resolutionsphase nach mehr als 72h zu untersuchen. Da ChemR23- und BLT1-*knockout*-Mäuse keinen Unterschied zu WT-Mäusen in der milden Pneumonie gezeigt haben und 18R-HEPE keinen Einfluss auf den Verlauf der schweren Pneumonie hatte, liegt die Vermutung nahe, dass die Regulierung der Resolution auf mehr als nur einem SPM beruht, sodass der Ausfall eines Signalweges durch andere Mechanismen kompensiert werden kann. Dies ist biologisch sinnvoll. Hier könnten weitere Untersuchungen ansetzen, die die Effekte von mehreren SPM in der Infektion simultan analysieren.

Des Weiteren muss verglichen werden, auf welcher Ebene die Substitution der Resolutionsmediatoren sinnvoll ist, da die Applikation sowohl von ω -3-PUFA, als auch deren Zwischenmetabolite und SPM positive Auswirkungen auf den Verlauf von Infektionen und Entzündungen gezeigt haben.^{101,122,58} So stellt sich die Frage, ob eine ω -3-PUFA-Gabe, aus der mehrere SPM gebildet und mehrere Signalwege aktiviert bzw. inhibiert werden, oder eine gezielte SPM-Therapie von Vorteil ist. Ein mögliches Modell zur eingehenderen Analyse wäre zum Beispiel die vergleichende Therapie mit EPA, 18R-HEPE und RvE1 in der murinen Pneumokokkenpneumonie.

Die Eigenschaft der SPM, die Inflammation zu regulieren ohne dabei immunsuppressiv zu wirken, ist in der Infektion ein vielversprechender Ansatz zur Ergänzung aktueller Therapien von Infektionen des Menschen. Da bislang nur Tiermodelle zum Einfluss von SPM vorliegen, stellt sich zudem die Frage nach der Translatierbarkeit auf den Menschen.¹²³ Eine aktuelle Publikation der Arbeitsgruppe um Charles N. Serhan beschreibt erstmals Lipidmediatorprofile, auch nach Endotoxingabe, im humanen Blut.¹²⁴ Zusätzlich wurde gezeigt, dass sich im Menschen nach Aspirineinnahme und ω -3-Zufuhr die Konzentration an SPM im Blut erhöht.³⁰ Dennoch sind Konzentration und Verteilung der verschiedenen SPM im humanen Gewebe aktuell weitgehend unbekannt und müssen als sogenanntes Lipidmetabolom noch etabliert werden. Darüber hinaus ist es notwendig, eine wirksame Dosis sowie optimale Applikationsrouten zu eruieren und die Pharmakokinetik insbesondere von RvE1 zu untersuchen, um das tatsächliche Potential der Resolutionsmediatoren zu evaluieren.

Insgesamt besteht weiterhin die Aussicht, dass Resolutionsmediatoren in akuten und chronischen Inflammations- und Infektionserkrankungen zukünftig als adjuvante Therapie verfügbar werden.

5.0 Literaturverzeichnis

1. **M. Kolditz, S. Ewig**, Ambulant erworbene Pneumonie bei Erwachsenen, Dtsch. Arztebl. 114 (2017) 838–48. doi:10.3238/arztebl.2017.0838.
2. Die 10 häufigsten Todesursachen insgesamt nach ICD-10 im Jahr 2015, (2017). <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>.
3. **M. Kolditz, F. Tesch, L. Mocke, G. Höffken, S. Ewig, J. Schmitt**, Burden and risk factors of ambulatory or hospitalized CAP: A population based cohort study, Respir. Med. 121 (2016) 32–38. doi:10.1016/J.RMED.2016.10.015.
4. **N. Suttorp, M. Möckel, B. Siegmund, M. Dietel**, Harrisons - Innere Medizin, 2016.
5. **Statistisches Bundesamt**, Gesundheit - Diagnosedaten der Patientinnen und Patienten in Vorsorge- oder Rehabilitationseinrichtungen 2016, 2017. https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/VorsorgeRehabilitation/DiagnosedatenVorsorgeReha.html%0Ahttps://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/VorsorgeRehabilitation/DiagnosedatenVorsorgeReha2120622167004.pdf?__blob=.
6. **Petra Creutz; Norbert Suttorp**, Ambulant erworbene Pneumonie: Wie antibiotisch therapieren?, Dtsch Arztebl. 112 (2015) 10–15.
7. **T.M. File**, Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: A cause for concern, Am. J. Med. Suppl. 117 (2004) 39–50. doi:10.1016/j.amjmed.2004.07.007.
8. **S. Ewig, T. Welte, J. Chastre, A. Torres**, Rethinking the concepts of community-acquired and health-care-associated pneumonia, Lancet Infect. Dis. 10 (2010) 279–287. doi:10.1016/S1473-3099(10)70032-3.
9. **S. Rousseau, N. Suttorp**, Ambulant erworbene Infektionen der Atemwege und des Lungenparenchyms, Internist (Berl). 41 (2000) 1158–1169. doi:10.1007/s001080050676.
10. **S. Ewig, G. Höffken, W. Kern, G. Rohde, H. Flick, R. Krause, S. Ott, T. Bauer, K. Dalhoff, S. Gatermann, M. Kolditz, S. Krüger, J. Lorenz, M. Pletz, A. de Roux, B. Schaaf, T. Schaberg, H. Schütte, T. Welte**, Behandlung von

- erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention – Update 2016, *Pneumologie*. 70 (2016) 151–200. doi:10.1055/s-0042-101873.
11. **E.M. Mortensen, C.M. Coley, D.E. Singer, T.J. Marrie, D.S. Obrosky, W.N. Kapoor, M.J. Fine**, Causes of Death for Patients With Community-Acquired Pneumonia, *Arch. Intern. Med.* 162 (2002) 1059. doi:10.1001/archinte.162.9.1059.
 12. **D. Bogaert, R. De Groot, P.W.M. Hermans**, *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease, *Lancet Infect. Dis.* 4 (2004) 144–54. doi:10.1016/S1473-3099(04)00938-7.
 13. **H. Hof, R. Dörries**, *Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie*, 2009.
 14. **K. Sjostrom, C. Spindler, A. Ortqvist, M. Kalin, A. Sandgren, S. Kuhlmann-Berenzon, B.H. Normark**, Clonal and Capsular Types Decide Whether Pneumococci Will Act as a Primary or Opportunistic Pathogen, *Clin. Infect. Dis.* 42 (2006) 451–459. doi:10.1086/499242.
 15. **J.J.C. Drijkoningen, G.G.U. Rohde**, Pneumococcal infection in adults: burden of disease, *Clin. Microbiol. Infect.* 20 (2014) 45–51. doi:10.1111/1469-0691.12461.
 16. **J.L. Bradshaw, H.R. Pipkins, L.E. Keller, J.K. Pendarvis, L.S. McDaniel**, Mucosal Infections and Invasive Potential of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* Are Enhanced by Oligopeptide Binding Proteins AliC and AliD, *MBio*. 9 (2018) e02097-17. doi:10.1128/mBio.02097-17.
 17. **J.D. Grabenstein, L.K. Musey**, Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults, *Vaccine*. 32 (2014) 2399–2405. doi:10.1016/j.vaccine.2014.02.096.
 18. **N.J. Andrews, P.A. Waight, P. Burbidge, E. Pearce, L. Roalfe, M. Zancolli, M. Slack, S.N. Ladhani, E. Miller, D. Goldblatt**, Serotype-specific effectiveness and correlates of protection for the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine: a postlicensure indirect cohort study, *Lancet Infect. Dis.* 14 (2014) 839–846. doi:10.1016/S1473-3099(14)70822-9.
 19. **W.P. Hausdorff, W.P. Hanage**, Interim results of an ecological experiment — Conjugate vaccination against the pneumococcus and serotype replacement,

Hum. Vaccin. Immunother. 12 (2016) 358–374.
doi:10.1080/21645515.2015.1118593.

20. **G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spanel-Borowski, W. Wolff, L. Wurzinger, H.-G. Zilch**, Duale Reihe Anatomie, in: Thieme, 2007: pp. 528–564.
21. **T.H. Schiebler, H.-W. Korf**, Anatomie, in: Schattauer, 2007: pp. 274–279.
22. **X.-Y. Wang, K.M. Keefe, S.M. Jensen-Taubman, D. Yang, K. Yan, R.I. Linnoila**, Novel Method for Isolation of Murine Clara Cell Secretory Protein-Expressing Cells with Traces of Stemness, *PLoS One*. 7 (2012) e43008. doi:10.1371/journal.pone.0043008.
23. **F. Horn, ed.**, Biochemie des Menschen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2015. doi:10.1055/b-003-125849.
24. **M. Königshoff, T. Brandenburger, eds.**, Kurzlehrbuch Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2012. doi:10.1055/b-002-99151.
25. **J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, eds.**, Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2016. doi:10.1055/b-003-129341.
26. **C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli**, The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution, *Semin. Immunol.* 27 (2015) 200–215. doi:10.1016/j.smim.2015.03.004.
27. **C.N. Serhan**, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology, *Nature*. 510 (2014) 92–101. doi:10.1038/nature13479.
28. **C.N. Serhan, C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, K. Gronert**, Novel Functional Sets of Lipid-Derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1197–1204. doi:10.1084/jem.192.8.1197.
29. **B.D. Levy, C.N. Serhan**, Resolution of Acute Inflammation in the Lung, *Annu. Rev. Physiol.* 76 (2014) 467–492. doi:10.1146/annurev-physiol-021113-170408.
30. **R.A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C.N. Serhan**, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human

- tissue, *Am. J. Physiol. Physiol.* 307 (2014) C39–C54. doi:10.1152/ajpcell.00024.2014.
31. **C.N. Serhan, S.D. Brain, C.D. Buckley, D.W. Gilroy, C. Haslett, L.A.J. O'Neill, M. Perretti, A.G. Rossi, J.L. Wallace**, Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms, *FASEB J.* 21 (2007) 325–332. doi:10.1096/fj.06-7227rev.
 32. **M.C. Basil, B.D. Levy**, Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 51–67. doi:10.1038/nri.2015.4.
 33. **M. Arita, T. Ohira, Y.-P. Sun, S. Elangovan, N. Chiang, C.N. Serhan**, Resolvin E1 Selectively Interacts with Leukotriene B4 Receptor BLT1 and ChemR23 to Regulate Inflammation, *J. Immunol.* 178 (2007) 3912–3917. doi:10.4049/jimmunol.178.6.3912.
 34. **B.D. Levy, C.B. Clish, B. Schmidt, K. Gronert, C.N. Serhan**, Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 612–619. doi:10.1038/89759.
 35. **W.M.N. Ratnayake, C. Galli**, Fat and Fatty Acid Terminology, *Methods of Analysis and Fat Digestion and Metabolism: A Background Review Paper*, *Ann. Nutr. Metab.* 55 (2009) 8–43. doi:10.1159/000228994.
 36. **C.M. Yates, P.C. Calder, G. Ed Rainger**, Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease, *Pharmacol. Ther.* 141 (2014) 272–282. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.10.010.
 37. **B. Samuelsson**, Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation, *Science* (80-.). 220 (1983) 568–575. doi:10.1126/science.6301011.
 38. **J. Weiss, J. Drazen, N. Coles, E. McFadden, P. Weller, E. Corey, R. Lewis, K. Austen**, Bronchoconstrictor effects of leukotriene C in humans, *Science* (80-.). 216 (1982) 196–198. doi:10.1126/science.7063880.
 39. **G.O. Burr, M.M. Burr.**, a New Deficiency Disease Produced By the Rigid Exclusion of Fat From the Diet, *J. Biol. Chem.* 82 (1929) 345–367. doi:10.1111/j.1753-4887.1973.tb06008.x.

40. **J.R. (1978). Dyerberg, J., Bang, H. O., Stofferson, E., Moncada, S., & Vane,** Eicosapentaenic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis?, *Lancet*. 2 (1978) 117–119.
41. **W.P. Newman, J.P. Middaugh, M.T. Propst, D.R. Rogers,** Atherosclerosis in Alaska Natives and non-natives., *Lancet*. 341 (1993) 1056–7. doi:10.1016/0140-6736(93)92413-N.
42. **N. Kromann, A. Green,** Epidemiological Studies in the Upernavik District, Greenland, *Acta Med. Scand*. 208 (2009) 401–406. doi:10.1111/j.0954-6820.1980.tb01221.x.
43. **Y. Kagawa, M. Nishizawa, M. Suzuki, T. Miyatake, T. Hamamoto, K. Goto, E. Motonaga, H. Izumikawa, H. Hirata, A. Ebihara,** Eicosapolyenoic acids of serum lipids of Japanese islanders with low incidence of cardiovascular diseases., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. 28 (1982) 441–53.
44. **D.F. Horrobin,** Low prevalences of coronary heart disease (CHD), psoriasis, asthma and rheumatoid arthritis in Eskimos: are they caused by high dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA), a genetic variation of essential fatty acid (EFA) metabolism or a combination of, *Med. Hypotheses*. 22 (1987) 421–8.
45. **A. Belluzzi, S. Boschi, C. Brignola, A. Munarini, G. Cariani, F. Miglio,** Polyunsaturated fatty acids and inflammatory bowel disease, *Am. J. Clin. Nutr*. 71 (2000) 339s–342s. doi:10.1093/ajcn/71.1.339s.
46. **N. Kromann, A. Green,** Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974., *Acta Med. Scand*. 208 (1980) 401–6.
47. **H. Wahn,** Effect of arachidonic and eicosapentaenoic acids on acute lung injury induced by hypochlorous acid, *Thorax*. 57 (2002) 1060–1066. doi:10.1136/thorax.57.12.1060.
48. **F. Grimminger, K. Mayer, L. Kiss, D. Walmrath, W. Seeger,** PAF-induced synthesis of tetraenoic and pentaenoic leukotrienes in the isolated rabbit lung, *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol*. 278 (2000) L268–L275. doi:10.1152/ajplung.2000.278.2.L268.
49. **F. Grimminger, H. Wahn, H.J. Kramer, J. Stevens, K. Mayer, D. Walmrath, W.**

- Seeger**, Differential influence of arachidonic vs. eicosapentaenoic acid on experimental pulmonary hypertension, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 268 (1995) H2252–H2259. doi:10.1152/ajpheart.1995.268.6.H2252.
50. **J.X. Kang, J. Wang, L. Wu, Z.B. Kang**, Fat-1 mice convert n-6 to n-3 fatty acids, *Nature*. 427 (2004) 504–504. doi:10.1038/427504a.
 51. **J. Endo, M. Sano, Y. Isobe, K. Fukuda, J.X. Kang, H. Arai, M. Arita**, 18-HEPE, an n-3 fatty acid metabolite released by macrophages, prevents pressure overload–induced maladaptive cardiac remodeling, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 1673–1687. doi:10.1084/jem.20132011.
 52. **K. Mayer, A. Kiessling, J. Ott, M.B. Schaefer, M. Hecker, I. Henneke, R. Schulz, A. Günther, J. Wang, L. Wu, J. Roth, W. Seeger, J.X. Kang**, Acute Lung Injury Is Reduced in fat-1 Mice Endogenously Synthesizing n-3 Fatty Acids, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179 (2009) 474–483. doi:10.1164/rccm.200807-1064OC.
 53. **K. Mayer, S. Gokorsch, C. Fegbeutel, K. Hattar, S. Rosseau, D. Walmrath, W. Seeger, F. Grimminger**, Parenteral Nutrition with Fish Oil Modulates Cytokine Response in Patients with Sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167 (2003) 1321–1328. doi:10.1164/rccm.200207-674OC.
 54. **K. Mayer, C. Fegbeutel, K. Hattar, U. Sibelius, H.-J. Kramer, K. Heuer, B. Temmesfeld-Wollbrück, S. Gokorsch, F. Grimminger, W. Seeger**, ω -3 vs. ω -6 lipid emulsions exert differential influence on neutrophils in septic shock patients: impact on plasma fatty acids and lipid mediator generation, *Intensive Care Med.* 29 (2003) 1472–1481. doi:10.1007/s00134-003-1900-2.
 55. **K. Mayer, S. Meyer, M. Reinholz-Muhly, U. Maus, M. Merfels, J. Lohmeyer, F. Grimminger, W. Seeger**, Short-Time Infusion of Fish Oil-Based Lipid Emulsions, Approved for Parenteral Nutrition, Reduces Monocyte Proinflammatory Cytokine Generation and Adhesive Interaction with Endothelium in Humans, *J. Immunol.* 171 (2003) 4837–4843. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4837.
 56. **C.N. Serhan, C.B. Clish, J. Brannon, S.P. Colgan, N. Chiang, K. Gronert**, Novel Functional Sets of Lipid-Derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal

- Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1197–1204. doi:10.1084/jem.192.8.1197.
57. **J. Ott, C. Hiesgen, K. Mayer**, Lipids in critical care medicine, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 85 (2011) 267–273. doi:10.1016/j.plefa.2011.04.011.
 58. **C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli, B.D. Levy**, Lipid Mediators in the Resolution of Inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a016311. doi:10.1101/cshperspect.a016311.
 59. **M. Arita, T. Ohira, Y.-P. Sun, S. Elangovan, N. Chiang, C.N. Serhan**, Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation., *J. Immunol.* 178 (2007) 3912–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646802>.
 60. **M. Arita, F. Bianchini, J. Aliberti, A. Sher, N. Chiang, S. Hong, R. Yang, N. a Petasis, C.N. Serhan**, Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 713–722. doi:10.1084/jem.20042031.
 61. **T. Yoshimura, J.J. Oppenheim**, Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C–C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 674–684. doi:10.1016/j.yexcr.2010.10.023.
 62. **J.M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, C.N. Serhan**, Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes, *Nature.* 447 (2007) 869–874. doi:10.1038/nature05877.
 63. **J.L. Cash, R. Hart, A. Russ, J.P.C. Dixon, W.H. Colledge, J. Doran, A.G. Hendrick, M.B.L. Carlton, D.R. Greaves**, Synthetic chemerin-derived peptides suppress inflammation through ChemR23, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 767–775. doi:10.1084/jem.20071601.
 64. **A.M. Tager, A.D. Luster**, BLT1 and BLT2: the leukotriene B4 receptors, Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids. 69 (2003) 123–134. doi:10.1016/S0952-3278(03)00073-5.
 65. **D. El Kebir, P. Gjorstrup, J.G. Filep**, Resolvin E1 promotes phagocytosis-induced neutrophil apoptosis and accelerates resolution of pulmonary

- inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 14983–14988. doi:10.1073/pnas.1206641109.
66. **M. Arita, M. Yoshida, S. Hong, E. Tjonahen, J.N. Glickman, N.A. Petasis, R.S. Blumberg, C.N. Serhan**, Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from omega-3 eicosapentaenoic acid, protects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 7671–7676. doi:10.1073/pnas.0409271102.
67. **E.J. Haas-Stapleton, Y. Lu, S. Hong, M. Arita, S. Favoreto, S. Nigam, C.N. Serhan, N. Agabian**, *Candida albicans* Modulates Host Defense by Biosynthesizing the Pro-Resolving Mediator Resolvin E1, *PLoS One.* 2 (2007) e1316. doi:10.1371/journal.pone.0001316.
68. **H.C. Müller-Redetzky, S.M. Wienhold, J. Berg, A.C. Hocke, S. Hippenstiel, K. Hellwig, B. Gutbier, B. Opitz, J. Neudecker, J. Rückert, A.D. Gruber, O. Kershaw, K. Mayer, N. Suttorp, M. Witzenrath**, Moxifloxacin is not anti-inflammatory in experimental pneumococcal pneumonia, *J. Antimicrob. Chemother.* 70 (2015) 830–840. doi:10.1093/jac/dku446.
69. **S.-M. Wienhold**, Untersuchung einer potenziell immunmodulatorischen Wirkung von Moxifloxacin in der schweren murinen Pneumokokkenpneumonie, (2015). <https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/12317?show=full> (accessed November 6, 2018).
70. **J.X. Kang**, Fat-1 transgenic mice: A new model for omega-3 research, Prostaglandins, *Leukot. Essent. Fat. Acids.* 77 (2007) 263–267. doi:10.1016/j.plefa.2007.10.010.
71. **K. Reppe, T. Tschernig, A. Lührmann, V. van Laak, K. Grote, M. V. Zemlin, B. Gutbier, H.C. Müller, M. Kursar, H. Schütte, S. Rosseau, R. Pabst, N. Suttorp, M. Witzenrath**, Immunostimulation with Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Increased Survival in Murine Pneumonia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 40 (2009) 474–481. doi:10.1165/rcmb.2008-0071OC.
72. **R.E. Abdulnour, H.P. Sham, D.N. Douda, R.A. Colas, J. Dalli, Y. Bai, X. Ai, C.N. Serhan, B.D. Levy**, Aspirin-triggered resolvin D1 is produced during self-resolving gram-negative bacterial pneumonia and regulates host immune responses for the resolution of lung inflammation, *Mucosal Immunol.* 9 (2016)

1278–1287. doi:10.1038/mi.2015.129.

73. **S. Luangsay, V. Wittamer, B. Bondue, O. De Henau, L. Rouger, M. Brait, J.-D. Franssen, P. de Nadai, F. Huaux, M. Parmentier**, Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model, *J. Immunol.* 183 (2009) 6489–6499. doi:10.4049/jimmunol.0901037.
74. **H. Seki, Y. Tani, M. Arita**, Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvin E1, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 89 (2009) 126–130. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.03.002.
75. **O. Haworth, M. Cernadas, R. Yang, C.N. Serhan, B.D. Levy**, Resolvin E1 regulates interleukin 23, interferon- γ and lipoxin A4 to promote the resolution of allergic airway inflammation, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 873–879. doi:10.1038/ni.1627.
76. **W.W. Huang, E.A. Garcia-Zepeda, A. Sauty, H.C. Oettgen, M.E. Rothenberg, A.D. Luster**, Molecular and biological characterization of the murine leukotriene B4 receptor expressed on eosinophils., *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1063–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743525> (accessed November 16, 2018).
77. **M. Herová, M. Schmid, C. Gemperle, M. Hersberger**, ChemR23, the Receptor for Chemerin and Resolvin E1, Is Expressed and Functional on M1 but Not on M2 Macrophages, *J. Immunol.* 194 (2015) 2330–2337. doi:10.4049/jimmunol.1402166.
78. **M. Samson, A.L. Edinger, P. Stordeur, J. Rucker, V. Verhasselt, M. Sharron, C. Govaerts, C. Mollereau, G. Vassart, R.W. Doms, M. Parmentier**, ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 1689–1700. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1689::AID-IMMU1689>3.0.CO;2-I.
79. **J. Kaur, R. Adya, B.K. Tan, J. Chen, H.S. Randeva**, Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391 (2010) 1762–1768. doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.150.
80. **E.L. Campbell, N.A. Louis, S.E. Tomassetti, G.O. Canny, M. Arita, C.N.**

- Serhan, S.P. Colgan**, Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution, *FASEB J.* 21 (2007) 3162–3170. doi:10.1096/fj.07-8473com.
81. **S. Luangsay, V. Wittamer, B. Bondue, O. De Henau, L. Rouger, M. Brait, J.-D. Franssen, P. de Nadai, F. Huaux, M. Parmentier**, Mouse ChemR23 Is Expressed in Dendritic Cell Subsets and Macrophages, and Mediates an Anti-Inflammatory Activity of Chemerin in a Lung Disease Model, *J. Immunol.* 183 (2009) 6489–6499. doi:10.4049/jimmunol.0901037.
82. **W. Vermi, E. Riboldi, V. Wittamer, F. Gentili, W. Luini, S. Marrelli, A. Vecchi, J.-D. Franssen, D. Communi, L. Massardi, M. Sironi, A. Mantovani, M. Parmentier, F. Facchetti, S. Sozzani**, Role of ChemR23 in directing the migration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to lymphoid organs and inflamed skin, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 509–515. doi:10.1084/jem.20041310.
83. **B.A. Zabel, A.M. Silverio, E.C. Butcher**, Chemokine-Like Receptor 1 Expression and Chemerin-Directed Chemotaxis Distinguish Plasmacytoid from Myeloid Dendritic Cells in Human Blood, *J. Immunol.* 174 (2005) 244–251. doi:10.4049/jimmunol.174.1.244.
84. **V. Wittamer, J.-D. Franssen, M. Vulcano, J.-F. Mirjolet, E. Le Poul, I. Migeotte, S. Brézillon, R. Tyldesley, C. Blanpain, M. Detheux, A. Mantovani, S. Sozzani, G. Vassart, M. Parmentier, D. Communi**, Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids., *J. Exp. Med.* 198 (2003) 977–85. doi:10.1084/jem.20030382.
85. **B.A. Zabel, T. Ohyama, L. Zuniga, J.-Y. Kim, B. Johnston, S.J. Allen, D.G. Guido, T.M. Handel, E.C. Butcher**, Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: Regulation by TGF- β and TLR ligands, *Exp. Hematol.* 34 (2006) 1106–1114. doi:10.1016/j.exphem.2006.03.011.
86. **B.C. Subramanian, R. Majumdar, C.A. Parent**, The role of the LTB₄-BLT1 axis in chemotactic gradient sensing and directed leukocyte migration, *Semin. Immunol.* 33 (2017) 16–29. doi:10.1016/j.smim.2017.07.002.
87. **W.W. Huang, E.A. Garcia-Zepeda, A. Sauty, H.C. Oettgen, M.E. Rothenberg, A.D. Luster**, Molecular and biological characterization of the murine leukotriene

- B4 receptor expressed on eosinophils., *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1063–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9743525> (accessed February 4, 2019).
88. **F. Rios-Santos, C.F. Benjamim, D. Zavery, S.H. Ferreira, F. de Q. Cunha,** A critical role of leukotriene B₄ in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis., *Shock.* 19 (2003) 61–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558146> (accessed March 1, 2019).
89. **D. Kim, C.L. Haynes,** Neutrophil chemotaxis within a competing gradient of chemoattractants, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6070–6078. doi:10.1021/ac3009548.
90. **B. Bondue, O. Vosters, P. de Nadai, S. Glineur, O. De Henau, S. Luangsay, F. Van Gool, D. Communi, P. De Vuyst, D. Desmecht, M. Parmentier,** ChemR23 dampens lung inflammation and enhances anti-viral immunity in a mouse model of acute viral pneumonia., *PLoS Pathog.* 7 (2011). doi:10.1371/journal.ppat.1002358.
91. **H. Widegren, M. Andersson, P. Borgeat, L. Flamand, S. Johnston, L. Greiff,** LTB₄ increases nasal neutrophil activity and conditions neutrophils to exert antiviral effects, *Respir. Med.* 105 (2011) 997–1006. doi:10.1016/J.RMED.2010.12.021.
92. **M. Wan, A. Sabirsh, A. Wetterholm, B. Agerberth, J.Z. Haeggström,** Leukotriene B₄ triggers release of the cathelicidin LL-37 from human neutrophils: novel lipid-peptide interactions in innate immune responses, *FASEB J.* 21 (2007) 2897–2905. doi:10.1096/fj.06-7974com.
93. **C.H. Serezani, S. Kane, L. Collins, M. Morato-Marques, J.J. Osterholzer, M. Peters-Golden,** Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B₄ via a GM-CSF/PU.1 axis., *J. Immunol.* 189 (2012) 906–15. doi:10.4049/jimmunol.1200257.
94. **A. Talvani, F.S. Machado, G.C. Santana, A. Klein, L. Barcelos, J.S. Silva, M.M. Teixeira,** Leukotriene B₄ induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection., *Infect. Immun.* 70 (2002) 4247–53. doi:10.1128/IAI.70.8.4247-4253.2002.
95. **L.M. Rogers, L.H. Faccioli, D.M. Aronoff, K.L. Mason, C.H. Serezani, E.M. Soares,** Leukotriene B₄ Enhances Innate Immune Defense against the Puerperal Sepsis Agent *Streptococcus pyogenes*, *J. Immunol.* 190 (2013) 1614–

1622. doi:10.4049/jimmunol.1202932.
96. **P. Mancuso, P. Nana-Sinkam, M. Peters-Golden**, Leukotriene B₄ augments neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*., *Infect. Immun.* 69 (2001) 2011–6. doi:10.1128/IAI.69.4.2011-2016.2001.
97. **A.M. Tager, J.H. Dufour, K. Goodarzi, S.D. Bercury, U.H. von Andrian, A.D. Luster**, BLTR mediates leukotriene B₄-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis., *J. Exp. Med.* 192 (2000) 439–46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934232> (accessed February 6, 2019).
98. **B. Haribabu, M.W. Verghese, D.A. Steeber, D.D. Sellars, C.B. Bock, R. Snyderman**, Targeted disruption of the leukotriene B₄ receptor in mice reveals its role in inflammation and platelet-activating factor-induced anaphylaxis., *J. Exp. Med.* 192 (2000) 433–8. doi:10.1084/JEM.192.3.433.
99. **A. Toda, K. Terawaki, S. Yamazaki, K. Saeki, T. Shimizu, T. Yokomizo**, Attenuated Th1 induction by dendritic cells from mice deficient in the leukotriene B₄ receptor 1, *Biochimie.* 92 (2010) 682–691. doi:10.1016/j.biochi.2009.12.002.
100. **N.D. Kim, R.C. Chou, E. Seung, A.M. Tager, A.D. Luster**, A unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis., *J. Exp. Med.* 203 (2006) 829–35. doi:10.1084/jem.20052349.
101. **J. Borén, M. Ståhlman, S.L. Svahn, M.A. Ulleryd, L. Grahnmö, M.E. Johansson, J.-O. Jansson, S. Nilsson**, Dietary Omega-3 Fatty Acids Increase Survival and Decrease Bacterial Load in Mice Subjected to *Staphylococcus aureus*-Induced Sepsis, *Infect. Immun.* 84 (2016) 1205–1213. doi:10.1128/iai.01391-15.
102. **C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke**, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators., *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 349–61. doi:10.1038/nri2294.
103. **M. Codagnone, E. Cianci, A. Lamolinara, V.C. Mari, A. Nespoli, E. Isopi, D. Mattoscio, M. Arita, A. Bragonzi, M. Iezzi, M. Romano, A. Recchiuti**, Resolvin D1 enhances the resolution of lung inflammation caused by long-term *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Mucosal Immunol.* 11 (2018) 35–49. doi:10.1038/mi.2017.36.

104. **H. Seki, K. Fukunaga, M. Arita, H. Arai, H. Nakanishi, R. Taguchi, T. Miyasho, R. Takamiya, K. Asano, A. Ishizaka, J. Takeda, B.D. Levy**, The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury., *J. Immunol.* 184 (2010) 836–43. doi:10.4049/jimmunol.0901809.
105. **M.D. Turner, B. Nedjai, T. Hurst, D.J. Pennington**, Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843 (2014) 2563–2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
106. **T. Ishida, M. Yoshida, M. Arita, Y. Nishitani, S. Nishiumi, A. Masuda, S. Mizuno, T. Takagawa, Y. Morita, H. Kutsumi, H. Inokuchi, C.N. Serhan, R.S. Blumberg, T. Azuma**, Resolvin E1, an endogenous lipid mediator derived from eicosapentaenoic acid, prevents dextran sulfate sodium-induced colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* (2010). doi:10.1002/ibd.21029.
107. **S. Krishnamoorthy, A. Recchiuti, N. Chiang, G. Fredman, C.N. Serhan**, Resolvin D1 receptor stereoselectivity and regulation of inflammation and proresolving MicroRNAs, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 2018–2027. doi:10.1016/j.ajpath.2012.01.028.
108. **M. Yamada, J.C. Gomez, P.E. Chugh, C.A. Lowell, M.C. Dinauer, D.P. Dittmer, C.M. Doerschuk**, Interferon- γ production by neutrophils during bacterial pneumonia in mice., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (2011) 1391–401. doi:10.1164/rccm.201004-0592OC.
109. **G. Kak, M. Raza, B.K. Tiwari**, Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases, *Biomol. Concepts.* 9 (2018) 64–79. doi:10.1515/bmc-2018-0007.
110. **J.C. Gomez, M. Yamada, J.R. Martin, H. Dang, W.J. Brickey, W. Bergmeier, M.C. Dinauer, C.M. Doerschuk**, Mechanisms of Interferon- γ Production by Neutrophils and Its Function during *Streptococcus pneumoniae* Pneumonia, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52 (2015) 349–364. doi:10.1165/rcmb.2013-0316OC.
111. **J. Wattie, M. Yoshida, R. Ellis, P.M. O’Byrne, R. Leigh, K. Matsumoto, M.D. Inman**, Effect of Interferon- γ on Allergic Airway Responses in Interferon- γ – deficient Mice , *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 451–456.

doi:10.1164/rccm.200202-095oc.

112. **H. Mühl, J. Pfeilschifter**, Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- γ , *Int. Immunopharmacol.* 3 (2003) 1247–1255. doi:10.1016/S1567-5769(03)00131-0.
113. **K.L. Fritsche, M. Byrge, C. Feng**, Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil reduce interleukin-12 and interferon-gamma production in mice., *Immunol. Lett.* 65 (1999) 167–73. doi:10.1016/S0165-2478(98)00109-6.
114. **N. Chiang, G. Fredman, F. Bäckhed, S.F. Oh, T. Vickery, B.A. Schmidt, C.N. Serhan**, Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements, *Nature.* 484 (2012) 524–528. doi:10.1038/nature11042.
115. **S. Adolph, H. Fuhrmann, J. Schumann**, Unsaturated Fatty Acids Promote the Phagocytosis of *P. aeruginosa* and *R. equi* by RAW264.7 Macrophages., *Curr. Microbiol.* (2012). doi:10.1007/s00284-012-0207-3.
116. **S.F. Oh, P.S. Pillai, A. Recchiuti, R. Yang, C.N. Serhan**, Pro-resolving actions and stereoselective biosynthesis of 18S E-series resolvins in human leukocytes and murine inflammation., *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 569–81. doi:10.1172/JCI42545.
117. **S.J. a Wuest, M. Crucet, C. Gemperle, C. Loretz, M. Hersberger**, Expression and regulation of 12/15-lipoxygenases in human primary macrophages., *Atherosclerosis.* (2012) 1–7. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.07.022.
118. **C.N. Serhan, J. Savill**, Resolution of inflammation: the beginning programs the end., *Nat. Immunol.* 6 (2005) 1191–7. doi:10.1038/ni1276.
119. **C.N. Serhan, N. Chiang, J. Dalli**, Molecular Aspects of Medicine New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration, *Mol. Aspects Med.* (2017). doi:10.1016/j.mam.2017.08.002.
120. **B. Wang, X. Gong, J. Wan, L. Zhang, Z. Zhang, H. Li, S. Min**, Resolvin D1 protects mice from LPS-induced acute lung injury, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 24 (2011) 434–441. doi:10.1016/J.PUPT.2011.04.001.
121. **J. Walker, E. Dichter, G. Lacorte, D. Kerner, B. Spur, A. Rodriguez, K. Yin**, Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis., *Shock.* 36 (2011) 410–6. doi:10.1097/SHK.0b013e31822798c1.

122. **M. Hecker, N. Sommer, S. Foch, A. Hecker, H. Hackstein, M. Witzenrath, N. Weissmann, W. Seeger, K. Mayer**, Resolvin E1 and its precursor 18R-HEPE restore mitochondrial function in inflammation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 1863 (2018) 1016–1028. doi:10.1016/J.BBALIP.2018.06.011.
123. **C.D. Russell, J. Schwarze**, The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease., *Immunology.* 141 (2014) 166–73. doi:10.1111/imm.12206.
124. **P.M. Kris-Etherton, C.N. Serhan, G.L. Jensen, K.R. Maddipati, C.K. Richter, I. Riley, P.C. Norris, A.C. Skulas-Ray**, Identification of specialized pro-resolving mediator clusters from healthy adults after intravenous low-dose endotoxin and omega-3 supplementation: a methodological validation, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–13. doi:10.1038/s41598-018-36679-4.

6.0 Anhang

6.1 Materialien

6.1.1 Chemikalien und Reagenzien

2-Propanol, zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Aqua ad iniectabilia (10ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Bacto™ Todd Hewitt Broth	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Yeast Extract, Technical	BD Biosciences (Heidelberg)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Bovines Serumalbumine	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Braunol®	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
BD FACS™ CellWash	BD Biosciences (Heidelberg)
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
Ethanol, absolut reinst	Merck (Darmstadt)
BD FACS™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
FCS (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Gene Expression Assay für LTB4R1	Applied Bio-systems (Foster City, CA, USA)
Gentamicin	Gibco (Carlsbad, CA, USA)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Etobicoke, ON, Canada)
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH (Trittau)
Hyaluronidase	Sigma Life Science (Taufkirchen)
HEPES	Biochrom (Berlin)
18R-HEPE	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
Ketamin 10 %	WDT (Garbsen)
Natriumchloridlösung, 0,9 % (10ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)

Natriumchloridlösung, isotonisch (100 ml)	Fresenius Kabi Deutschland (Bad Homburg)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco (Carlsbad, CA, USA)
PBS, Dulbecco with Ca & Mg	Biochrom AG (Berlin)
PBS, Dulbecco's without Ca & Mg (1X)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG (Berlin)
Protease-Inhibitor cOmplete™ Mini	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Rompun 2 % (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
RBC Lysis Puffer	Biolegend (San Diego, CA, USA)
RPMI 1640	Gibco (Carlsbad, CA, USA)
Saponin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen)
TaqMan® Assay on Demand für ChemR23	Metabion international AG (Planegg)
TaqMan® Gene Expression Assay für LTB4R1	Applied Bio-systems (Foster City, CA, USA)
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Bio-systems (Foster City, CA, USA)
Trypsin-EDTA	Gibco (Carlsbad, CA, USA)

6.1.2 Antikörper

goat anti-rabbit Sekundärantikörper	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
hamster anti-mouse CD3e, FITC conjugated	BD Biosciences (Heidelberg)
rabbit anti-mouse BLT1	LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, USA)
rabbit anti-mouse ChemR23	Cohesion Biosciences (London, UK)
rat anti-mouse CD45, PerCP conjugated	BD Biosciences (Heidelberg)
rat anti-mouse F4/80, APC conjugated	Caltag Laboratories (Carlsbad, CA, USA)

rat anti-mouse GR-1, PE conjugated	BD Biosciences (Heidelberg)
------------------------------------	-----------------------------

6.1.3 Geräte und Apparaturen

AB 7300-Real Time PCR	Fischer Scientific (Hampton, New Hampshire, USA)
Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & CO.KG (Lauda-Königshofen)
Bio-Plex™ Millipore	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex™ Workstation	BioRad Laboratories (München)
Brutschrank Heraeus Typ BB 6220 O2	Kendro Laboratory Products (Osterode)
FACS Calibur™ (Durchflusszytometer)	BD Biosciences (Heidelberg)
IKA®-Schüttler MTS 2	IKA®-Werke GmbH & CO.KG (Staufen)
Kühlschrank (4 °C)/Gefrierschrank (-80 °C)	Engmann Kühlsysteme GmbH (Mannheim)
Megafuge 1.0R (Heraeus)	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Mikroskop Axioskop 2 FS MOT (mit Axiocam und LSM 5 Pascal)	Carl Zeiss Jena GmbH (Jena)
Mikroskop Labolux 12 Typ: 020-435.025	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Photometer UvikonXS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Rektalsonde physitemp Model BAT-12	Physitemp Instruments, Inc. (Clifton, NJ, USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort	Integra Biosciences AG (Zizers, Schweiz)
Variomag® Elektronikrührer Mono	H+P Labortechnik (Oberschleissheim)
Vortex-Genie 2® Model G-560E	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
Waage Model CS 200	Ohaus Corporation (Parsippany, NJ, USA)
Zählkammer nach Neubauer	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BD Falcon Zellsieb (100µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon 5ml Polypropylene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
Columbia-Agarplatten mit 5% Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1µl)	Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden)
Falcon Blue Max (15ml, 50ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Falcon 24-Well-Plate, Tissue Culture Treated, Flat Bottom	Corning, Inc. (Corning, NY, USA)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Brüssel, Belgien)
Kanülen BD Microlance™ 3 (27G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kanülen BD Microlance™ (24G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Kapillarblutentnahmesystem (mit EDTA)	Kabe Labortechnik (Nümbrecht-Elsenroth)
Küvetten Nr. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf (Hamburg)
Petrischale	BD Biosciences (Heidelberg)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
ProcartaPlex-Kit	affymetrix eBioscience (San Diego, CA,USA)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5ml; 1,5ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotilabo®-Spritzenfilter, steril (0,45µm)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2ml/5ml/10ml/25ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

Spritzen BD Discardit™ II (2ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Plastipak™ (1ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellkulturflasche T75	BD Biosciences (Heidelberg)
Zellkulturflasche T175	BD Biosciences (Heidelberg)

6.2 Abkürzungsverzeichnis

18R-HEPE	18R-Hydroxyeicosapentaensäure
A. dest	Destilliertes Wasser
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
Akt	Proteinkinase
ALI	<i>Acute lung injury</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AoD	<i>Assay on Demand</i>
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BLT1	Leukotriene B4 Rezeptor 1
BSA	Bovines Serumalbumin
CAP	<i>Community acquired pneumonia</i>
CCSP	<i>Club cell secretory protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40 Ligand
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
ChemR23	Chemerin Rezeptor 23

CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> /chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	<i>Cycle Threshold</i>
DAB	Diaminobenzidin
DHA	Docosahexaensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	Dextran Natriumsulfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanat</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
Fw	<i>Forward</i>
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GR-1	<i>Granulocyte-differentiation antigen-1</i>
h	Stunde
HAP	<i>Hospital acquired pneumonia</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HMGB	<i>High-mobility-group-protein B</i>
IL	Interleukin
IFN- γ	Interferon- γ
KC	<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>
KbE	Koloniebildende Einheit
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LD	Letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien B4
LTB4R1	Leukotrien B4 Rezeptor 1
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony stimulating factor</i>
MIP	<i>Makrophage inflammatory protein</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
n.d.	Nicht detektierbar
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchenaktivierender Faktor

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCV7	<i>Pneumococcal conjugate vaccine 7</i>
PCV13	<i>Pneumococcal conjugate vaccine 13</i>
PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll proteins</i>
p.i.	<i>Post infectionem</i>
PMN	<i>Polymorphkerniger Granulozyt</i>
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
Rv	<i>Reverse</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RvE1	<i>Resolvin E1</i>
RvD1	<i>Resolvin D1</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SAPE	<i>Streptavidin-Phycoerythrin Conjugate</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SPM	<i>Specialized pro-resolving mediator</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
THY	<i>Todd-Hewitt broth plus 0.5% yeast extract</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
WT	Wildtyp
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol/l

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der ω-3-Fettsäuren EPA (Eicosapentaensäure).	17
Abbildung 2: Darstellung der Resolvin E1-Synthese aus Eicosapentaensäure (EPA).	19
Abbildung 3: Systematischer Versuchsablauf für die Versuchsteile 3.4 und 3.6	23
Abbildung 4: Immunhistologische Untersuchung der Expression des BLT1-Rezeptors in der murinen Lunge	45
Abbildung 5: Immunhistologische Untersuchung der Expression des ChemR23-Rezeptors in der murinen Lunge	47
Abbildung 6: Genexpression des murinen BLT1-Rezeptors und ChemR23-Rezeptors in der Lunge nach Infektion mit Pneumokokken	49
Abbildung 7: Bestimmung der Leukozytenzahlen und Differenzierung der Subpopulationen in der BAL-Flüssigkeit mittels Durchflusszytometrie	53
Abbildung 8: Bestimmung der Leukozytenzahlen und des Differentialzellbildes im Blut mittels Durchflusszytometrie	54
Abbildung 9: Analyse der Gesamtleukozytenzahl und des Differentialzellbildes in der BAL-Flüssigkeit mittels Durchflusszytometrie	59
Abbildung 10: Zytokinkonzentration in der BALF nach präventiver und therapeutischer Behandlung mit 18R-HEPE	61
Abbildung 11: Analyse der zellulären Immunantwort im Blut mittels Durchflusszytometrie	63
Abbildung 12: Quantitative Bestimmung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen nach Stimulation mit 18R-HEPE <i>in vitro</i>	65
Abbildung 13: Bakterienlast der BALF und des Blutes	66

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Studiendesign Versuchsteil 3.3	22
Tabelle 2: Studiendesign Versuchsteil 3.4 und 3.6	23
Tabelle 3: Handlungsanweisung zur klinischen Beurteilung von infizierten Tieren	28
Tabelle 4: Sequenzen des TaqMan Assay on Demands für ChemR23	40
Tabelle 5: Sequenzen des TaqMan Assay on Demands für GAPDH	40
Tabelle 6: Herstellung des Gesamtermixes pro Probenansatz	41
Tabelle 7: Körpermasse [%] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder S. pneumoniae	51
Tabelle 8: Körpertemperatur [°C] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder S. pneumoniae	52
Tabelle 9: Körpermasse [%] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder S.pneumoniae	57
Tabelle 10: Körpertemperatur [°C] im Verlauf nach transnasaler Infektion mit PBS oder S. pneumoniae	58

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Krause, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Experimentelle Untersuchung der Rolle des 18R-HEPE-Resolvin E1-ChemR23/BLT1 Signalwegs in der Pneumokokkenpneumonie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, den 30.09.2019

Philipp Martin Krause

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle den Personen meinen Dank aussprechen, die mich in all den Jahren, die diese Doktorarbeit nun doch beansprucht hat, begleitet und unterstützt haben. Die Durchführung und Verfassung einer Dissertation ist keine einfache Aufgabe und benötigt nicht nur die eigene Arbeit und Fleiß, sondern auch die Unterstützung und Hilfe anderer. Demnach ist sie viel mehr als eine Einzelleistung. Ich konnte mich glücklich schätzen, dass ich auf die Unterstützung vieler engagierter Menschen zählen konnte. Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp, dem Direktor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, für die Möglichkeit danken, in der Klinik forschen und arbeiten zu dürfen. Meinem Doktorvater und Leiter des Arbeitsbereichs „Pulmonale Inflammation“, Herrn Prof. Dr. Martin Witzernath, danke ich für das spannende Doktorarbeitsthema sowie die persönliche Förderung und das Vertrauen, das er mir entgegengebracht hat. Weiterhin danke ich Dr. Katrin Reppe für die sehr engagierte Betreuung, die Einarbeitung und Anleitung, das jederzeit offene Ohr bei Fragen und Problemen. Ich konnte immer auf ihre rat- und tatkräftige Unterstützung vertrauen. Dr. Sandra Wienhold danke ich für die Bereitstellung von Mauslungen. Für die tatkräftige Unterstützung beim Präparieren der Mäuse danke ich Denise Barthel und Maria Spelling. Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Konstantin Mayer und Dr. Juliane Ott (†) danke ich für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung der *Knockout*-Mäuse. Dr. Kristina Dietert und Dr. Corinne Gurtner danke ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte der Mauslungen. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Labore der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie am Campus Charité Mitte und Charité Campus Virchow-Klinikum für die produktive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in den Jahren mit aufmunternden und motivierenden Worten unterstützt haben.

Lebenslauf

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