

Aus dem Institut für Neuropathologie  
(Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Auswirkung von Glycopyrronium auf die  
Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* und  
*Escherichia coli* durch Makrophagen und  
Mikrogliazellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Elias Sándor Geisler**

aus  
Dortmund

Göttingen 2021

**Dekan:** Prof. Dr. med. W. Brück

**Referent:** Prof. Dr. med. R. Nau

**Ko-Referent:** Prof. Dr. med. H. Eiffert

**Drittreferentin:** Prof. Dr. med. M. Schön

**Datum der mündlichen Prüfung:** 10.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* durch Makrophagen und Mikrogliazellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, den .....

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Ribes S, Geisler ES, Seele J, Brück W und Nau R: Einfluss von Glycopyrronium auf das Wachstum von *Streptococcus pneumoniae* und auf die Phagozytose durch Makrophagen und Mikrogliazellen. Posterpräsentation im Rahmen des Novartis Research Day MS, Berlin, 25.01-26.01.2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Chronische obstruktive Lungenerkrankung und Infektionen als Komplikation.....	1
1.2 Bakterielle Erreger als Ursache für Infektionen bei Patienten mit COPD.....	3
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.2.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	4
1.2.3 Cholin-bindende Proteine als Virulenzfaktor .....	5
1.3 Glycopyrronium.....	7
1.3.1 Glycopyrronium als Inhibitor von Cholin-bindenden Proteinen .....	8
1.4 An der Immunabwehr beteiligte ortsständige Immunzellen.....	9
1.4.1 Alveolarmakrophagen.....	9
1.4.2 Peritonealmakrophagen .....	9
1.4.3 Mikrogliazellen.....	9
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	10
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>11</b>
2.1 Materialien .....	11
2.1.1 Geräte.....	11
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	12
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	13
2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen .....	14
2.1.5 Bakterielle Erreger .....	15
2.1.6 Lösungen zur Stimulation der Phagozytose.....	16
2.1.7 Mäuse.....	16
2.1.8 Software .....	17
2.2 Herstellung der <i>S.-pneumoniae</i> - und <i>E.-coli</i> -Inokula .....	17
2.3 Quantifizierung von <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i> .....	17
2.3.1 Bakterienkonzentrationen in Inokula und Suspensionen.....	17
2.3.2 Absolute Anzahl phagozytierter <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i> .....	19
2.4 Wachstumskurven.....	20
2.5 Präparation von murinen Makrophagen .....	20
2.5.1 Gewinnung von primären murinen Peritonealmakrophagen durch Peritoneallavage.....	20

2.5.2 Gewinnung von primären murinen Alveolarmakrophagen durch bronchoalveoläre Lavage .....	22
2.5.3 Primäre murine Mikrogliazellen .....	23
2.6 Auszählung und Ausplattierung der Makrophagen .....	24
2.7 Nitritnachweis mit Griess-Reagenz .....	24
2.8 WST-1-Zellviabilitätstest.....	25
2.9 Phagozytose-Assay .....	26
2.9.1 Vorbereitung der Zellen, Tag 1 .....	26
2.9.2 Stimulation der Zellen, Tag 2 .....	26
2.9.3 Phagozytose, Tag 3 .....	26
2.9.4 Auszählung der intrazellulären Bakterien und Berechnung der Phagozytoseleistung, Tag 4 .....	27
2.9.5 Kriterien zum Ausschluss von Phagozytoseversuchen und Einzelwerten.....	28
2.10 Zytologie .....	28
2.10.1 Methylenblau-Färbung.....	28
2.11 Statistik .....	30
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1 Wachstumskinetik von <i>S. pneumoniae</i> R6 und <i>E. coli</i> K1 in Trypticase-Soja-Bouillon .....	31
3.1.1 Inokulum für Glycopyrronium-Experimente von <i>S. pneumoniae</i> R6.....	31
3.1.2 Inokulum für Glycopyrronium-Experimente von <i>E. coli</i> K1 .....	32
3.2 Kein Einfluss von Glycopyrronium auf das Bakterienwachstum.....	32
3.2.1 Einfluss von Glycopyrronium auf das Pneumokokkenwachstum .....	32
3.2.2 Einfluss von Glycopyrronium auf das Wachstum von <i>E. coli</i> K1 .....	33
3.3 Beeinflussung der Stickstofffreisetzung und Zellviabilität durch Glycopyrronium..	34
3.3.1 NO-Freisetzung bei Peritonealmakrophagen.....	34
3.3.2 NO-Freisetzung bei Alveolarmakrophagen .....	35
3.4 Einfluss der Inkubation von Bakterien mit Glycopyrronium während ihres Wachstums auf die Phagozytoseleistung der Makrophagen.....	36
3.4.1 Festlegen der Bedingungen für die Phagozytose .....	36
3.4.2 Phagozytoseleistung bei Ko-Inkubation von Makrophagen und Mikroglia mit <i>S. pneumoniae</i> R6 unter dem Einfluss von Glycopyrronium .....	38
3.4.3 Phagozytoseleistung bei Ko-Inkubation von Makrophagen mit <i>E. coli</i> K1 unter dem Einfluss von Glycopyrronium.....	43
3.4.4 Vergleich <i>S. pneumoniae</i> R6 vs. <i>E. coli</i> K1.....	50
3.5 Einfluss von Glycopyrronium auf die Morphologie der Bakterien .....	52
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>54</b>

4.1 Auswahl von Glycopyrronium und dessen Konzentration .....	55
4.2 Diskussion der Methode .....	56
4.2.1 Bakterien .....	56
4.2.2 Bestimmung der Bakterienkonzentration .....	56
4.2.3 Gewinnung von Makrophagen.....	57
4.3 Auswirkung von Glycopyrronium auf das Wachstum von <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i> sowie die Morphologie der Bakterien.....	58
4.4 Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose von Makrophagen und Mikrogliazellen .....	59
4.4.1 Auswirkung der Phagozytosedauer und Anzahl der Makrophagen/Well auf die Phagozytose .....	59
4.4.2 Keine Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose .....	60
4.5 Ausblick .....	62
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>65</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>AM</b>	Alveolarmakrophage
<b>BAL</b>	Bronchoalveoläre Lavage
<b>BetT</b>	Betain-Transporter
<b>BOLD</b>	<i>Burden of Obstructive Lung Disease</i>
<b>CBP</b>	<i>choline-binding protein</i> , Cholin-bindendes Protein
<b>CbpA</b>	<i>choline-binding protein A</i> , Cholin-bindendes Protein A
<b>CFU</b>	<i>colony forming unit</i> , koloniebildende Einheit
<b>CpG</b>	Cytosin-Phosphat-Guanin, TLR-9-Agonist
<b>COPD</b>	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> , chronisch obstruktive Lungenerkrankung
<b>C57BL/6J</b>	Schwarze Labormaus vom Wildtyp-Stamm
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
<b>FELASA</b>	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
<b>FEV<sub>1</sub></b>	<i>Forced Expiratory Volume in 1 Second</i> , Einsekundenkapazität
<b>GLOW</b>	<i>GLycopyrroonium bromide in COPD airWays clinical study</i>
<b>Gly</b>	Glycopyrronium
<b>HIV</b>	Humane Immundefizienz-Virus
<b>IE</b>	Internationale Einheit

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>LAMA</b>	<i>long-acting muscarinic antagonist</i> , langwirksamer Muskarin-Antagonist
<b>LPM</b>	<i>large peritoneal macrophage</i> , großer Peritonealmakrophage
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid, TLR-4-Agonist
<b>LTA</b>	<i>lipoteichoic acid</i> , Lipoteichonsäure
<b>LytA</b>	N-acetyl-muramoyl-L-alanine-Amidase
<b>LytB</b>	Acetyl-Glucosamidase
<b>P3C</b>	Pam3CSK4, TLR-1/2-Agonist
<b>P/S</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
<b>PCho</b>	<i>Phosphorylcholine</i> , Phosphorylcholin
<b>PM</b>	Peritonealmakrophage
<b>PspA</b>	<i>Pneumococcal surface protein A</i> , Pneumokokken-Oberflächen-Protein A
<b>RKI</b>	Robert Koch-Institut
<b>SPM</b>	<i>small peritoneal macrophage</i> , kleiner Peritonealmakrophage
<b><i>S. pneumoniae</i></b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>STIKO</b>	Ständige Impfkommission
<b>TA</b>	<i>teichoic acid</i> , Teichonsäure
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TSB</b>	Trypticase-Soja-Bouillon

<b>WST-1</b>	<i>Water Soluble Tetrazolium</i> , wasserlösliches Tetrazoliumsalz
<b>ZNS</b>	Zentrale Nervensystem
<b>ZTE</b>	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung

# 1. Einleitung

## 1.1 Chronische obstruktive Lungenerkrankung und Infektionen als Komplikation

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist die weltweit dritthäufigste Todesursache (WHO 2018). Die weltweite Prävalenz der COPD bei Personen älter als 40 Jahre ist in der *Burden-of-Obstructive-Lung-Disease-Studie* (BOLD Studie) bestimmt worden. Sie beträgt gesamt 10,1%, 11,8% für Männer und 8,5% für Frauen (Buist et al. 2007). Die Prävalenz ist mit dem Alter zunehmend, Patienten älter als 65 Jahre haben eine kumulative Prävalenz von 14,2% vs. 8,2% in der Altersgruppe 40-64 Jahre (Halbert et al. 2006).

Das *Journal of Health Monitoring* verzeichnet für Deutschland in den Jahren 2014 und 2015 eine Prävalenz von 5,8% gesamt, 5,8% für Frauen und 5,7% für Männer (Steppuhn et al. 2017). Auch hier zeigt sich eine Verdopplung der Prävalenz im Alter (älter als 65 Jahre), 11,0% vs. 5,1% in der Altersgruppe 45-64 Jahre. In Deutschland waren 2010 schätzungsweise 6,8 Millionen Menschen an COPD erkrankt, bis 2030 wird mit einem Anstieg auf 7,9 Millionen gerechnet (Stoll 2018).

Auch bei immunkompromittierten Patienten mit COPD ist eine erhöhte Prävalenz zu verzeichnen. Bigna et al. (2018) beschrieben diesen Zusammenhang für Patienten mit humaner Immundefizienz-Virus-Infektion (HIV), hier war die Prävalenz von COPD signifikant höher als bei HIV-negativen Patienten.

Die häufigste Komplikation bei Patienten mit COPD ist eine Infektion. Durch die Exposition von Tabakrauch und anderen schädlichen Noxen werden die angeborenen Abwehrmechanismen der Lunge gestört. Bei diesen Patienten wird die Lunge anfällig für wiederholt akute Infektionen der Atemwegschleimhaut mit Viren und bakteriellen Krankheitserregern. Dadurch entstehen Episoden erhöhter Entzündung und progredienter Symptomatik. Diese Episoden werden als Exazerbation einer COPD bezeichnet und stellen somit wichtige Ereignisse im Verlauf der Krankheit dar, die tiefgreifende Auswirkung auf den Gesundheitszustand und die Lungenfunktion der Patienten haben (Donaldson und Wedzicha 2006; Sethi 2010). Für etwa die Hälfte aller Exazerbationen sind Bakterien verantwortlich (Sethi und Murphy 2001). Die Anzahl der Exazerbationen pro Jahr spiegelt sich in der Einteilung des Schweregrades wider. Schon bei zwei ambulant (mittelschwer)

behandelten Exazerbationen oder einer stationär (schwer) behandelten Exazerbation pro Jahr liegt unabhängig von der klinischen Symptomatik eine Einteilung in die stärker gefährdete Patientengruppe vor (Vogelmeier et al. 2018). In einer großen multinationalen Umfrage in Europa, dem Vereinigten Königreich und den USA gaben 89% der Patienten an, im vergangenen Jahr mindestens eine Exazerbation erlitten zu haben. Von diesen waren 89% in einer ambulanten Praxis vorstellig, 21% hiervon mussten ins Krankenhaus eingeliefert werden (Miravittles et al. 2007).

Die stationäre Behandlung sieht neben der Sauerstoff-Therapie mit einer Ziel-Sauerstoffsättigung im Blut von 88-92% eine Therapie mit Antibiotika, Bronchodilatoren wie Glycopyrronium (Gly) und in schweren Fällen systemischen Kortikosteroiden vor. Bei zunehmenden Antibiotikaresistenzen ist die kritische Prüfung der Notwendigkeit einer Antibiotikabehandlung entscheidend. Klinische Symptome wie zunehmende Dyspnoe unter vermehrtem putriden Sputum weisen auf eine wahrscheinliche bakterielle Infektion hin. Dann ist eine gezielte antibiotische Therapie im Hinblick auf das erhöhte Risiko für kurzfristige Mortalität und Behandlungsversagen obligatorisch (Halpin et al. 2017; Viniol und Vogelmeier 2018).

In England betrug der mittlere Krankenhausaufenthalt für COPD mit akuter unterer Atemwegsinfektion von 1998 bis 2003 zehn Tage. In diesem Zeitraum alleine stiegen die COPD-Aufnahmen um 13,1%, die Mortalität lag zwischen 11 und 26% (Donaldson und Wedzicha 2006). In den USA beschrieben Connors et al. (1996) eine Mortalität von 11% während des Krankenhausaufenthaltes. Auffällig war eine erhebliche Steigerung der Mortalität nach Krankenhausaufenthalt, 20% nach zwei Monaten, 33% nach sechs Monaten, 43% nach einem Jahr und fast 50% nach zwei Jahren. Garcia-Aymerich et al. (2011) bestätigten in einem 10-Jahres Follow-up mit 20.000 Patienten das erhöhte Risiko einer späteren Mortalität bei Krankenhausaufenthalt aufgrund COPD. Der Schweregrad der COPD war mit einer höheren Rate schwerer Exazerbationen, die einen Krankenhausaufenthalt erforderten, verbunden.

Zusammenfassend benötigt etwa jeder fünfte Patient innerhalb eines Jahres einen stationären Aufenthalt zur Therapie einer Exazerbation der COPD. Dieser besorgniserregende Zustand vor dem Hintergrund der steigenden Mortalität nach Krankenhausaufenthalt legt neue wichtige Therapien zur Reduktion der Exazerbationen nahe.

## 1.2 Bakterielle Erreger als Ursache für Infektionen bei Patienten mit COPD

### 1.2.1 *Escherichia coli*

Das Gram-negative Stäbchen-Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist einer der häufigsten Erreger bakterieller Infektionen und somit wahrscheinlich die bekannteste Bakterienart. Zu den typischen extraintestinalen Infektionen gehören Harnwegsinfektionen und intraabdominelle Infektionen. Pathogene Stämme von *E. coli* verursachen lebensbedrohliche Infektionen wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis (Gransden et al. 1990; Russo und Johnson 2000). In einer amerikanischen multizentrischen Kohortenstudie mit 13.000 Patienten zur ambulant erworbenen Pneumonie war *E. coli* mit ca. 10% als Erreger zu finden. Eine begleitende Sepsis entwickelte sich in 70% dieser Fälle (John et al. 2018). Sepsis und Meningitis sind mit einer hohen Mortalität in den schon erwähnten Risikogruppen Kinder, Ältere und Immunkompromittierte vergesellschaftet (Russo und Johnson 2003). Die Krankenhausletalität lag für die *E.-coli*-Pneumonie mit 15% doppelt so hoch im Vergleich zu einer Pneumokokken-Pneumonie (7,4%) (John et al. 2018). Es entstehen hohe Gesundheitskosten, vor allem in dem Bereich der antimikrobiellen Therapie bei wachsender Antibiotikaresistenz und damit dem verstärkten Einsatz von teuren Reserveantibiotika (Russo und Johnson 2003). *E. coli* wird weiter von Russo und Johnson als ein stark zunehmendes endemisches Problem beschrieben.

Die Serotypen unterscheiden sich in ihrem Oberflächen-Antigen-Profil. Es existieren O-Antigene (Oligosaccharidanteile der Lipopolysaccharide der Zellmembran), H-Antigene (Flagellen) und K-Antigene (Kapsel). Derzeit sind über 180 O-, 60 H-, und 80 K-Antigene bekannt (Stenutz et al. 2006).

Bislang gibt es keine effektive Impfung gegen pathogene *E. coli*, was unter der Zunahme von multiresistenten und hypervirulenten Stämmen den Druck, neue Therapieansätze zu entwickeln, erhöht (Nesta und Pizza 2018). Nur zur Vorbeugung von Harnwegsinfektionen durch *E. coli* existiert es eine Impfung (Bauer und Bessler 2016).

### 1.2.2 *Streptococcus pneumoniae*

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) verursacht lebensbedrohliche Infektionen wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis (Cartwright 2002; Rodrigo und Lim 2014). Es ist der häufigste Erreger bakterieller Pneumonien und Meningitiden beim Erwachsenen (Carapetis et al. 2005). Unter den akut exazerbierten COPD-Patienten lässt sich *S. pneumoniae* in bis zu 15% aller Bakterien nachweisen (Sethi und Murphy 2008). Chen et al. (2018) untersuchten in einem Zeitraum von 1998 bis 2010 insgesamt ca. 91.000 Patienten mit COPD und unterteilten diese in eine Sepsis- und Nicht-Sepsis-Kohorte. Insgesamt 16% aller Patienten entwickelten eine Sepsis. In der Nicht-Sepsis-Kohorte traten Pneumonien zu 15% auf. Hingegen wurden bei der Sepsis-Kohorte in 55% der Fälle Pneumonien diagnostiziert. 80% der Patienten ohne Sepsis zeigten keine schweren Exazerbationen. Jedoch hatten 90% der septischen Patienten mindestens eine oder mehr schwere Exazerbationen. Die Letalität lag bei 14% in der Nicht-Sepsis- vs. 60% in der Sepsis-Kohorte und war damit mehr als viermal so hoch.

Bislang sind über 90 Serotypen bekannt. Diese unterscheiden sich hauptsächlich in der Zusammensetzung der Polysaccharide ihrer Kapsel (Calix et al. 2012).

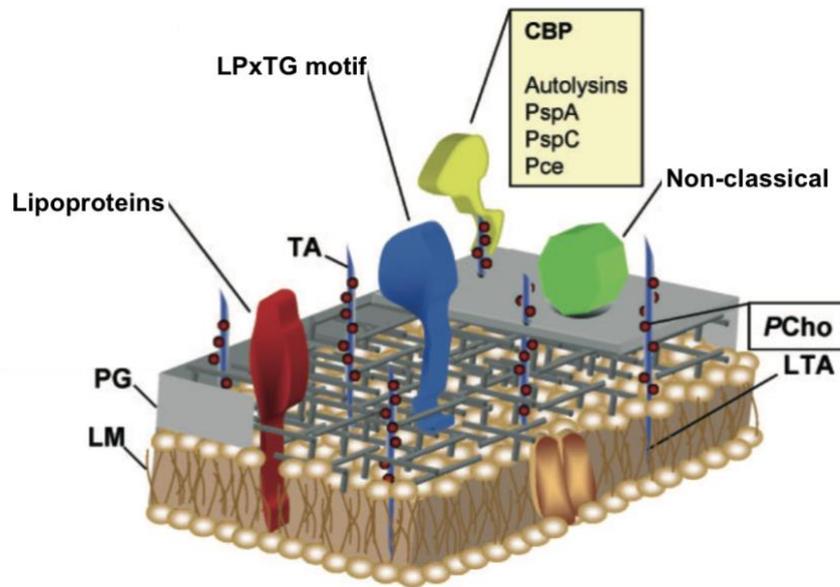
Einer der wichtigsten Faktoren für die Inzidenz der Erkrankungen ist das Alter der Patienten. Kleinkinder, Ältere und Patienten mit Immundefizienz sind einem besonders hohen Risiko ausgesetzt, an Pneumokokken-Infektionen zu erkranken (ACIP 1997). Die Ständige Impfkommission (STIKO) des Robert Koch-Institutes (RKI) empfiehlt aus diesem Grund eine Impfung gegen Pneumokokken für Säuglinge ab zwei Monaten, für Erwachsene ab 60 Jahren und für Patienten mit Immundefizienz (STIKO 2019). Die Grundimmunisierung für reifgeborene Säuglingen soll laut RKI mit drei Impfdosen des 13-valenten Konjugat-Impfstoffs erfolgen und ist damit regulär bis zum 14. Monat abgeschlossen. Bei über 60-jährigen wird nur eine einmalige Impfung mit dem 23-valenten Polysaccharid-Impfstoff empfohlen (STIKO 2019). Eine zwar eher seltene, aber besonders gefährdete Gruppe, sind Patienten nach Splenektomie. Bei dieser Patientengruppe kann ein *overwhelming postsplenectomy infection syndrom* (OPSI-Syndrom) entstehen, dabei ist *S. pneumoniae* mit bis zu 70% der häufigste Erreger dieser fulminanten Sepsis (Kribben et al. 1995). Es liegt wie bei allen Patienten mit Immundefekt bzw. Immunsuppression eine Impfempfehlung vor. Maßgebend ist hier, die Impfung möglichst vor der Splenektomie durchzuführen (STIKO 2019). Cornu et al. (2001) wiesen in einer Metaanalyse von fast 49.000 immungesunden Personen eine Effektivität der Impfung zur Verhinderung von mikrobiologisch gesicherten Pneumokokken-Pneumonien in Höhe von 71% nach. Die Effektivität der Impfung zur

Verhinderung von vermuteten Pneumokokken-Pneumonien lag noch bei 41%. Weiter ergab sich eine signifikante Reduktion der Letalität der Pneumonien um 27% (Cornu et al. 2001). Bei Patienten mit COPD konnte durch die Pneumokokken-Impfung in den USA die Hospitalisierungsrate um 43% und die Gesamtmortalität um 29% gesenkt werden (Nichol et al. 1999).

Da dieser Impfschutz nur für eine begrenzte Anzahl von Serotypen gilt, nimmt die Verbreitung von antibiotika- und multiresistenten Pneumokokken-Stämmen trotz der Durchführung von Impfungen zu (Ip et al. 2001; Kim et al. 2016; Briles et al. 2019). Durch die weltweit steigende Lebenserwartung der Bevölkerung vergrößert sich die Risikogruppe der über 60-jährigen. Neue Therapien zur Bekämpfung von Pneumokokken-Infektionen sind zwangsläufig erforderlich.

### **1.2.3 Cholin-bindende Proteine als Virulenzfaktor**

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass bei Pneumokokken nicht nur die Kapsel einen Virulenzfaktor darstellt, sondern noch weitere Faktoren eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Bakterien spielen. Hierzu gehören die Cholin-bindenden Proteine (CBPs) auf der Zellwand der Pneumokokken, da sie die Adhäsion an Wirtszellen vermitteln (Yother und White 1994). Mittlerweile sind zahlreiche CBPs wie z. B. Pneumokokken-Oberflächen-Protein A (PspA), N-acetyl-muramoyl-L-alanine-Amidase (Autolysin LytA), Acetyl-Glucosamidase (LytB) und Cholin-bindendes Protein A (CbpA) bekannt (Rosenow et al. 1997; Hammerschmidt et al. 1999; Bergmann und Hammerschmidt 2006). Die Hydrolase LytA wurde als erstes CBP 1986 beschrieben (García et al. 1986). Diese in allen klinisch wichtigen Stämmen gefundenen Proteine erschweren unter anderem die Phagozytose von *S. pneumoniae* (Crain et al. 1990). Sie müssen Cholin binden, um wirken zu können. Die CBPs sind über nichtkovalente Bindung an Phosphorylcholin (PCho), welches in den Teichonsäuren (TAs) und Lipoteichonsäuren (LTAs) der Zellwand von *S. pneumoniae* vorkommt, verankert (siehe Abbildung 1-1) (Bergmann und Hammerschmidt 2006). Gehre et al. haben 2009 veröffentlicht, dass bei genetisch mutierten Cholin-freien Pneumokokken-Stämmen im Mausmodell eine Avirulenz vorliegt.



**Abbildung 1-1** Schematische Darstellung der äußeren Zellwand und deren Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*. Die Zellwand besteht aus einer Phospholipidmembran (LM), Teichonsäuren (TAs), Lipoteichonsäuren (LTAs) und Peptidoglykan (PG). Ein ungewöhnlicher Bestandteil der Zellwand ist Phosphorylcholin (PCho), welches die Cholin-bindenden Proteine (CBPs) auf der Zellwand verankert (modifiziert entnommen aus Bergmann und Hammerschmidt 2006, S. 296). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Microbiology Society.

Die Autolyse und Zellseparation am Ende der Zellteilung sind Mechanismen zum Trennen der einzelnen Pneumokokken voneinander. Verantwortlich hierfür sind die CBPs LytA und LytB (García et al. 1999). Bei mutierten Pneumokokken-Stämme mit LytA-Gen-Deletion bilden sich kurze Pneumokokken-Ketten aus (sechs bis zehn Zellen) (Sanchez-Puelles et al. 1986). Wird eine LytB-Mutation in diese LytA mutierten Stämme eingeführt, werden deutlich längere Pneumokokken-Ketten (von über 100 Zellen) beobachtet (García et al. 1999).

Die Inhibition der Autolyse und Zellseparation, resultierend durch ein Ablösen der CBPs von der Zellwand, ist durch Cholin-Analoga deutlich potenter als der Überschuss an freiem Cholin (Hernández-Rocamora et al. 2009).

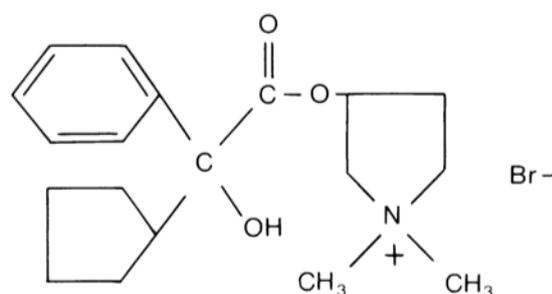
Das nur gering erforschte Spektrum der CBPs bei *E. coli* ist vermutlich durch eine indirekte Inhibition bedingt. Eines der Strukturgene des Betain-Signalweges (Bet), das Gen betT, kodiert einen spezifischen Cholin-Transporter (BetT) an der Zellwand, der hierbei eine zentrale Rolle spielt. Über diesen entsteht die Synthese von Glycin-Betain (Landfald und Strøm 1986), welches primär verantwortlich für die Osmoprotektion der Bakterien ist (Lamark et al. 1996). Die Zelle ist durch diesen Mechanismus vor Umwelteinflüssen und damit der Destabilisierung der Proteine geschützt (Tøndervik und Strøm 2007). Cholin-Analoga schränken die Funktion des Bet-Transporters auf der Zellwand ein, sodass eine

verminderte Synthese von Glycin-Betain resultiert. Die schützende Funktion wird dadurch verringert und so die Möglichkeit der Phagozytose durch Makrophagen erhöht (Tøndervik und Strøm 2007; Stadtmiller et al. 2017).

Zusammenfassend bieten CBPs, die durch Cholin-Analoga gezielt inhibiert werden können, sowohl bei *S. pneumoniae*, als auch bei *E. coli* ein neues therapeutisches Ziel zur Bekämpfung dieser Bakterien und den damit verursachten Infektionen.

### 1.3 Glycopyrronium

Glycopyrronium, eine quartäre Ammoniumverbindung (Strukturformel siehe Abbildung 1-2), ist ein potentes Anticholinergikum, welches 1960 von Franko und Lunsford entdeckt wurde (Mirakhur et al. 1978). Die intravenöse und intramuskuläre Applikation ist bereits seit 1976 als Robinul® (RIEMSER Pharma GmbH, Greifswald/Insel Riems, DE) auf dem Markt. Hier wird es in der Anästhesiologie präoperativ vor allem zur Verminderung der Speichel- und Trachealsekretion wie auch der Magensäurenproduktion verwendet (Mirakhur et al. 1978; Ali-Melkkilä et al. 1993) . Unter anderem blockiert es den vagalen Verzögerungsreflex auf das Herz während der Narkoseeinleitung und Intubation (Australian Public Assessment Report for Glycopyrronium 2013; Rote Liste® online 2019). Zudem wird es neuerdings zur Therapie der Hyperhidrosis eingesetzt (Nwannunu et al. 2019).



**Abbildung 1-2** Strukturformel von Glycopyrroniumbromid (entnommen aus Mirakhur et al. 1978, S.78).

Im klinischen Alltag findet es als Glycopyrroniumbromid inhalativ seit November 2012 Anwendung zur bronchodilatatorischen Dauerbehandlung der COPD (z. B. Seebri® Breezhaler® 44 µg, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, DE). Es weist einen schnellen Wirkungseintritt, eine anhaltende 24-Stunden-Bronchodilatation und eine Verbesserung der

Belastungstoleranz auf (Ulrik 2012). Als langwirksamer Antagonist an muskarinischen Rezeptoren (LAMA) wird die bronchokonstriktive Wirkung von Acetylcholin auf die glatte Muskulatur der Atemwege blockiert. Diese Bronchodilatation führt zu einer erheblichen Verbesserung der Lungenfunktion bei Patienten mit einer COPD, die mit mehreren Lungenfunktionsparametern wie z. B. der Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>) bestimmt werden kann (Vogelmeier und Banerji 2011; Beeh et al. 2012). Durch die langanhaltende Wirkung ist eine tägliche Einmaldosis im Unterschied zu anderen Substanzen aus dieser Wirkstoffgruppe ausreichend (Ulrik 2012). Jedoch bleiben Infektionen der Atemwege nicht gänzlich aus. Ursächlich für die meisten Exazerbationen einer COPD sind virale oder bakterielle Infektionen. Etwa die Hälfte aller Exazerbationen machen bakterielle Infektionen aus. In 10-15% aller Exazerbationen ist *S. pneumoniae* nachweisbar (Sethi und Murphy 2008). Unter inhalativer Gabe von Glycopyrronium reduzierte sich die Anzahl der Exazerbationen signifikant um 31% in der *Glycopyrronium bromide in COPD airWays clinical study 1* (GLOW 1) (d'Urzo et al. 2011) und um 34% in der GLOW 2 Studie (Kerwin et al. 2012). Wissenswert ist hier sicherlich die genaue Wirkungsweise von Glycopyrronium bei der Bekämpfung von Infektionen.

### **1.3.1 Glycopyrronium als Inhibitor von Cholin-bindenden Proteinen**

In einigen Studien konnte dargelegt werden, dass die Inhibition von CBPs mittels Cholin-Analoga sowohl das Zellwachstum hemmt als auch die Zellviabilität verringert (Maestro et al. 2007; Ribes et al. 2013). Maestro et al. (2007) wiesen eine höhere Bindungsaffinität an CBPs von Ipratropium und Atropin gegenüber Cholin nach. Für die alleinige Gabe von Cholin steht das nebenwirkungsreiche Spektrum dieser Substanz in den erforderlichen hohen Konzentrationen durch Interaktion mit den muskarinischen Rezeptoren dem Nutzen gegenüber (Hernández-Rocamora et al. 2009). Diese Interaktion würde dann eine parasymphomimetische Wirkung haben, z. B. eine Bradykardie oder Bronchokonstriktion mit vermehrter Schleimsekretion auslösen. Ribes et al. (2013) arbeiteten mit Ipratropium- und Cholin-funktionalisierten Dendrimeren, letztere sorgten signifikant für eine gesteigerte Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen bei *S. pneumoniae*. Da neben Ipratropium auch Glycopyrronium routinemäßig zur bronchodilatatorischen Dauerbehandlung der COPD zum Einsatz kommt, soll in dieser Arbeit der Einfluss von Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung von *S. pneumoniae* und *E. coli* durch Makrophagen und Mikrogliazellen untersucht werden.

## 1.4 An der Immunabwehr beteiligte ortsständige Immunzellen

### 1.4.1 Alveolarmakrophagen

Alveolarmakrophagen (AMs) befinden sich auf der Oberfläche der Alveolen und stellen somit die erste Schutzbarriere zur Abwehr von Mikroorganismen dar, die nicht über die mukoziliäre Clearance beseitigt wurden. So phagozytieren sie unter anderem Staubpartikeln und Allergene (Bowden 1984; Zhang et al. 2008). Außerdem sezernieren sie proinflammatorische und immunsuppressive Zytokine, sodass z. B. neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, um die Abwehr zu stärken (Vlahos und Bozinovski 2014). Diese Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten aus dem Knochenmark, von wo sie über die Blutgefäße zu den Alveolen migrieren (Bowden 1984).

### 1.4.2 Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen (PMs) gehören zu den an meisten erforschten Makrophagen in Bezug auf Entwicklung, Zellbiologie und Entzündungsreaktion (Zhang et al. 2008; Davies et al. 2011). In der Peritonealhöhle gibt es zwei verschiedene Untergruppen der Makrophagen. Zum einen existieren die sogenannten großen PMs (LPMs), welche zur Selbsterneuerung unabhängig von der Hämatopoese befähigt zu sein scheinen (Yona et al. 2013; Cassado et al. 2015). Zum anderen existieren die kleinen PMs (SMPs), welche sich aus zirkulierenden Monozyten aus dem Knochenmark differenzieren (Ghosn et al. 2010; Cassado et al. 2015). Die Peritonealhöhle enthält ungefähr 90% LPMs in unstimulierten Mäusen. Nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) überwiegt der Anteil an SMPs. Ghosn et al. konnten hier Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* darstellen: *In vitro* stimuliert LPS nur die LPMs, *in vivo* zeigen jedoch beide Untergruppen eine Phagozytoseaktivität und eine Produktion von Stickstoffmonoxid (Ghosn et al. 2010).

### 1.4.3 Mikrogliazellen

Die erstmals von del Rio-Hortega (1932) entdeckten und beschriebenen Mikrogliazellen sind die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS) (Kettenmann et al. 2011). Als Immunzellen erkennen sie pathogene Erreger oder einer Gewebsschädigung im ZNS, welches durch die Blut-Hirn-Schranke aktiv geschützt ist (Daneman 2012). Primitive Makrophagen mit mesodermalem Ursprung aus dem extraembryonalen Dottersack kolonisieren das Neuroepithel und differenzieren zu Mikrogliazellen (Takahashi et al. 1989). Zudem werden Monozyten aus dem Blut vor allem im adulten Nervensystem unter

inflammatorischen Konditionen ins ZNS rekrutiert und differenzieren dort zu Mikroglia-ähnlichen Zellen. Ob diese Zellen bestehen bleiben und integriert werden oder nur vorübergehend eine Ergänzung der endogenen Population darstellen, ist bislang ungeklärt (Ginhoux et al. 2013).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Patienten mit COPD haben beeinträchtigte Abwehrmechanismen der Lunge, um Mikroorganismen suffizient zu bekämpfen. Akute und chronische Infektionen der unteren Atemwege stellen so signifikante Komorbiditäten bei COPD-Patienten dar (Sethi 2010). Die Verbreitung von multiresistenten Erregern nimmt trotz Durchführung von Impfungen zu, da nur gegen eine begrenzte Anzahl an z. B. Pneumokokken-Serotypen ein Impfschutz hervorgerufen werden kann (Cartwright 2002; Kim et al. 2016; El Moujaber et al. 2017; Sallam et al. 2019).

Synthetische Strukturen, die Cholinendgruppen enthalten und CBPs inhibieren, wurden bereits erfolgreich eingesetzt, um eine erhöhte Phagozytose von Pneumokokken durch ein modifiziertes Bakterienwachstum zu erzielen (Ribes et al. 2013). Da CBPs von sämtlichen Pneumokokken-Serotypen gebildet werden, stellen sie ein therapeutisches Ziel zur Bekämpfung von Pneumokokken-Infektionen dar (Maestro et al. 2007).

In dieser Arbeit wurde die Wirkung von Glycopyrronium auf das Wachstum und die Phagozytose von *S. pneumoniae* und *E. coli* untersucht. Unsere Hypothese war, dass durch die Inkubation von *S. pneumoniae* und *E. coli* mit Glycopyrronium die Internalisierung und intrazelluläre Abtötung von Bakterien durch Makrophagen und Mikrogliazellen erhöht werden kann.

Hierzu wurde der bewährte Phagozytose-Assay muriner Mikrogliazellen (Ribes et al. 2009) auf Peritoneal- und Alveolarmakrophagen übertragen und für *S. pneumoniae* und *E. coli* etabliert.

Im Hinblick auf die Behandlung von Patienten mit einer COPD sollte also nicht nur indirekt durch eine verbesserte Lungenfunktion die Anzahl der Infektionen reduziert werden, sondern Glycopyrronium hätte möglicherweise direkt Auswirkung auf die Phagozytose mit einer erhöhten Phagozytoserate.

## 2. Material und Methoden

Die Länderangaben sind nach ISO 3166-1 kodiert.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Absaugsystem VACUSAFE comfort	Integra Biosciences (Fernwald, DE)
Brutschrank Heraeus B12	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
ELISA-Reader Rainbow Spectra	Tecan Deutschland (Crailsheim, DE)
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERAsafe HS (Sterilbank)	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Mikroskop BX51	Olympus (Tokio, JP)
Mikroskop IMT-2	Olympus (Tokio, JP)
Mikroskop-Kamera DP71	Olympus (Tokio, JP)
Neubauer-Zählkammer	LO Laboroptik (Lancing, GB)
Pipetten Eppendorf Research® 0,5- 1000µl	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Pipettierhelfer accu-jet® pro	Brand (Wertheim, DE)
Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten)	Hermle Labortechnik (Wehingen, DE)
Präzisionswaage Sartorius excellence E 12000 S	Sartorius (Göttingen, DE)
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
Sicherheits-Bunsenbrenner schütt flammy L	Schuett-biotec (Göttingen, DE)
Tischautoklav DX-23	Systec (Wettenberg, DE)
Wasserbad 1004 (21 l)	GFL Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, DE)
Zentrifuge Centrifuge 5804/5417 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific (Langenselbold, DE)
Zoom-Stereomikroskop SZ61	Olympus (Tokio, JP)

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Gewebekulturplatten (mit F-Boden)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Columbia-Blutagarplatten mit 5% Schafblut	bioMérieux Deutschland (Nürtingen, DE)
Deckgläser quadratisch 18x18 mm, 0,13 mm dick	Gerhard Menzel (Braunschweig, DE)
Einmalskalpelle	Dahlhausen (Köln, DE)
Einmalrasierer, einschneidig	Wilkinson Sword (Solingen, DE)
Injektionsnadeln	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Insulinspritzen BD Plastipak™ (1 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Nahtmaterial Ethilon™ 2-0	Ethicon (Norderstedt, DE)
Objektträger 3x1 Zoll, geputzt/gebrauchsfertig	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- gesellschaft (Braunschweig, DE)
Parafilm® M	Brand (Wertheim, DE)
Pasteurpipetten aus Glas (145 mm)	Brand (Wertheim, DE)
Petrischalen 35 x 10 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, DE)
Pipettenspitzen (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Reagiergefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Röhrchen (50 ml, 15 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Schraubbecher 100 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Serologische Pipette (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Spritzen BD Discardit™ mit Luer-Ansatz (20 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Vasofix® Braunüle® 1,10 x 33 mm G20 rosa, FEP	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
BBL™ Trypticase™ Soy Broth Pulver	Becton Dickinson (Heidelberg, DE)
Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) (3 mg/ml)	CpG Oligodesoxynukleotide 1668 TIB Molbiol (Berlin, DE)
DePeX Einbettmedium für Histologie	Serva Electrophoresis (Heidelberg, DE)
DMEM, High Glucose, GlutaMAX™-I (4,5 g/l Glukose, ohne Pyruvat)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Essigsäure	Merck (Darmstadt, DE)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Gentamicin-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Glycopyrroniumbromid 5mg	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Isotone Natriumchloridlösung 0,9%	B. Braun Melsungen (Melsungen, DE)
Interferon- $\gamma$ (100 U/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Ketamin 10% (100 mg/ml)	CP-Pharma (Burgdorf, DE)
Löfflers Methylenblaulösung	Merck (Darmstadt, DE)
Lipopolysaccharid (LPS) (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
N-Naphthyl-ethylendiamin	Merck (Darmstadt, DE)
Natriumnitrit	Merck (Darmstadt, DE)
Pam3CSK4 (P3C) (1 mg/ml)	EMC Microcollections (Tübingen, DE)
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Penicillin-Streptomycin (10 000 IE/ml)	Gibco (Paisley, Schottland, GB)
Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin)	
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie (München, DE)
Xylazin 2% (20 mg/ml)	Ceva Tiergesundheit GmbH (Düsseldorf, DE)
Wasserlösliches Tetrazoliumsals (WST-1)	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)

## 2.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

### 2.1.4.1 Medium für die murinen Makrophagen

Zur Herstellung des Mediums wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) unter sterilen Bedingungen mit 10% Hitze-inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (P/S; 10 000 IE/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) versetzt. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert.

### 2.1.4.2 Medium für die murinen Makrophagen während der Phagozytose

Die Herstellung und Lagerung erfolgten wie unter 2.1.4.1 beschrieben, es wurde hingegen kein P/S zugesetzt.

### 2.1.4.3 Medium für die murinen Makrophagen während des Nitritnachweises mit Griess Reagenz

Die Herstellung erfolgte wie unter 2.1.4.1 beschrieben, es wurde zusätzlich Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  100 U/ml) als Kostimulator zugesetzt. *In vitro* werden Immunzellen im Gegensatz zu *in vivo* nicht durch infiltrierende Zellen beeinflusst. Die Toll-like-Rezeptor (TLR)-Aktivierung erfolgt jedoch in diesem entzündlichen Zustand. Somit ahmt IFN- $\gamma$  den *in-vivo*-Zustand nach und sorgt mit einer Basisaktivierung für eine wesentliche NO-Freisetzung der Immunzellen nach Stimulation (Häusler et al. 2002; Ebert et al. 2005). Das Medium wurde jeweils direkt vor Gebrauch frisch hergestellt.

### 2.1.4.4 Nitrit-Standardreihe für NO-Test

Zur Herstellung des Nitritstandards wurden 34,5 mg Natriumnitrit in 50 ml Aqua ad iniectabilia gelöst. Davon wurden 20  $\mu$ l auf 1,98 ml DMEM + FCS (ohne P/S) verdünnt, dies ergab die Konzentration von 100  $\mu$ M. Die Verdünnungsreihe wurde weiter von 100  $\mu$ M über 50  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M, 6,25  $\mu$ M, 3,125  $\mu$ M und 1,6  $\mu$ M durch jeweiliges Pipettieren gleicher Anteile Medium in die vorangegangene Verdünnung hergestellt. Als Kontrollgruppe (0  $\mu$ M) wurde reines Medium (DMEM + FCS) verwendet. Die Nitrit-Standardreihe wurde 3-fach validiert.

#### 2.1.4.5 Griess-Reagenz

Zur Herstellung des Griess-Reagenz wurden Reagenz A (100 mg N-Naphthyl-ethylendiamin + 100 ml Aqua ad iniectabilia) und B [1 g Sulfanilamid + 6 ml Essigsäure (85%ig) + 100 ml Aqua ad iniectabilia] zu gleichen Teilen gemischt (Ebert et al. 2005). Der Nitritnachweis mit Griess-Reagenz ist unter 2.7 beschrieben.

#### 2.1.4.6 WST-1-Medium

Zur Herstellung des Mediums wurde das wasserlösliche Tetrazoliumsalz-Reagenz (WST-1) (Roche Diagnostics, Mannheim) unter sterilen Bedingungen 1:10 mit DMEM ohne FCS und ohne P/S verdünnt. Das Medium wurde jeweils direkt vor Gebrauch frisch hergestellt. Der WST-1-Zellviabilitätstest ist unter 2.8 beschrieben.

#### 2.1.4.7 Trypticase-Soja-Bouillon

Zur Herstellung einer Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) wurden im Becherglas mit Magnetrührer 30g BBL™ Trypticase™ Soy Broth Pulver in 1 l destilliertem Wasser gelöst und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Die TSB wurde bei 4 °C gelagert.

#### 2.1.4.8 Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

Zur Herstellung einer Phosphat-gepufferten Kochsalzlösung (PBS) wurden im Becherglas mit Magnetrührer 9,55 g PBS-Trockenmischpulver in 1 l Aqua ad iniectabilia gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.1.5 Bakterielle Erreger**

#### 2.1.5.1 *Streptococcus pneumoniae*

Für die Experimente wurde der unbekapselte *S. pneumoniae* Stamm R6 verwendet. Dieser ging durch mehrere Mutationen aus dem bekapseltem *S. pneumoniae* D39 hervor (Hoskins et al. 2001). Dieser Stamm war ein Geschenk von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald. *S. pneumoniae* war bei -80 °C eingefroren und wurde als Stammlösung zur Herstellung frischer Inokula (siehe 2.2) verwendet.

#### 2.1.5.2 *Escherichia coli*

Für die Versuche wurde der *E. coli* Stamm K1 verwendet. Er besitzt das Kapselantigen K1 und wurde von einem Kind mit neonataler Meningitis isoliert. Dieser Stamm war ein Geschenk von Dr. Gregor Zysk, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Ribes et al. 2009).

*E. coli* war bei

-80 °C eingefroren und wurde als Stammlösung zur Herstellung frischer Inokula (siehe 2.3) verwendet.

### 2.1.6 Lösungen zur Stimulation der Phagozytose

#### 2.1.6.1 Anticholinergikum: Glycopyrroniumbromid

Zur Herstellung einer 1 mM Glycopyrroniumbromid-Lösung wurden unter sterilen Bedingungen 5mg Glycopyrroniumbromid-Pulver in 12,55 ml Aqua ad iniectabilia gelöst und zu 27 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei -20 °C gelagert. Das Glycopyrroniumbromid-Pulver wurde uns von Novartis AG zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.6.2 TLR-Agonisten

Für die Experimente wurden die folgenden drei TLR-Agonisten verwendet:

Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) als TLR-9-Agonist in der Konzentration 3 mg/ml, Lipopolysaccharid (LPS) als TLR-4-Agonist in der Konzentration 1 mg/ml und Pam3CSK4 (P3C) als TLR-1/2-Agonist ebenfalls in der Konzentration 1 mg/ml. Die TLR-Agonisten waren in der Stammlösung bei -80° C eingefroren und wurden, wie unter 2.9.2 beschrieben, in unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt.

### 2.1.7 Mäuse

Die Alveolar- und Peritonealmakrophagen wurden zum Zeitpunkt der Präparation aus zum einen 10 Wochen alten und zum anderen 20 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen gewonnen. Die Mäuse waren sowohl weiblich als auch männlich. Diese wurden aus der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen bezogen.

## 2.1.8 Software

**Tabelle 4:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendete Software

cellSens Dimension 1.6	Olympus (Tokio, JP)
Easy-Fit 7.17	Tecan Deutschland (Crailsheim, DE)
GraphPad Prism 8	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Microsoft® Excel 2019 für Mac	Microsoft (Redmond, WA, USA)

## 2.2 Herstellung der *S.-pneumoniae*- und *E.-coli*-Inokula

Für die Herstellung frischer Inokula beider Bakterien wurden zuerst 50 µl der jeweiligen Stamm-Inokula (siehe 2.1.5.1; 2.1.5.2) in je 50 ml NaCl-Lösung hinzugegeben. Von diesen Suspensionen wurden jeweils 1 ml auf Columbia-Blutagarplatten aufgetragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach 24 h wurden die entstandenen Bakterienrasen mit je 5 ml NaCl-Lösung abgeschabt. Alle Bakteriensuspensionen von den einzelnen Blutagarplatten wurden dann gut durchmischt und entsprechend 50 µl in 0,5 ml Reagiergefäße aliquotiert. Die Inokula wurden bei -80 °C gelagert. Um die Bakterienkonzentrationen zu bestimmen, wurden nach 24 h Lagerung von den neu erstellten *S.-pneumoniae*- und *E.-coli*-Inokula je 2 Reagiergefäße aufgetaut. Anschließend wurden Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten (siehe 2.3.1.) ausplattiert, nach Inkubation die Kolonien gezählt und der Mittelwert bestimmt.

## 2.3 Quantifizierung von *S. pneumoniae* und *E. coli*

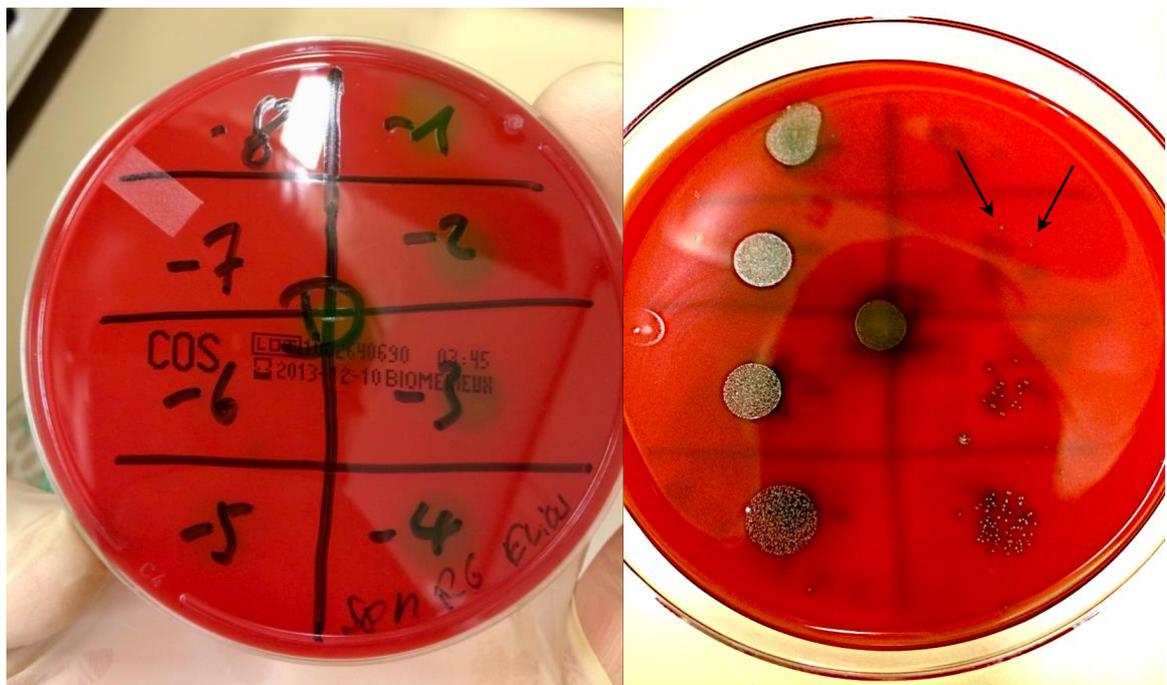
### 2.3.1 Bakterienkonzentrationen in Inokula und Suspensionen

Zur Bestimmung der Bakterienkonzentrationen pro Inokulum wurde eine Verdünnungsreihe ausplattiert. Hierbei wurden 8 Reagiergefäße mit 90 µl NaCl-Lösung gefüllt, aus dem zu bestimmenden Inokulum des jeweiligen Bakteriums wurden 10 µl in das erste Reagiergefäß pipettiert und mit einer neuen Pipettenspitze suspendiert. Dieses ergab eine Verdünnung von 1:10. Aus diesem ersten Reagiergefäß wurden wieder 10 µl in das zweite Reagiergefäß pipettiert und zeitgleich 10 µl auf eine Blutagarplatte ausplattiert. Dieser Vorgang wurde bis zu einer Verdünnung von 1:10<sup>8</sup> wiederholt. Ebenso wurden 10 µl des unverdünnten

Inokulums direkt auf die Blutagarplatte gegeben. Nachdem die Platten für 24 h bei 37 °C im Brutschrank gelagert wurden, konnten die gewachsenen Bakterienkolonien als koloniebildende Einheit (CFU) gezählt werden.

Die Bakterienkonzentration (CFU/ml) wurde anhand der Anzahl der gezählten Bakterienkolonien bestimmt. Hierfür wurden die gezählten Kolonien mit dem Faktor 100 und der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert. Lagen beispielsweise 2 Kolonien bei der 7. Verdünnungsstufe vor, so wurde gerechnet:  $2 \times 100 \times 10^7 = 2 \times 10^9$  CFU/ml (siehe Abbildung 2-1).

Zudem wurde über allen Verdünnungsstufen das arithmetische Mittel gebildet. Kolonien mit nicht zählbar hoher Dichte und unverhältnismäßig hoher Anzahl in großen Verdünnungsstufen wurden vernachlässigt.



**Abbildung 2-1** Columbia-Blutagarplatte mit Verdünnungsstufen des Pneumokokken-Inokulums; 2 *S.-pneumoniae*-Kolonien bei der 7. Verdünnungsstufe.

### 2.3.2 Absolute Anzahl phagozytierter *S. pneumoniae* und *E. coli*

Zur Bestimmung der absoluten Anzahl intrazellulärer *S. pneumoniae* (CFU/Well) nach Phagozytose und Zellyse durch 100 µl Aqua ad iniectabilia wurden jeweils direkt 50 µl, direkt 10 µl und 10 µl in 1:10 Verdünnung, wie oben beschrieben, aus dem jeweiligen Well der Gewebekulturplatte ausplattiert.

Zur Bestimmung der absoluten Anzahl intrazellulärer *E. coli* (CFU/Well) nach Phagozytose wurden hier jeweils direkt 10 µl, 10 µl in 1:10 und 10 µl in 1:100 Verdünnung ausplattiert. Die Kolonien wurden bei 50 µl mit dem Faktor 2, bei 10 µl mit dem Faktor 10, in der 1:10 Verdünnung mit dem Faktor 100 und in der 1:100 mit dem Faktor 1.000 multipliziert. Lagen beispielsweise 19 *E.-coli*-Kolonien bei der unverdünnten Suspension (direkt 10 µl) vor, so wurde gerechnet:  $19 \times 10 = 190$  CFU/Well (siehe Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2** Columbia-Blutagarplatte mit Verdünnungsstufen nach Stimulation von LPS 0,1 und 0,01 µM; 19 *E.-coli*-Kolonien bei der unverdünnten Suspension (D10) unter LPS 0,01 µM.

Wurden bei den unverdünnten Suspensionen bereits einzelne Kolonien gezählt, wurden diese immer primär verwendet. Die Verdünnungen wurden dann vernachlässigt.

Wenn die oben genannten Kriterien (siehe 2.3.1) vorlagen, wurde die Verdünnungsstufe ebenso nicht miteinbezogen. Die Detektionsgrenze lag bei 2 CFU/Well, darunter wurde für statistische Gruppenvergleiche 1 CFU/Well angenommen.

## 2.4 Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Wachstumskinetik der Bakterien-Inokula wurden die Bakterienkonzentrationen von *S. pneumoniae* R6 und *E. coli* K1 während des Wachstums in TSB bei 37 °C zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt:

Es wurden in 15 ml-Röhrchen (n = 3) unter sterilen Arbeitsbedingungen 9,8 ml TSB und 100 µl Glycopyrronium in den jeweiligen Konzentrationen 0/0,001/0,01/0,1/1 und 10 µM vorgelegt. Für die Konzentration 0 µM Glycopyrronium wurden 100 µl Aqua ad iniectabilia verwendet. Gleichzeitig wurde das jeweilige Inokulum in mehreren Schritten in TSB verdünnt. Aus der letzten Verdünnungsstufe wurden ebenso 100 µl in das vorbereitete TSB-Glycopyrronium-Röhrchen pipettiert. So ergab sich eine Endkonzentration der Bakterien in den Röhrchen von 800 CFU/ml. Zur Bestimmung der Wachstumskinetik der Bakterien ohne Einfluss von Glycopyrronium wurden zu den 9,8 ml TSB und 100 µl Bakteriensuspension 100 µl Phosphatpuffer hinzugefügt. Die Röhrchen wurde bei 37 °C für maximal 30 h im Brutschrank inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde jeweils zu ausgewählten Zeitpunkten aus dem Brutschrank entnommen, vorsichtig von Hand geschwenkt und die Bakterienkonzentration wie unter 2.3.1 bestimmt.

## 2.5 Präparation von murinen Makrophagen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen mikrobiologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Der tierschutzgerechte Umgang mit Versuchstieren wurde anhand des absolvierten *Federation of European Laboratory Animal Science Associations*-Kurses (FELASA B) gewährleistet.

### 2.5.1 Gewinnung von primären murinen Peritonealmakrophagen durch Peritoneallavage

Die zum einen 10 und zum anderen 20 Wochen alte Mäuse vom Stamm C57BL/6J wurden mit einem Gemisch von Ketamin 10% (100 mg/ml) und Xylazin 2% (20 mg/ml) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Das in PBS verdünnte Gemisch wurde im Verhältnis 2:1 hergestellt. Als Dosis wurden für Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht (KG) und für Xylazin 10 mg/kg KG gewählt (Arras et al. 2001). Die ausreichende Anästhesie konnte über

den erloschenen Zwischenzehenreflex gesichert werde. Nachdem die gewünschte Narkosetiefe der Maus eingetreten war, wurde mit der Gewinnung der PMs begonnen. Hierfür wurde die Maus mit dem Rücken auf eine Styroporplatte als Arbeitsunterlage fixiert. Mit Hilfe von Einmalrasierern erfolgte eine Rasur des unteren Abdomenbereichs. Anschließend wurde das Abdomen gründlich mit einer 70%iger Ethanol-Lösung desinfiziert. Nun wurden mit einer PBS-gefüllten Insulinspritze (1ml) und sterilen Injektionsnadel der rechte untere Bereich des Abdomens der narkotisierten Maus intraperitoneal punktiert und 1 ml PBS vollständig injiziert (siehe Abbildung 2-3). Die Injektionsnadel wurde intraperitoneal belassen, sodass mit der Insulinspritze nacheinander weitere 2 ml PBS injiziert werden konnten. Zur Steigerung der Ausbeute an Zellen wurde das gesamte Abdomen leicht massiert. Vom insgesamt 3 ml in die Bauchhöhle injizierten Volumen wurde soviel wie möglich nach der Peritoneallavage über die Insulinspritze aspiriert.



**Abbildung 2-3** Gewinnung von PMs durch Peritoneallavage bei narkotisierter Maus vom Stamm C57BL/6J

Das gewonnene zytologische Material wurde in Reagiergefäße gefüllt, anschließend bei Raumtemperatur (21 °C) für 10 min bei 900 rpm zentrifugiert, der Überstand über dem Zellpellet verworfen und das im Wasserbad auf 37 °C erwärmte Medium den Zellen hinzugegeben. Die Auszählung und Ausplattierung der Zell-Suspension erfolgte wie unter 2.6 beschrieben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten PMs handelte es sich um jeweils frisch isolierte Zellen.

### **2.5.2 Gewinnung von primären murinen Alveolarmakrophagen durch bronchoalveoläre Lavage**

Wir verwendeten das von Zhang et al. im Jahre 2008 beschriebene Verfahren zur Isolation von Alveolarmakrophagen. Die zum einen 10 und zum anderen 20 Wochen alte Mäuse vom Stamm C57BL/6J wurden mit einem Gemisch von Ketamin 10% (100 mg/ml) und Xylazin 2% (20 mg/ml) durch intraperitoneale Injektion getötet. Das in PBS verdünnte Gemisch wurde im Verhältnis 2:1 hergestellt. Als letale Dosis wurde das 10-Fache der zur Anästhesie verwendeten Dosis injiziert, für Ketamin 1000 mg/kg KG und für Xylazin 100 mg/kg KG (Schoell et al. 2009). Die Maus wurde mit dem Rücken auf eine Styroporplatte als Arbeitsunterlage gelegt und mittels Injektionsnadeln sicher fixiert. Der Halsbereich der Maus wurde nun mit 70%iger Ethanol-Lösung desinfiziert und das steril verpackte Präparierbesteck geöffnet. Mit der Schere wurde die Haut seitlich am Hals inzidiert und um den gesamten Hals herum vorsichtig abpräpariert. Nach Entfernung der Glandulae sublingualis und submandibularis, der Lymphknoten sowie des Musculus sternohyoideus zeigte sich die Trachea. Diese wurde leicht mobilisiert, um den Ethilon™ 2-0 Faden dorsal führen zu können. Jetzt wurde nach behutsamer Stichinzision, kranial des Fadens, die Trachea mit einer Braunüle® G20 kanüliert. Zur Fixierung wurde der Faden leicht festgezogen und verknotet. Ähnlich wie unter 2.5.1 beschrieben wurde mit einer Injektionsspritze 1 ml PBS in die Lunge der Maus injiziert, der Brustkorb leicht massiert und das Volumen wieder aspiriert (siehe Abbildung 2-4). In einem der Experimente wurde eine Probe mit sichtbarer Blutbeimengung erhalten. Diese wurde verwendet, um die Auswirkung des Vorhandenseins von Blut zu bewerten. Bei den in dieser Arbeit verwendeten AMs handelte es sich um jeweils frisch isolierte Zellen.



**Abbildung 2-4** Gewinnung von AMs durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) bei zuvor getöteter Maus vom Stamm C57BL/6J

Mit dem zytologischen Material wurde wie in 2.5.1 verfahren. Die Mäuse wurden am Ende der Präparation sicherheitshalber zervikal disloziert.

### 2.5.3 Primäre murine Mikrogliazellen

Die bereits präparierten und ausgezählten Mikrogliazellen aus neugeborenen C57BL/6J-Mäusen waren Teil einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Uwe-Karsten Hanisch, Institut für Neuropathologie, Universitätsmedizin Göttingen. Ribes et al. (2009) beschrieben die Präparation von primären Mikrogliazellkulturen aus ein bis drei Tage alten Mäusen und anschließende Isolation der Mikrogliazellen aus gemischten Gliazellen über 14 Tage. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikrogliazellen handelte es sich um frisch isolierte Zellen.

## 2.6 Auszählung und Ausplattierung der Makrophagen

Die Anzahl an Makrophagen der Zell-Suspension wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Suspension mit 90 µl Trypanblau-Lösung 0,4% (unverdünnte Herstellerlösung) gemischt. Aus diesem 1:10 verdünnten Gemisch wurden jeweils 10 µl für das obere und untere Zählfeld, beide unabhängig voneinander, verwendet. Ein Zählfeld beinhaltete 4 Eckquadrate mit jeweils folgender Abmessung: 1 mm<sup>2</sup> Fläche und 0,1 mm Tiefe, entspricht 0,1 mm<sup>3</sup> = 0,1 µl Volumen. Die Zellen wurden in den insgesamt 8 Eckquadraten der Zählkammer unter dem Mikroskop im 10er Objektiv ausgezählt, addiert und durch 8 dividiert. Dieses entsprach der gemittelten Anzahl an Makrophagen pro Eckquadrat; multipliziert mit 10<sup>5</sup> aufgrund der Verdünnung ergab sich dann die Anzahl an Makrophagen pro ml der Ausgangssuspension. Die Makrophagen wurden direkt zur weiteren Verwendung in die 96-Loch-Gewebekulturplatten ausgesät. Hierfür wurde die Ausgangssuspension mit dem vorgewärmten Medium so verdünnt, dass 250 µl/Well mit einer Zahl von 30 000 bzw. 60 000 Makrophagen/Well pipettiert werden konnten. Lediglich die Mikrogliazellen wurden mit 12 500 Zellen/Well ausgesät.

## 2.7 Nitritnachweis mit Griess-Reagenz

Zur Bestimmung der inflammatorischen Aktivität der Makrophagen nach Stimulation mit Glycopyrronium in unterschiedlichen Konzentrationen wurde die Stickstofffreisetzung dieser Makrophagen herangezogen. Die Messung erfolgte mit dem Griess-Reagenz.

Hierbei wurde die Akkumulation von Nitrit als Abbauprodukt von Stickstoffmonoxid aus dem Überstand der Gewebekulturplatten mittels ELISA-Reader und dem Programm Easy-Fit (Tecan Deutschland, Crailsheim, DE) bestimmt (Ebert et al. 2005).

Für diesen Test wurden die Makrophagen, wie unter 2.5 beschrieben, mit dem Medium (siehe 2.1.4.3) ausplattiert und bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) zur Prä-Stimulation mit IFN-γ inkubiert. Nach 2 h Inkubation wurde das Medium abpipettiert, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und nun die Stimulanzen (150 µl/Well), in gleichem Medium hergestellt, hinzugegeben:

LPS in 0,01 µmolarer Konzentration als positive (= nicht toxische) Kontrolle, Triton X-100 in 0,1%iger Lösung als negative (= toxische) Kontrolle und Glycopyrronium in

10/3/1/0,3/0,1/0,03/0,01/0,003/0,001/0,0003  $\mu$ molarer Konzentration. Als unstimulierte Gruppe wurde reines Medium (siehe 2.1.4.3) verwendet. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 h inkubiert.

Nach 48 h Inkubation wurden jeweils 50  $\mu$ l der Kulturüberstände und 50  $\mu$ l des Nitritstandards für die Standardreihe (siehe 2.1.4.4) auf die für die Messung vorgesehene Gewebekulturplatte pipettiert. Vom Griess-Reagenz (siehe 2.1.4.5) wurden jetzt ebenso 50  $\mu$ l auf die Überstände und 50  $\mu$ l auf die Standardreihe pipettiert. Die Platte konnte direkt im ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen werden. Die mit reinem Medium inkubierte Kontrollgruppe wurde als 100% Nitrit-Freisetzung (basale Zellaktivität) angenommen. Die Messwerte wurden entsprechend angepasst.

## **2.8 WST-1-Zellviabilitätstest**

Die restlichen Überstände wurden verworfen und 100  $\mu$ l des WST-1-Mediums pro Well (siehe 2.1.4.6) auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 150 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und der Überstand anschließend photometrisch bestimmt. Mit diesem Test wurde die Zellviabilität nach Inkubation mit Glycopyrronium oder TLR-Agonisten nachgewiesen. Hierbei wird WST-1 durch das mitochondriale Enzym Succinatdehydrogenase zu Formazan umgesetzt. Nur in Mitochondrien vitaler Zellen entsteht somit Formazan, welches im ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm quantifiziert wurde.

## 2.9 Phagozytose-Assay

Alle Arbeiten mit den Zellen fanden unter der Sterilbank statt.

### 2.9.1 Vorbereitung der Zellen, Tag 1

Die Makrophagen wurden nach der Gewinnung und dem Ausplattieren, wie oben beschrieben (siehe 2.5; 2.6), anschließend für 2 h in den Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchte) gelegt. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, in jedes Well wurden 150 µl vorgewärmtes DMEM + FCS und P/S pipettiert. Die Gewebekulturplatten wurden nun über Nacht für weitere ca. 18-20 h in den Inkubator gestellt. Am Folgetag wurden die Zellen stimuliert.

### 2.9.2 Stimulation der Zellen, Tag 2

Für die Stimulation der Zellen wurden entsprechend den jeweiligen Versuchen, folgende Stimulanzen bei Raumtemperatur aufgetaut, unter sterilen Bedingungen mit vorgewärmtem DMEM + FCS (ohne P/S) als Medium verdünnt und in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet:

CpG in 0,15 µM, P3C in 0,1/0,01/0,001 µM und LPS in 0,01/0,001/0,0001 µM.

Mit dem aliquotierten Glycopyrronium (1 mM) wurde identisch verfahren, die Substanz wurde in den Konzentrationen 10/1/0,1 µM verwendet. Für die unstimulierten Zellen (Kontrollgruppe) wurde reines DMEM + FCS (ohne P/S) verwendet. Als Richtwert für die Wahl der Glycopyrronium-Konzentrationen bis 10 µM diente die Arbeit von Pahl et al. (2006).

Das Medium wurde aus den Gewebekulturplatten vorsichtig abgesaugt. Unmittelbar danach wurden je nach Versuchsschema 150 µl der entsprechenden Stimulanzen pro Well pipettiert.

Die Gewebekulturplatten wurden wieder über Nacht für weitere ca. 18-20 h in den Inkubator gestellt. Am Folgetag erfolgte die Phagozytose der Bakterien.

### 2.9.3 Phagozytose, Tag 3

#### 2.9.3.1 Vorbereitung der Bakterien

Die unter 2.2 hergestellten *S.-pneumoniae*- und *E.-coli*-Inokula wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und unter sterilen Bedingungen so mit DMEM + FCS (ohne P/S) in Röhrchen verdünnt, dass die finale Bakterienkonzentration pro Well 100-fach höher als die Anzahl an

Makrophagen pro Well war. Bei einer Zellzahl von 60 000 Makrophagen/Well entsprach das  $6 \times 10^6$  CFU/Well. Da in jedes Well 250  $\mu$ l der Bakterien-Lösung pipettiert wurde, betrug die endgültige Keimkonzentration in den Röhrcchen  $4 \times 6 \times 10^6$  CFU/ml =  $2,4 \times 10^7$  CFU/ml. Als Kontrolle wurde die Keimkonzentration der Bakterien-Lösung durch Ausplattieren auf Blutagarplatten bestimmt (siehe 2.3.1).

#### 2.9.3.2 Phagozytose der Bakterien

Um die Phagozytoseversuche zu beginnen, wurden zuerst die über Nacht stimulierten Zellen in den Gewebekulturplatten aus dem Inkubator entnommen. Der Überstand (DMEM mit FCS) wurde aus jedem Well vorsichtig abgesaugt. Dann wurden die Zellen in jedem Well 1x mit warmen PBS (37 °C) gewaschen und anschließend die Phagozytose durch Hinzugeben von 250  $\mu$ l der Bakterien-Lösung gestartet (siehe 2.9.3.1).

Die Gewebekulturplatten wurden je nach Bakterium unterschiedlich lange bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Inkubator gelagert. Die vorbekannte Phagozytosedauer bei *E. coli* betrug 90 min, wohingegen die Phagozytosedauer bei *S. pneumoniae* mit 30, 60 und 120 min verglichen wurde.

Nach der entsprechenden Phagozytosedauer wurde der Überstand abgesaugt und verworfen bzw. für zytologische Färbungen verwendet (siehe 2.10). Damit alle nicht phagozytierten Bakterien abgetötet werden konnten, wurde in jedes Well 250  $\mu$ l Gentamicin-Lösung (100  $\mu$ g/ml, gelöst in DMEM + FCS ohne P/S) pipettiert und die Zellen für weitere 60 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde die Gentamicin-Lösung aus den einzelnen Wells abgesaugt und die Zellen 1x mit warmem PBS (37 °C) gewaschen. Der Gentamicin-Überstand aus zwei Wells wurde auf Blutagarplatten ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Durch diese Kontrolle konnte gewährleistet werden, dass alle extrazellulären Bakterien abgetötet wurden. Zur anschließenden Zellyse wurden 100  $\mu$ l Aqua ad iniectabilia pro Well hinzugegeben und mit der Pipette sanft durchmischt. Zuletzt wurden die Verdünnungen, wie unter 2.3.2. beschrieben, zur Bestimmung der Anzahl der Bakterien durchgeführt, die von den Zellen phagozytiert wurden.

#### 2.9.4 Auszählung der intrazellulären Bakterien und Berechnung der Phagozytoseleistung, Tag 4

Die Anzahl der CFU/Well wurde, wie unter 2.3.2 beschrieben, bestimmt und die darauffolgenden Berechnungen der relativen Phagozytoseleistung mit dem Programm Microsoft® Excel durchgeführt.

Hierfür wurde das arithmetische Mittel der absoluten Anzahl der phagozytierten Bakterien in der Kontrollgruppe (unstimulierte Zellen) pro Well gebildet. Die Division der absoluten Anzahl der Bakterien pro Well (CFU/Well) der Kontrollgruppe durch diesen Mittelwert, multipliziert mit 100, ergab die relative Phagozytoseleistung der Phagozytose in den einzelnen Wells der Kontrollgruppe in Prozent.

Durch Division der absoluten Anzahl der Bakterien pro Well (CFU/Well) jeder einzelnen Stimulanz (CpG, P3C, LPS und Glycopyrronium) durch diesen Mittelwert, multipliziert mit 100, ergab sich die jeweilige relativ zur Kontrollgruppe bezogene Phagozytoseleistung der Phagozytose jedes einzelnen Wells in Prozent.

### **2.9.5 Kriterien zum Ausschluss von Phagozytoseversuchen und Einzelwerten**

Wenn eine bakterielle Kontamination des hergestellten Mediums (DMEM), der NaCl-Lösung zur Verdünnung oder eine generelle Kreuzkontamination der Bakterien in dem jeweiligen Versuch vorlag, wurden diese Versuche verworfen.

Ebenso wurden gewonnene Zell-Suspensionen aus der Peritoneallavage, bei denen unter dem Mikroskop zusätzlich zu den Makrophagen weitere begeißelte Zellen zu sehen waren, nicht weiterverwendet. Diese könnten möglicherweise ein Hinweis auf eine akzidentelle Darmperforation durch die Injektionsnadel gewesen sein. Somit könnten diese begeißelten Zellen Enterobakterien wie beispielsweise *E. coli* gewesen sein.

Gab es in einem Versuch mehrere Wells, bei denen die Anzahl der phagozytierten Bakterien unterhalb der Detektionsgrenze lag, wurde dieser nicht berücksichtigt.

Ein weiteres Ausschlusskriterium lag vor, wenn nach direktem unverdünnten Ausplattieren von 50 oder 10 µl Zellmaterial, nach Lyse, die Bakterienkolonien auf der Blutagarplatte so überwucherten, dass es nicht möglich war die weiteren Verdünnungsstufen korrekt abzulesen. Diese Werte der Phagozytoseleistung wurden ebenso nicht berücksichtigt.

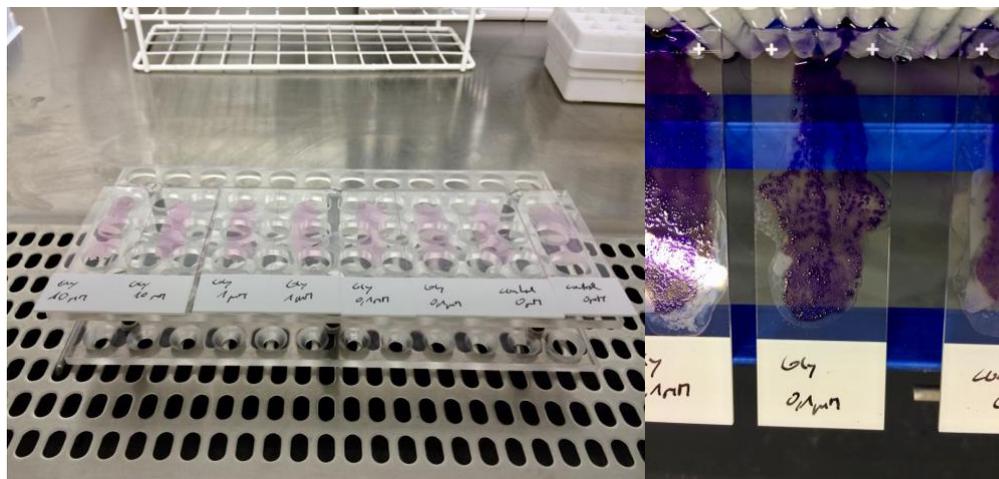
## **2.10 Zytologie**

### **2.10.1 Methylenblau-Färbung**

Nach der Phagozytose wurde der Überstand (250 µl) aus den mit Glycopyrronium stimulierten Wells und den enthaltenen nicht-phagozytierten Pneumokokken für die Färbung auf Objektträgern pipettiert. Die Trocknung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank. Zur

Hitzefixation wurde der Objektträger dreimal durch die obere Flamme des Bunsenbrenners gezogen. Für die Färbung wurde Löfflers Methylenblaulösung (unverdünnte Herstellerlösung) insgesamt 5 min auf die Ausstriche gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült (siehe Abbildung 2-5). Zuletzt wurden die angefärbten Objektträger bei Raumtemperatur (21 °C) getrocknet und mittels DePeX zur Einbettung für die Histologie fixiert.

Mit Hilfe des Olympus BX51-Mikroskops und der Kamera Olympus DP71 wurde unter Verwendung des Programms cellSens Dimension 1.6 (Olympus, Tokio, JP) zytologische Bilder aufgenommen.



**Abbildung 2-5** Zytologische Methylenblau-Färbung a) Überstand auf Objektträger b) Färbung mit Löfflers Methylenblaulösung

## 2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung und grafischen Darstellung wurde GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) verwendet. Es lag bei der Auswertung der Daten keine Normalverteilung vor. Somit wurden die nicht-parametrischen Daten als Mediane mit 25./75.-Perzentile dargestellt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Bei drei und mehr unabhängigen Stichproben wurden die Mediane mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests und der Korrektur nach Dunns miteinander verglichen. Die Korrektur nach Bonferroni-Holm wurde bei Durchführung mehrerer statistischer Signifikanztests an einem Datensatz zur Fehlerkorrektur angewendet. Alle durchgeführten Tests waren zweiseitig. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf  $< 0,05$  festgelegt.

Bei den Experimenten wurden die Signifikanzniveaus entsprechend dargestellt (\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ).

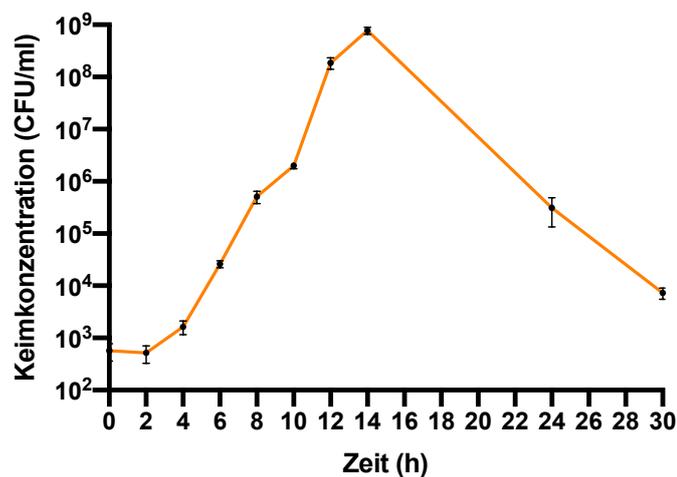
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Wachstumskinetik von *S. pneumoniae* R6 und *E. coli* K1 in Trypticase-Soja-Bouillon

##### 3.1.1 Inokulum für Glycopyrronium-Experimente von *S. pneumoniae* R6

*S. pneumoniae* R6 war auf eine initiale Keimkonzentration von 800 CFU/ml in den R6hrchen verd6nnt worden. Nach 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 24 und 30 h wurde aus jedem R6hrchen (n = 3) eine Verd6nnungsreihe zur Bakterienzahlbestimmung auf Blutagarplatten ausplattiert. Dieser Versuch wurde einmalig mit 3 R6hrchen durchgef6hrt. Es wurde im Weiteren mit Konzentrationen von Glycopyrronium bis 10  $\mu$ M gearbeitet.

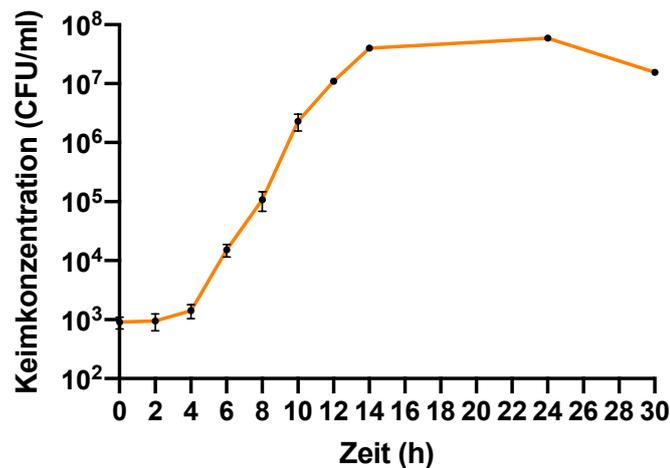
Abbildung 3-1 zeigt die Wachstumskurve des bei den Glycopyrronium-Versuchen verwendeten Inokulums von *S. pneumoniae* R6 in TSB ohne Phagozyten. Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 14 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt herrschte eine mediane Bakterienkonzentration von  $7,7 \times 10^8$ . Danach setzte die station6re Phase ein mit anschließender Absterbephase.



**Abbildung 3-1** Wachstumskurve von *S. pneumoniae* R6 in 9,8 ml TSB, 100  $\mu$ l Phosphatpuffer und 100  $\mu$ l Bakteriensuspension (n = 3).

### 3.1.2 Inokulum für Glycopyrronium-Experimente von *E. coli* K1

Abbildung 3-2 zeigt die Wachstumskurve des bei den Glycopyrronium-Versuchen verwendeten Inokulums von *E. coli* K1 in TSB ohne Phagozyten. Das Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde nach 14 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt herrschte eine mediane Bakterienkonzentration von  $4,02 \times 10^7$ . Danach setzte die stationäre Phase ein. Dieser Versuch wurde einmalig mit 3 Röhren durchgeführt ( $n = 3$ ).



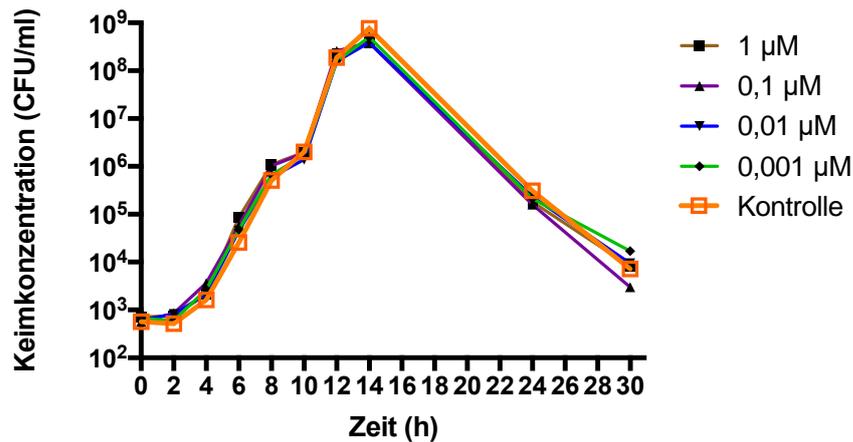
**Abbildung 3-2** Wachstumskurve von *E. coli* K1 in 9,8 ml TSB, 100 µl Phosphatpuffer und 100 µl Bakteriensuspension ( $n = 3$ ).

## 3.2 Kein Einfluss von Glycopyrronium auf das Bakterienwachstum

### 3.2.1 Einfluss von Glycopyrronium auf das Pneumokokkenwachstum

Das Hinzufügen von Glycopyrronium in verschiedenen Konzentrationen beeinflusste nicht das Wachstum von *S. pneumoniae* R6 (Abbildung 3-3).

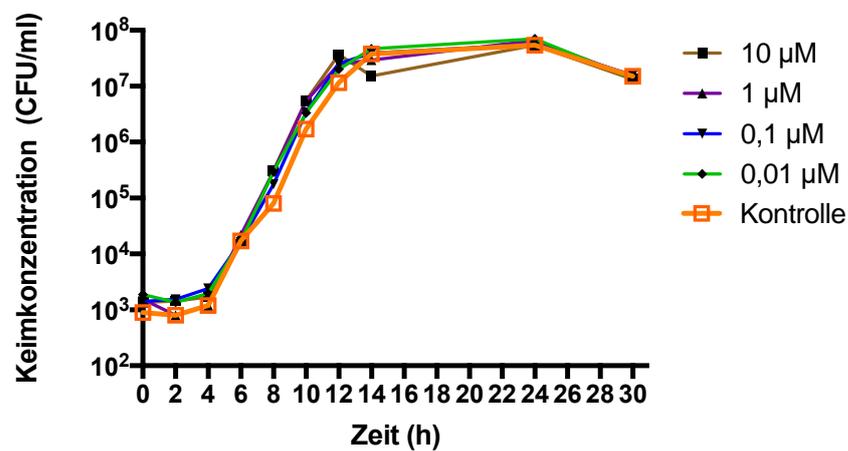
Die medianen Keimkonzentrationen der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dieser Versuch wurde einmalig mit jeweils 3 Röhren durchgeführt ( $n = 3$ ).



**Abbildung 3-3** Wachstumskurve von *S. pneumoniae* R6 in 9,8 ml TSB, 100 µl Glycopyrronium und 100 µl Bakteriensuspension (n = 3).

### 3.2.2 Einfluss von Glycopyrronium auf das Wachstum von *E. coli* K1

Das Wachstum von *E. coli* K1 wurde nicht durch die Anwesenheit von Glycopyrronium beeinflusst (Abbildung 3-4). Die medianen Keimkonzentrationen der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Dieser Versuch wurde einmalig mit 3 Röhren durchgeführt (n = 3).



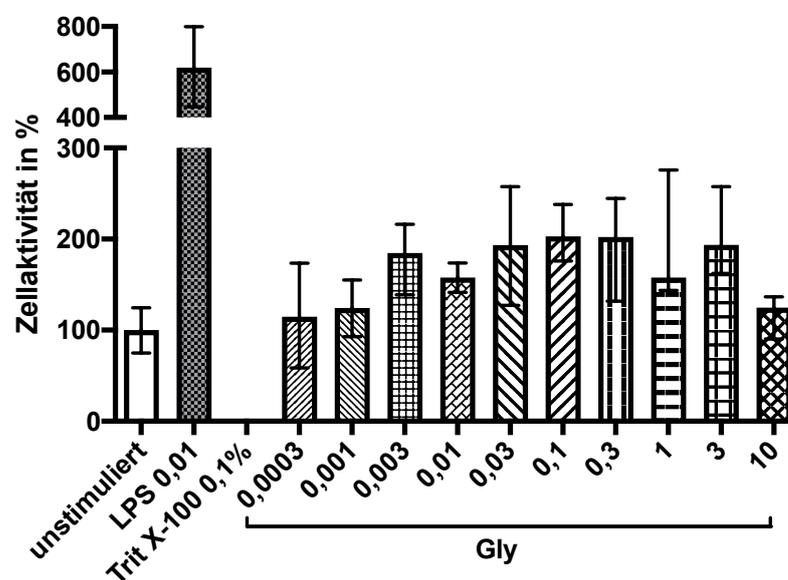
**Abbildung 3-4** Wachstumskurve von *E. coli* K1 in 9,8 ml TSB, 100 µl Glycopyrronium und 100 µl Bakteriensuspension (n = 3).

### 3.3 Beeinflussung der Stickstofffreisetzung und Zellviabilität durch Glycopyrronium

Mittels Nitritnachweis mit Griess-Reagenz und WST-1-Zellviabilitätstest wurde die Toxizität der Substanzen untersucht, denen die Makrophagen während der Phagozytose ausgesetzt waren. Glycopyrronium wurde in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht.

#### 3.3.1 NO-Freisetzung bei Peritonealmakrophagen

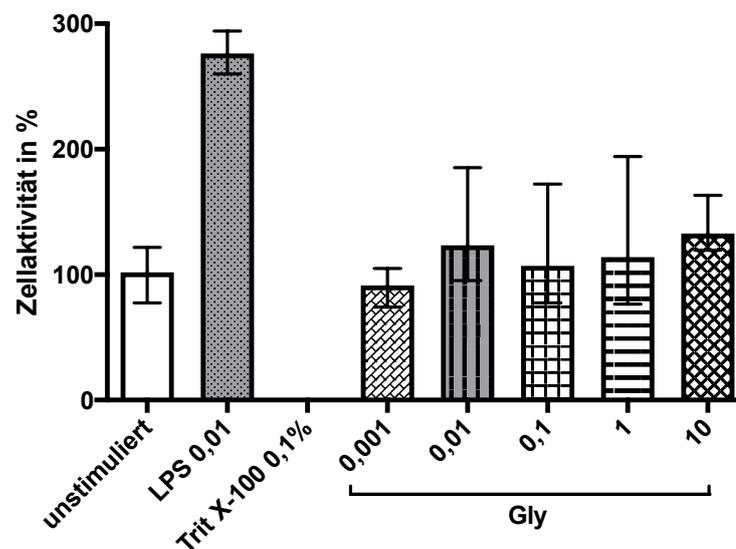
Abbildung 3-5 zeigt die Zellaktivität (NO-Freisetzung) in Prozent nach Inkubation der PMs mit den Substanzen, die auch in den Phagozytoseversuchen eingesetzt wurden. Während Triton X-100 (verdünnt auf 0,1%) alle Zellen abtötete, war die Freisetzung von NO in keiner der untersuchten Konzentrationen von Glycopyrronium signifikant höher als in der unstimulierten Gruppe. LPS führte zu einer erheblichen Zellaktivität. Auch der Zellviabilitätstest zeigte keine zytotoxischen Effekte unter unterschiedlichen Konzentrationen von Glycopyrronium.



**Abbildung 3-5** NO-Freisetzung von PMs nach Inkubation mit den in den Phagozytoseversuchen verwendeten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen für 48 h. Die NO-Freisetzung der mit DMEM inkubierten Kontrollgruppe (unstimuliert) wurde als 100% angenommen. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen, die LPS- und Glycopyrronium-Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ . Triton X-100 in %. (jede Substanz n = 4).

### 3.3.2 NO-Freisetzung bei Alveolarmakrophagen

Abbildung 3-6 zeigt die Zellaktivität (NO-Freisetzung) in Prozent nach Inkubation der AMs mit den Substanzen, die auch in den Phagozytoseversuchen eingesetzt wurden. Der Median der mit Glycopyrronium behandelten Gruppen unterschied sich nicht signifikant vom Median der unstimulierten Kontrollgruppe; LPS führte auch hier zu einer erhöhten Zellaktivität.



**Abbildung 3-6** NO-Freisetzung von AMs nach Inkubation mit den in den Phagozytoseversuchen verwendeten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen für 48 h. Die NO-Freisetzung der mit DMEM inkubierten Kontrollgruppe (unstimuliert) wurde als 100% angenommen. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen, die LPS- und Glycopyrronium-Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ . Triton X-100 in %. (jede Substanz  $n = 6$ , außer unstimuliert  $n = 5$ , Gly 0,001  $n = 3$ ).

Wie diese Ergebnisse zeigen, wurde die Zellaktivität und ebenso die Zellviabilität nicht durch die verwendeten Substanzen in den in dieser Arbeit untersuchten maximalen Konzentrationen beeinträchtigt.

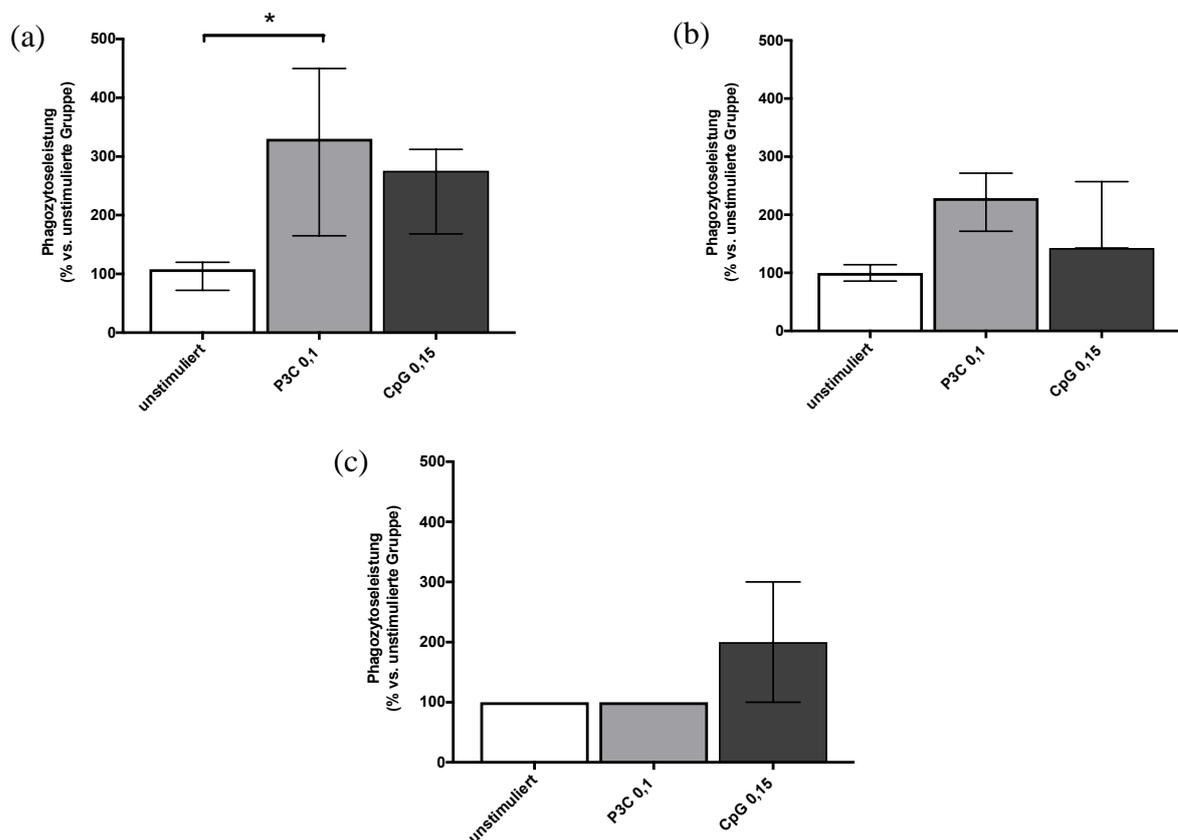
### 3.4 Einfluss der Inkubation von Bakterien mit Glycopyrronium während ihres Wachstums auf die Phagozytoseleistung der Makrophagen

#### 3.4.1 Festlegen der Bedingungen für die Phagozytose

Es wurden drei Vorversuche zur Phagozytosedauer, Makrophagen-Zellzahl/Well und Blutbeimischung im Well gemacht.

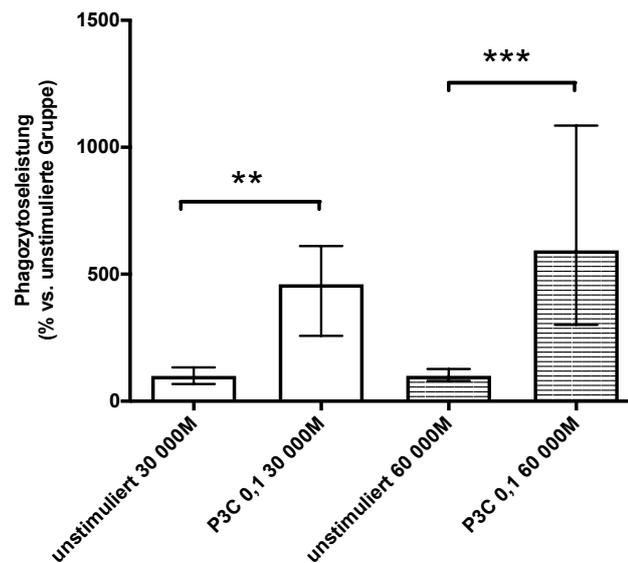
##### 3.4.1.1 Phagozytosedauer bei *S. pneumoniae* R6 und Peritonealmakrophagen

In der folgenden Abbildung 3-7 zeigte sich, dass nach 30 min Inkubation mit *S. pneumoniae* (a) die Phagozytoseleistung zwischen Kontrollgruppe im Vergleich zur P3C stimulierten Gruppe den größten Unterschied aufwies (\* $p < 0,05$ ). Die Inkubationszeit wurde für die weiteren Versuche auf 30 min bei *S. pneumoniae* R6 festgesetzt.



**Abbildung 3-7** Relative Phagozytoseleistung in Prozent von PMs, die mit den Toll-like-Rezeptor-Agonisten (P3C 0,1 µM und CpG 0,5 µM) während unterschiedlicher Zeiten inkubiert worden waren und denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\* $p < 0,05$ ). (a) nach 30 min Inkubation (unstimuliert n = 3, P3C 0,1 und CpG 0,15 n = 4). (b) nach 60 min Inkubation (unstimuliert n = 2, P3C 0,1 und CpG 0,15 n = 3). (c) nach 120 min Inkubation (unstimuliert n = 1, P3C 0,1 n = 1 und CpG 0,15 n = 3).

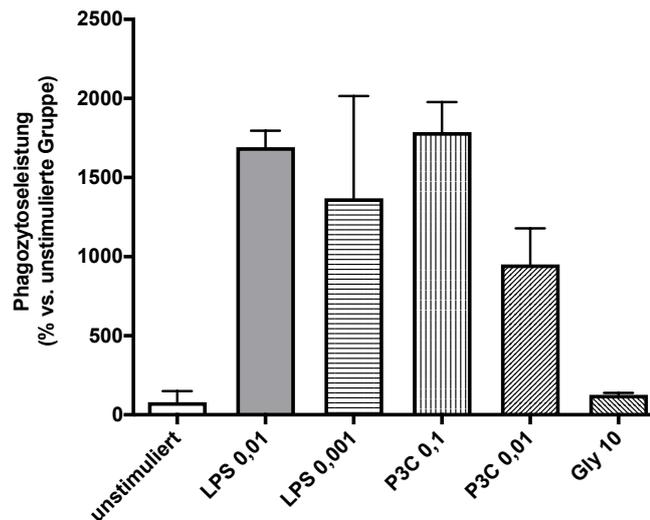
3.4.1.2 Makrophagenzahl pro Well bei Ko-Inkubation *E. coli* K1 und Alveolarmakrophagen  
Abbildung 3-8 stellt die Unterschiede der Makrophagenzahl pro Well bei *E. coli* K1 und AMs heraus. Da bei einer Zellzahl von 60 000 Makrophagen pro Well die größte Differenz (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) zwischen Kontrollgruppe und stimulierter Gruppe vorlag, wurde die Makrophagenzahl pro Well für die zukünftigen Versuche auf 60 000 festgesetzt.



**Abbildung 3-8** Relative Phagozytoseleistung in Prozent bei Ko-Inkubation von AMs in unterschiedlichen Makrophagen-Zellzahlen (30 000 & 60 000 Makrophagen/Well) mit *E. coli* K1 nachdem sie ohne und mit dem Toll-like-Rezeptor-Agonist (P3C 0,1  $\mu$ M) inkubiert worden waren. Die Phagozytoseleistung der jeweiligen Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). (30 000M: unstimuliert n = 6, P3C 0,1 n = 7; 60 000M: unstimuliert n = 7, P3C 0,1 n = 9).

#### 3.4.1.3 Auswirkungen von Blut

In dem letzten Vorversuch ist in Abbildung 3-9 dargestellt, wie stark sich eine Blutbeimengung durch blutige Präparation der Makrophagen auf die Phagozytoseleistung auswirkte. Das Blut schien selbst ein Stimulator zu sein und führte zu falsch-hohen Phagozytoseleistungen. Blutige Präparationen wurden daher verworfen.



**Abbildung 3-9** Relative Phagozytoseleistung (%) von AMs, die mit Blut verunreinigt waren und mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. Alle Konzentrationen sind in  $\mu\text{M}$  angegeben. (jede Substanz  $n = 4$ , außer LPS 0,001  $n = 3$ ).

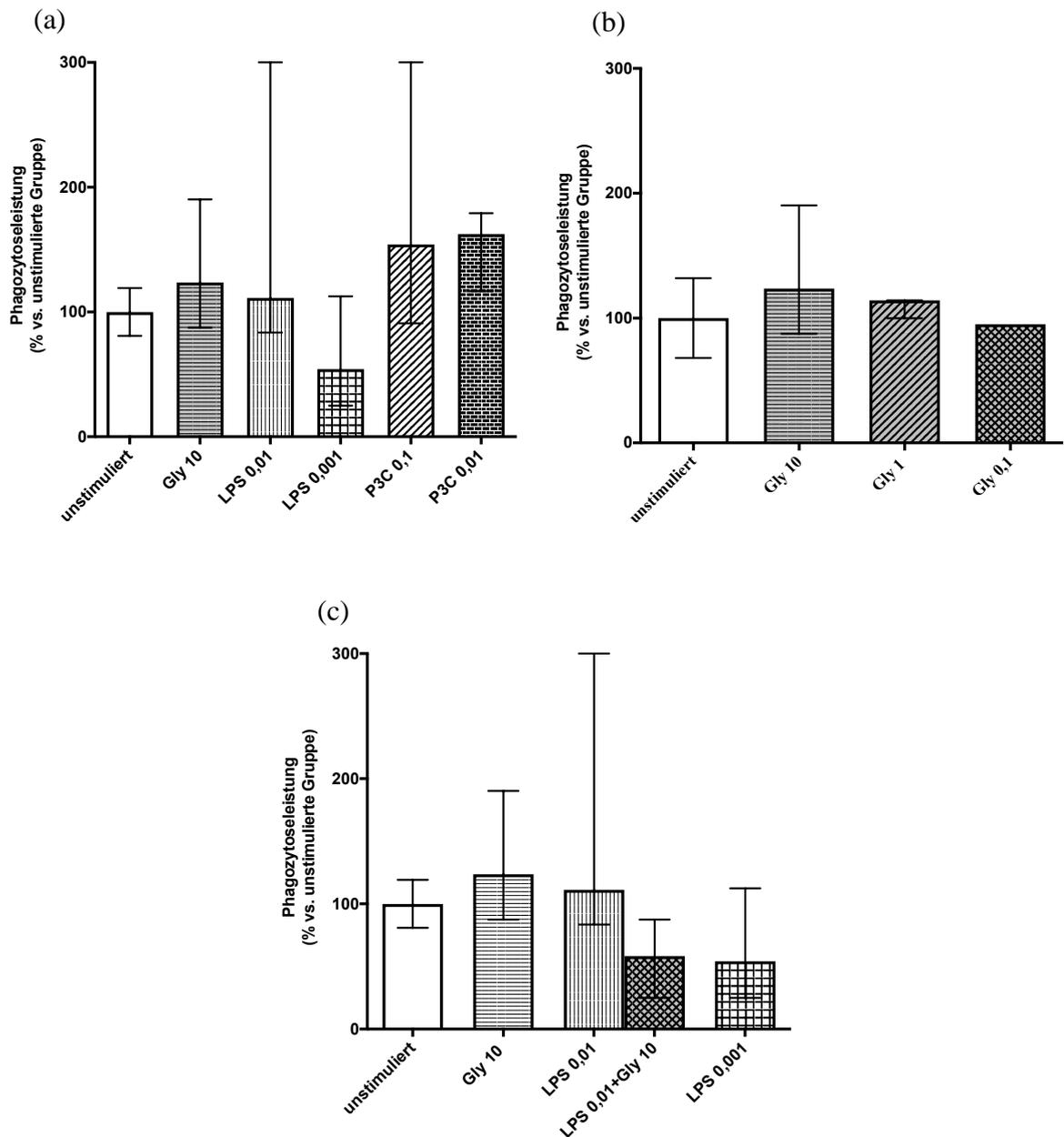
Glycopyrronium führte auch bei Blutbeimengung zu keiner signifikanten Stimulation.

### 3.4.2 Phagozytoseleistung bei Ko-Inkubation von Makrophagen und Mikroglia mit *S. pneumoniae* R6 unter dem Einfluss von Glycopyrronium

Im Folgenden wurde gezeigt, welchen Einfluss Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung von Alveolar- und Peritonealmakrophagen und Mikrogliazellen bei Ko-Inkubation mit Pneumokokken hat.

#### 3.4.2.1 Phagozytoseleistung der Alveolarmakrophagen

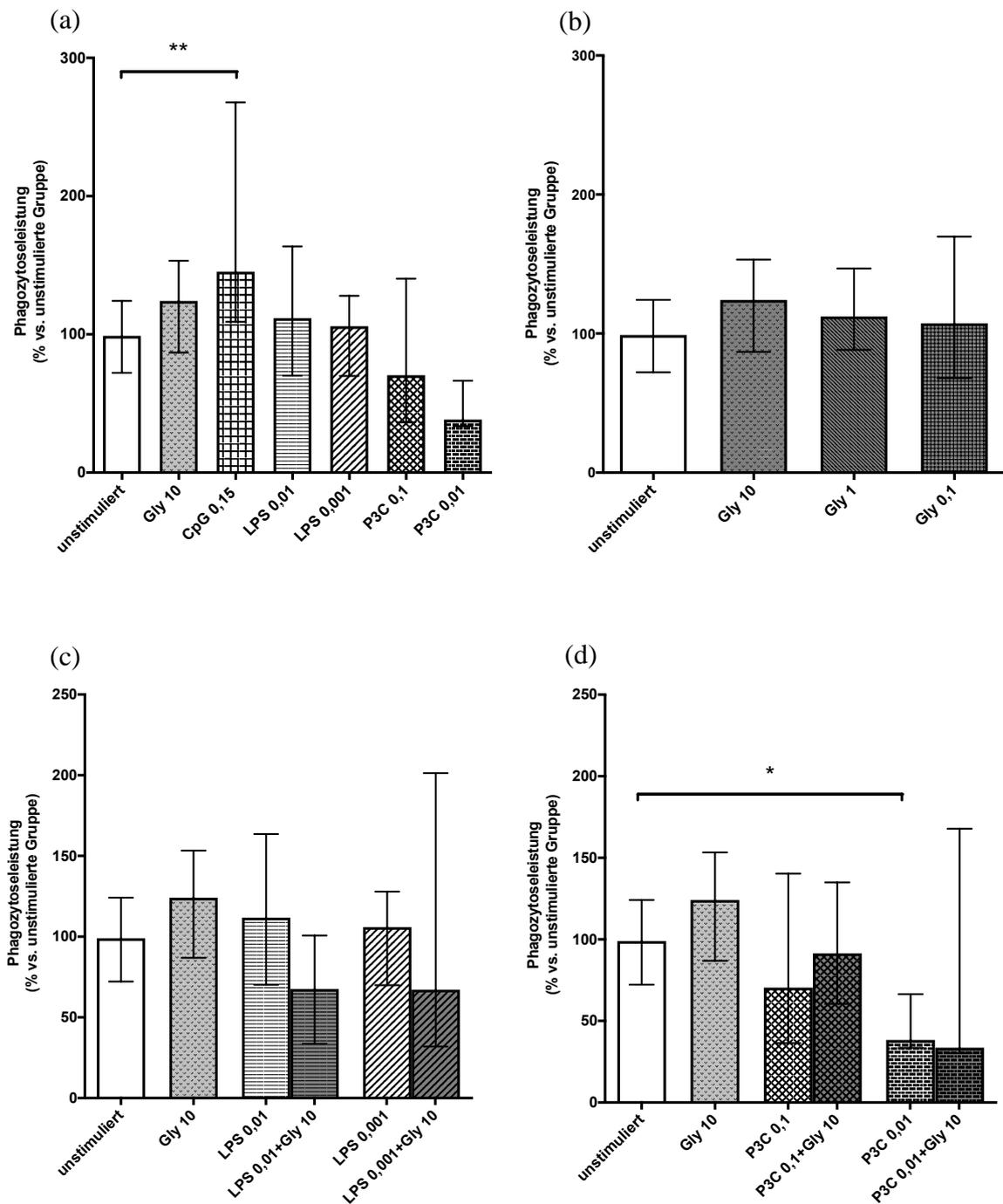
In Abbildung 3-10 stellte sich bei AMs dar, dass sowohl bei unterschiedlichen Konzentrationen von Glycopyrronium im Vergleich zur Kontrollgruppe (b) als auch bei Makrophagen, die unter dem Einfluss von Stimulanzen (LPS, P3C) gewachsen waren (a), keine signifikante Änderung der Bakterienaufnahme zu verzeichnen war. Ebenso ergab der Versuch, LPS mit Glycopyrronium zu kombinieren, keine signifikante Steigerung der Phagozytoseleistung (c). Des Weiteren unterlag die Phagozytose nach Stimulation mit LPS 0,01  $\mu\text{M}$  und P3C 0,1  $\mu\text{M}$  (a) sehr starken Streuungen. Die Phagozytose wurde also nicht durch Glycopyrronium beeinflusst.



**Abbildung 3-10** Relative Phagozytoseleistung (%) von AMs, die mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen. (a) Alle Stimulanzen unterschiedlicher Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert  $n = 12$ , Gly 10  $n = 7$ , LPS 0,01  $n = 10$ , LPS 0,001  $n = 3$ , P3C 0,1  $n = 12$ , P3C 0,01  $n = 3$ ). (b) Glycopyrronium in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert  $n = 6$ , Gly 10  $n = 7$ , Gly 1  $n = 4$ , Gly 0,1  $n = 3$ ). (c) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert  $n = 12$ , Gly 10  $n = 7$ , LPS 0,01  $n = 10$ , LPS 0,01+Gly 10  $n = 3$ , LPS 0,001  $n = 3$ ).

#### 3.4.2.2 Phagozytoseleistung der Peritonealmakrophagen

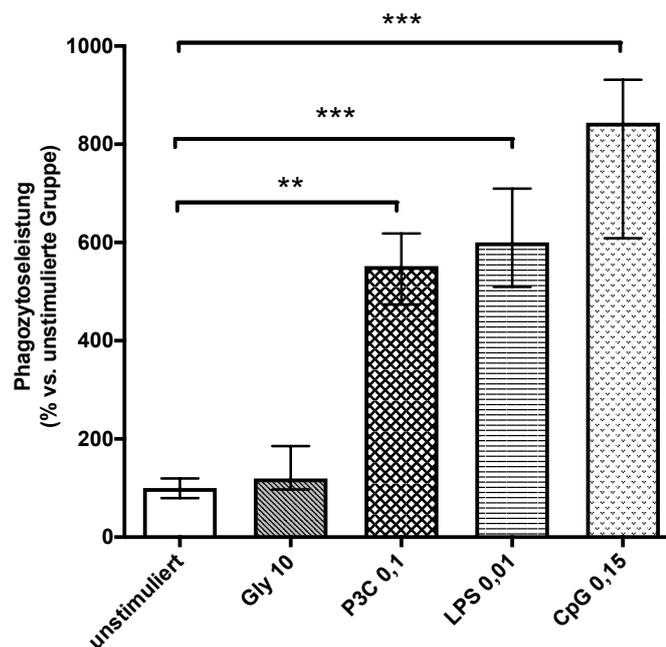
In Abbildung 3-11 stellte sich auch bei PMs dar, dass diese durch die Stimulanzen (CpG, LPS und P3C) in den meisten Fällen keine signifikante Steigerung der Bakterienaufnahme zeigten (a). Lediglich CpG 0,15  $\mu\text{M}$  führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer vermehrten Phagozytose von *S. pneumoniae* R6 (\*\*p < 0,01). Die unterschiedlichen Konzentrationen von Glycopyrronium im Vergleich zur Kontrollgruppe führten ebenfalls zu keiner signifikanten Steigerung der Bakterienaufnahme (b). Auch die Kombination von LPS (c) oder P3C (d) mit Glycopyrronium ergab keine signifikante Steigerung der Phagozytoseleistung (c).



**Abbildung 3-11** Relative Phagozytoseleistung (%) von PMs, die mit verschiedenen Stimulanzien inkubiert worden waren und denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\*p < 0,01; \*p < 0,05). (a) Alle Stimulanzien unterschiedlicher Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 40, Gly 10 n = 25, CpG 0,15 n = 25, LPS 0,01 n = 35, LPS 0,001 n = 17, P3C 0,1 n = 46, P3C 0,01 n = 13). (b) Glycopyrronium in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 40, Gly 10 n = 25, Gly 1 n = 9, Gly 0,1 n = 9). (c) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 40, Gly 10 n = 25, LPS 0,01 n = 35, LPS 0,01+Gly 10 n = 11, LPS 0,001 n = 17, LPS 0,001+Gly 10 n = 5). (d) Auswirkung der Kombination P3C + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 40, Gly 10 n = 25, P3C 0,1 n = 46, P3C 0,1+Gly 10 n = 10, P3C 0,01 n = 13, P3C 0,01+Gly 10 n = 5).

## 3.4.2.3 Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen

Ganz anders sah es bei den Experimenten mit Mikrogliazellen aus. Hier (Abbildung 3-12) führte die Stimulation mit allen drei Stimulanzen zu einer signifikanten Steigerung der Phagozytose von *S. pneumoniae* R6 im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $***p < 0,001$ ;  $**p < 0,01$ ). CpG 0,15  $\mu\text{M}$  stimulierte die Mikrogliazellen am stärksten. Glycopyrronium hingegen hatte im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls keinen Einfluss auf die Phagozytoseleistung.



**Abbildung 3-12** Relative Phagozytoseleistung (%) von Mikrogliazellen, die mit verschiedenen Stimulanzen ( $\mu\text{M}$ ) inkubiert worden waren und denen Pneumokokken zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen ( $***p < 0,001$ ;  $**p < 0,01$ ). (jede Substanz  $n = 10$ ).

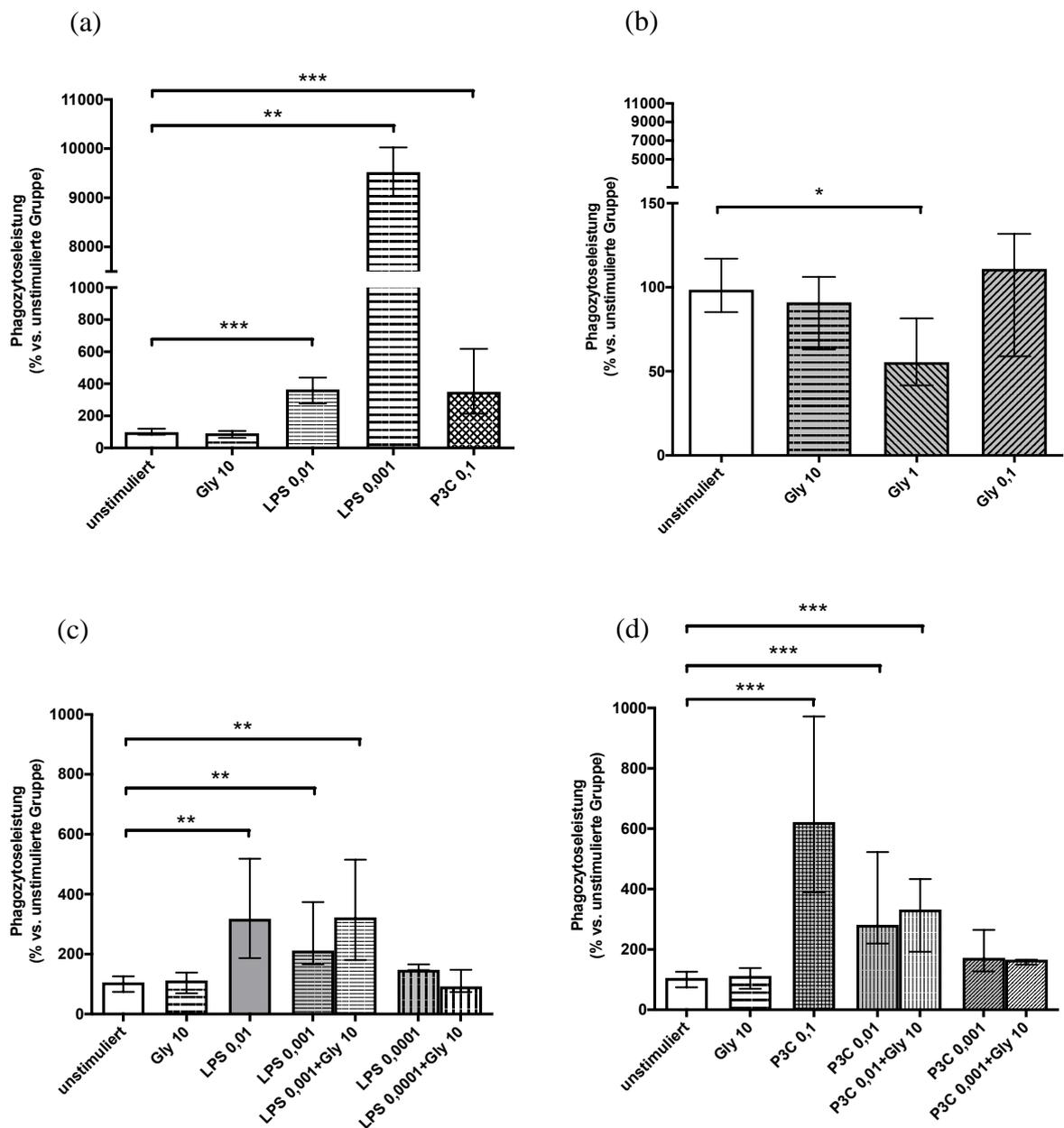
### 3.4.3 Phagozytoseleistung bei Ko-Inkubation von Makrophagen mit *E. coli* K1 unter dem Einfluss von Glycopyrronium

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung von Alveolar- und Peritonealmakrophagen bei Ko-Inkubation mit *E. coli* hat.

Da die Makrophagen sich zur Phagozytose von Pneumokokken nur sehr schwer stimulieren ließen und darunter keine Steigerungen der Phagozytose durch Glycopyrronium nachweisbar waren, wurde die gleiche Versuchsreihe mit *E. coli* K1 durchgeführt. Hierbei wurden zusätzlich Makrophagen von Mäusen präpariert, die jeweils 10 und 20 Wochen alt waren, um einen möglichen Einfluss des Alters zu erkennen.

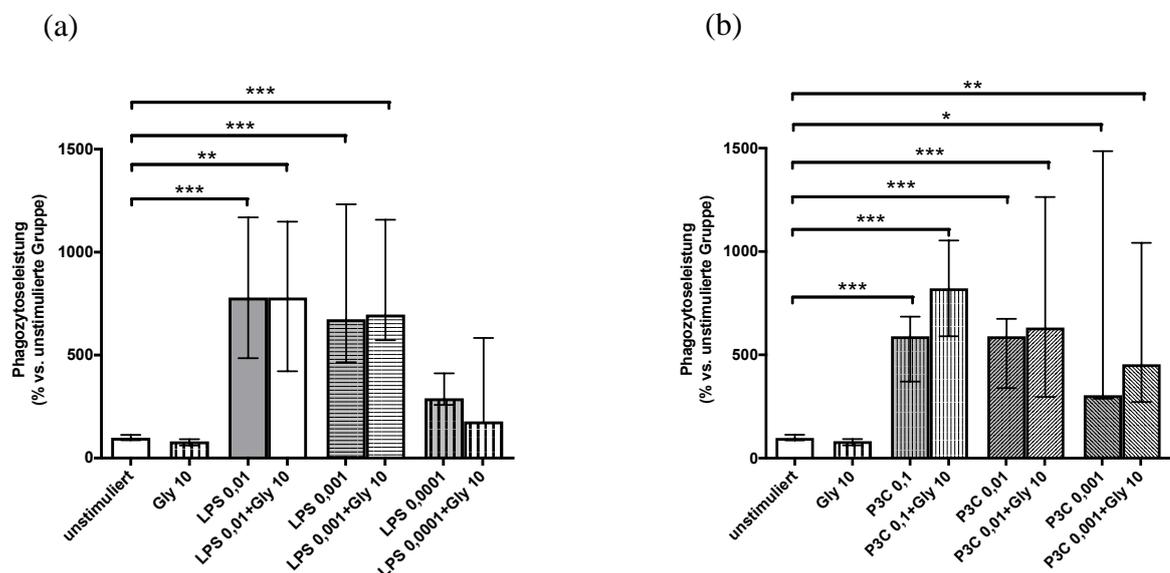
#### 3.4.3.1 Phagozytoseleistung der Alveolarmakrophagen

In Abbildung 3-13 zeigte sich bei AMs von 10 Wochen alten Mäusen eine deutliche Steigerung der Phagozytoseleistung durch Toll-like-Rezeptor-Agonisten (LPS 0,01  $\mu\text{M}$ , LPS 0,001  $\mu\text{M}$  und P<sub>3</sub>C 0,1  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0,001$  im Vergleich zur Kontrollgruppe) (a). Glycopyrronium führte in unterschiedlichen Konzentrationen erneut zu keiner signifikanten Steigerung der Bakterienaufnahme (b). Auch bei Kombination Toll-like-Rezeptor-Agonist + Glycopyrronium (c/d) ergab sich für den relevanten Vergleich mit und ohne Glycopyrronium keine signifikante Differenz. Also hatte Glycopyrronium sowohl alleine als auch in Kombination mit einem Toll-like-Rezeptor-Agonisten keinen Einfluss auf die Bakterienphagozytose.



**Abbildung 3-13** Alter der Mäuse bei Präparation 10 Wochen: Relative Phagozytoseleistung (%) von AMs, die mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; p\* < 0,05). (a) Alle Stimulanzen unterschiedlicher Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 20, Gly 10 n = 13, LPS 0,01 n = 11, LPS 0,001 n = 2, P3C 0,1 n = 18). (b) Glycopyrronium in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 13, Gly 10 n = 13, Gly 1 n = 5, Gly 0,1 n = 5). (c) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 8, Gly 10 n = 8, LPS 0,01 n = 4, LPS 0,001 n = 8, LPS 0,001+Gly 10 n = 8, LPS 0,0001 n = 7, LPS 0,0001+Gly 10 n = 7). (d) Auswirkung der Kombination P3C + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 8, Gly 10 n = 8, P3C 0,1 n = 4, P3C 0,01 n = 8, P3C 0,01+Gly 10 n = 7, P3C 0,001 n = 8, P3C 0,001+Gly 10 n = 8).

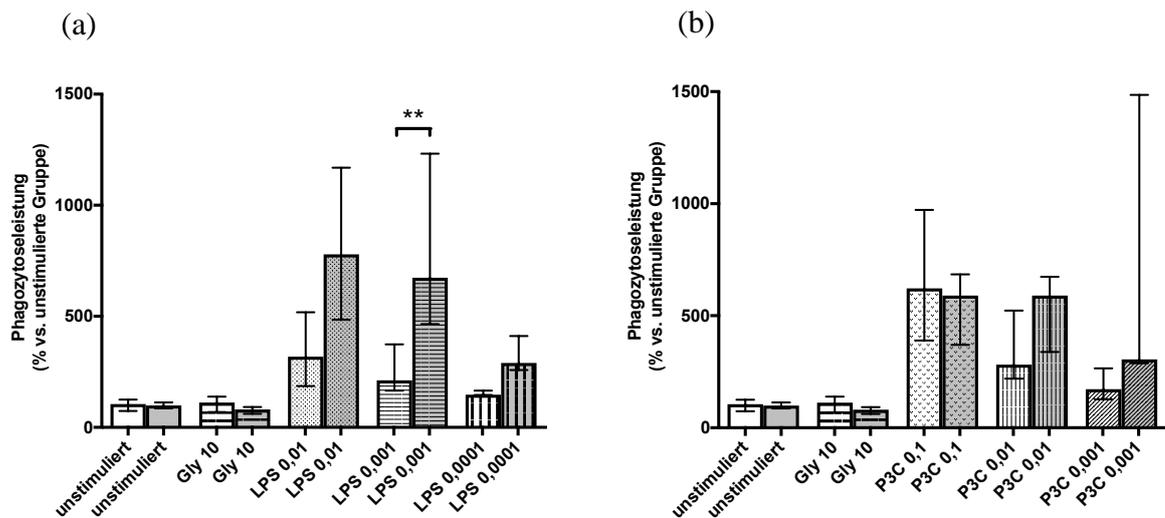
In Abbildung 3-14 ergab sich bei AMs von 20 Wochen alten Mäusen ebenfalls eine deutliche Erhöhung der Phagozytoseleistung durch die Toll-like-Rezeptor-Agonisten (LPS 0,01/0,001/0,0001  $\mu\text{M}$  und P3C 0,1/0,01/0,001  $\mu\text{M}$ ) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,001$  und  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dargestellt ist der direkte Vergleich Toll-like-Rezeptor-Agonisten mit und ohne Glycopyrronium (a) bei LPS und (b) bei P3C. Obwohl fast alle Gruppen signifikante Differenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen, ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen der Doppelstimulation und der Einfachstimulation. Auch hier hatte Glycopyrronium sowohl alleine als auch in Kombination mit einem Toll-like-Rezeptor-Agonisten keinen Einfluss auf die Bakterienphagozytose.



**Abbildung 3-14** Alter der Mäuse bei Präparation 20 Wochen: Relative Phagozytoseleistung (%) von AMs, die mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). (a) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert  $n = 17$ , Gly 10  $n = 16$ , LPS 0,01  $n = 14$ , LPS 0,01+Gly 10  $n = 6$ , LPS 0,001  $n = 14$ , LPS 0,001+Gly 10  $n = 14$ , LPS 0,0001  $n = 4$ , LPS 0,0001+Gly 10  $n = 5$ ). (b) Auswirkung der Kombination P3C + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert  $n = 17$ , Gly 10  $n = 16$ , P3C 0,1  $n = 14$ , P3C 0,1+Gly 10  $n = 6$ , P3C 0,01  $n = 11$ , P3C 0,01+Gly 10  $n = 11$ , P3C 0,001  $n = 7$ , P3C 0,001+Gly 10  $n = 8$ ).

Abbildung 3-15 stellt die Phagozytoserate im Hinblick auf das Alter der Mäuse bei der Präparation (damit auch der AMs) dar. (a) zeigt den Vergleich 10 Wochen/20 Wochen bei LPS, (b) bei P3C in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen.

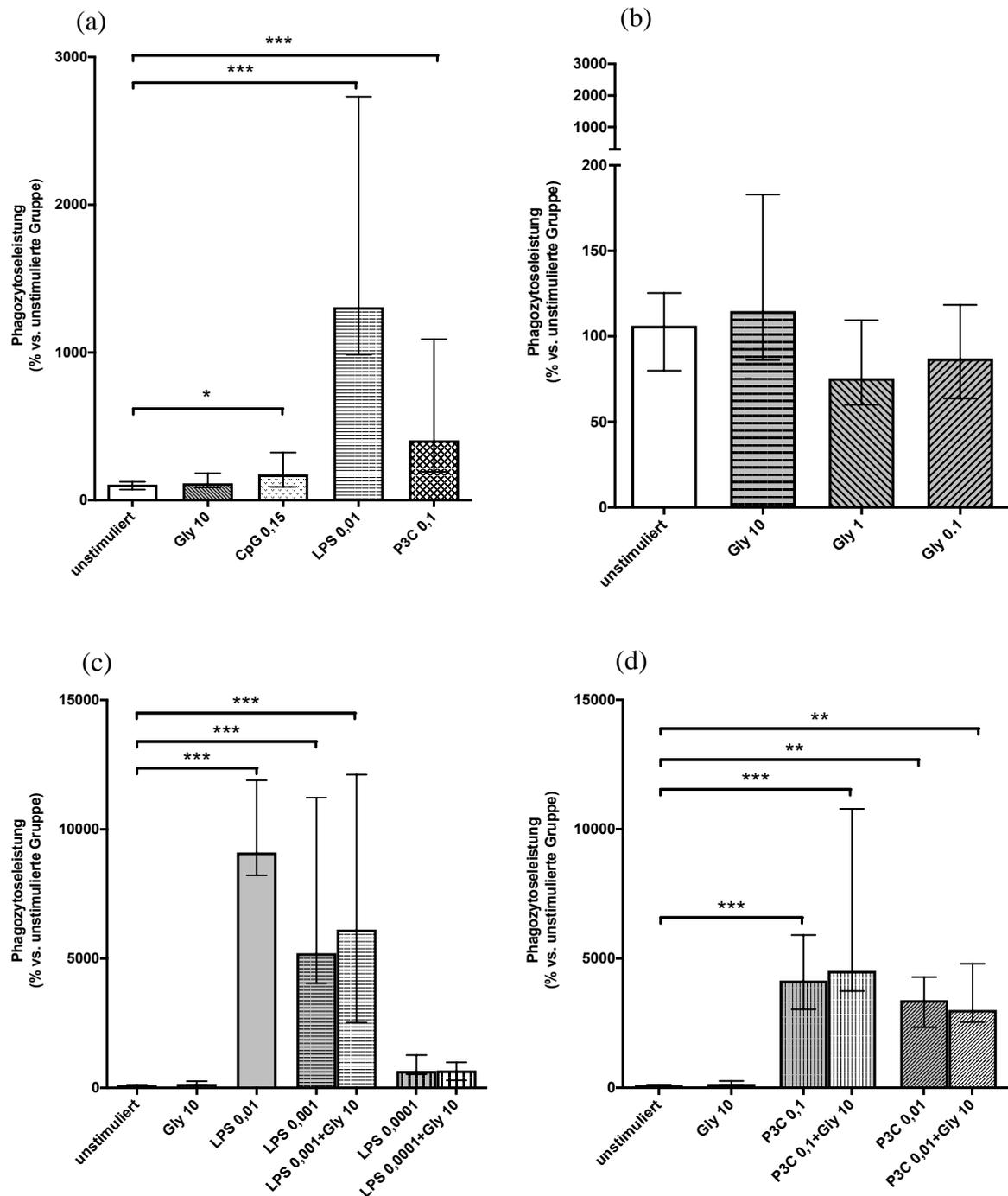
Unter dem Einfluss von LPS 0,001  $\mu\text{M}$  fiel bei den AMs von 20 Wochen alten Mäusen auf, dass die Phagozytoseleistung im Vergleich zu den Makrophagen von 10 Wochen alten Mäusen signifikant erhöht war (\*\* $p < 0,01$ ).



**Abbildung 3-15** Alter der Mäuse bei Präparation 10 (weiß) vs. 20 Wochen (grau): Relative Phagozytoseleistung (%) von AMs, die mit verschiedenen Stimulanzien inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung beider Kontrollgruppen wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\* $p < 0,01$ ). (a) LPS in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 17$ , Gly 10: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 16$ , LPS 0,01: weiß  $n = 4$ , grau  $n = 14$ , LPS 0,001: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 14$ , LPS 0,0001: weiß  $n = 7$ , grau  $n = 4$ ). (b) P3C in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 17$ , Gly 10: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 16$ , P3C 0,1: weiß  $n = 4$ , grau  $n = 14$ , P3C 0,01: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 11$ , P3C 0,001: weiß  $n = 8$ , grau  $n = 7$ ).

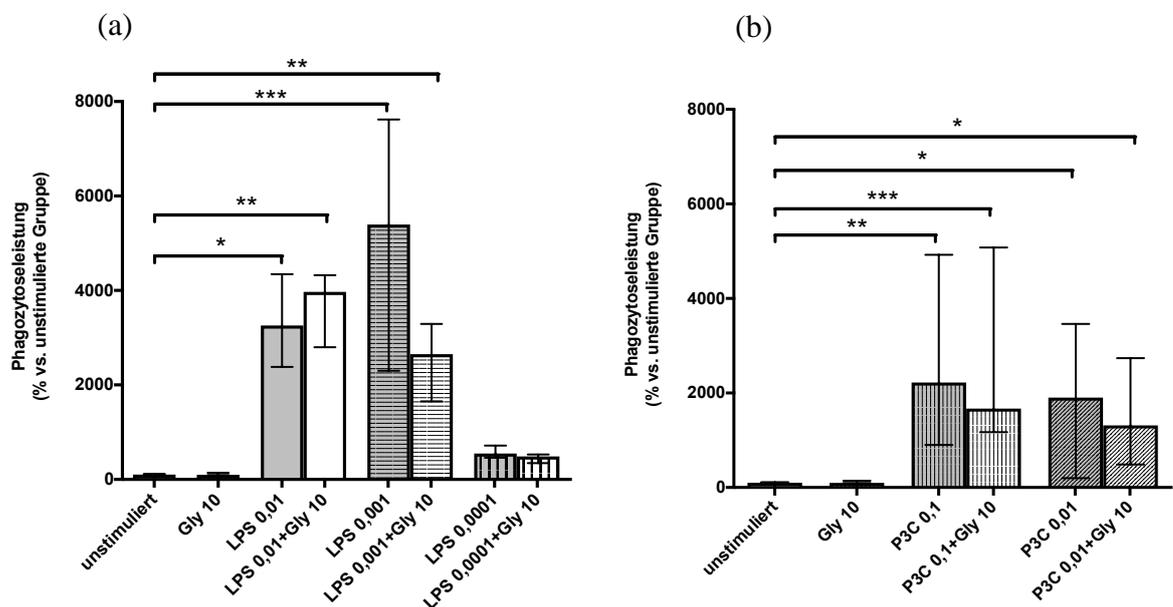
#### 3.4.3.2 Phagozytoseleistung der Peritonealmakrophagen

Bei PMs von 10 Wochen alten Mäusen führten LPS, P3C und CpG zu einer Erhöhung der Phagozytoseleistung im Vergleich zur Kontrollgruppe (a). Glycopyrronium führte in unterschiedlichen Konzentrationen wie vorher zu keiner signifikanten Steigerung der Bakterienaufnahme (b). Auch bei Kombination Toll-like-Rezeptor-Agonist + Glycopyrronium (c/d) ergab sich für den relevanten Vergleich mit und ohne Glycopyrronium keine signifikante Differenz. Auch hier hatte Glycopyrronium sowohl alleine als auch in Kombination mit einem Toll-like-Rezeptor-Agonisten keinen Einfluss auf die Bakterienphagozytose.



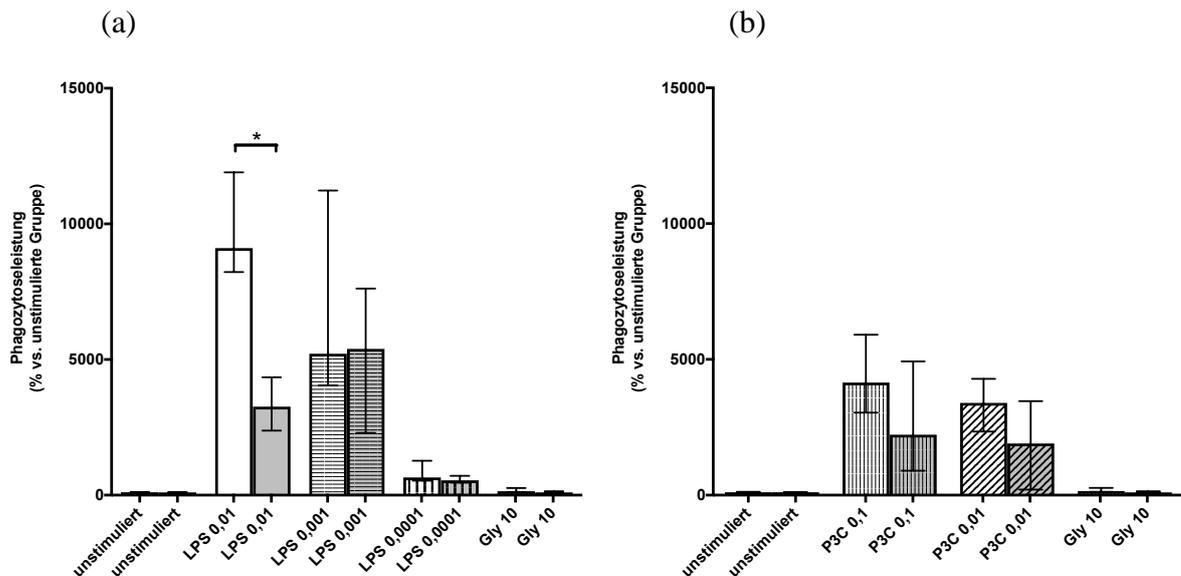
**Abbildung 3-16** Alter der Mäuse bei Präparation 10 Wochen: Relative Phagozytoseleistung (%) von PMs, die mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\*\*p < 0,001; \*\*p < 0,01; \*p < 0,05). (a) Alle Stimulanzen unterschiedlicher Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 53, Gly 10 n = 32, CpG 0,15 n = 31, LPS 0,01 n = 39, P3C 0,1 n = 44). (b) Glycopherronium in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert n = 36, Gly 10 n = 32, Gly 1 n = 19, Gly 0,1 n = 13). (c) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopherronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 10, Gly 10 n = 10, LPS 0,01 n = 9, LPS 0,001 n = 11, LPS 0,001+Gly 10 n = 10, LPS 0,0001 n = 11, LPS 0,0001+Gly 10 n = 10). (d) Auswirkung der Kombination P3C + Glycopherronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert n = 15, Gly 10 n = 15, P3C 0,1 n = 16, P3C 0,1+Gly 10 n = 15, P3C 0,01 n = 815 P3C 0,01+Gly 10 n = 15).

Bei PMs von 20 Wochen alten Mäusen wurde die Phagozytoseleistung durch die Toll-like-Rezeptor-Agonisten (LPS 0,01/0,001/0,0001  $\mu\text{M}$  und P3C 0,1/0,01  $\mu\text{M}$ ) mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,001$  und  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 3-17). Dargestellt ist der direkte Vergleich Toll-like-Rezeptor-Agonist mit und ohne Glycopyrronium (a) bei LPS und (b) bei P3C. Obwohl fast alle Gruppen signifikante Differenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwiesen, ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen der Doppelstimulation und der Einfachstimulation. Auch hier hatte Glycopyrronium sowohl alleine als auch in Kombination mit einem Toll-like-Rezeptor-Agonisten keinen Einfluss auf die Bakterienphagozytose.



**Abbildung 3-17** Alter der Mäuse bei Präparation 20 Wochen: Relative Phagozytoseleistung (%) von PMs, die mit verschiedenen Stimulanzien inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung der Kontrollgruppe wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ). Alle Konzentrationen in  $\mu\text{M}$ . (a) Auswirkung der Kombination LPS + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert  $n = 7$ , Gly 10  $n = 7$ , LPS 0,01  $n = 5$ , LPS 0,01+Gly 10  $n = 4$ , LPS 0,001  $n = 7$ , LPS 0,001+Gly 10  $n = 8$ , LPS 0,0001  $n = 4$ , LPS 0,0001+Gly 10  $n = 5$ ). (b) Auswirkung der Kombination P3C + Glycopyrronium auf die Phagozytoseleistung (unstimuliert  $n = 7$ , Gly 10  $n = 7$ , P3C 0,1  $n = 7$ , P3C 0,1+Gly 10  $n = 9$ , P3C 0,01  $n = 7$ , P3C 0,01+Gly 10  $n = 8$ ).

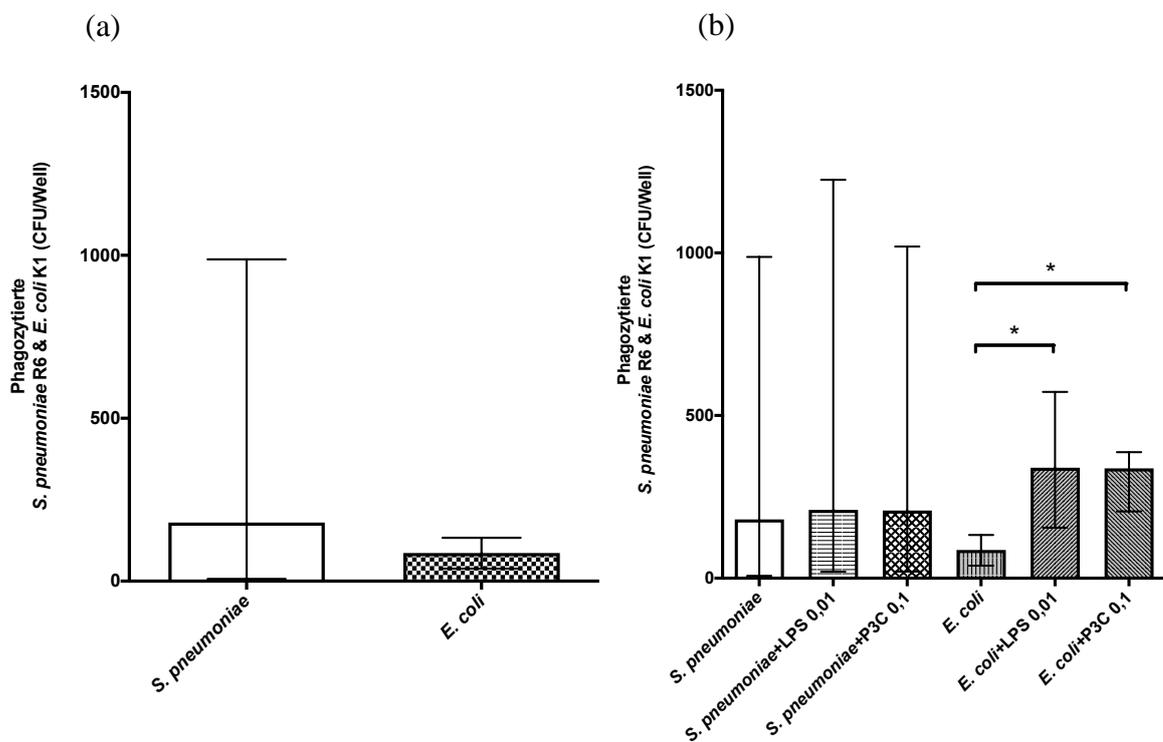
Die Abbildung 3-18 stellt die Phagozytoserate im Hinblick auf das Alter der präparierten Mäuse (damit auch der PMs) dar. (a) zeigt den Vergleich 10 vs. 20 Wochen bei LPS-, (b) bei P3C-Stimulation in jeweils unterschiedlichen Konzentrationen. Unter dem Einfluss von LPS 0,01  $\mu\text{M}$  fiel bei den PMs von 10 Wochen alten Mäusen auf, dass die Phagozytoseleistung im Vergleich zu den Makrophagen von 20 Wochen alten Mäusen signifikant erhöht war (\* $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3-18** Alter der Mäuse bei Präparation 10 (weiß) vs. 20 Wochen (grau): Relative Phagozytoseleistung (%) von PMs, die mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert worden waren und denen *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Die Phagozytoseleistung beider Kontrollgruppen wurde als 100% definiert. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\* $p < 0,05$ ). (a) LPS in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert: weiß  $n = 10$ , grau  $n = 7$ , LPS 0,01: weiß  $n = 9$ , grau  $n = 3$ , LPS 0,001: weiß  $n = 11$ , grau  $n = 7$ , LPS 0,0001: weiß  $n = 11$ , grau  $n = 4$ , Gly 10: weiß  $n = 10$ , grau  $n = 7$ ). (b) P3C in unterschiedlichen Konzentrationen in  $\mu\text{M}$  (unstimuliert: weiß  $n = 10$ , grau  $n = 7$ , P3C 0,1: weiß  $n = 11$ , grau  $n = 7$ , P3C 0,01: weiß  $n = 10$ , grau  $n = 7$ , Gly 10: weiß  $n = 10$ , grau  $n = 7$ ).

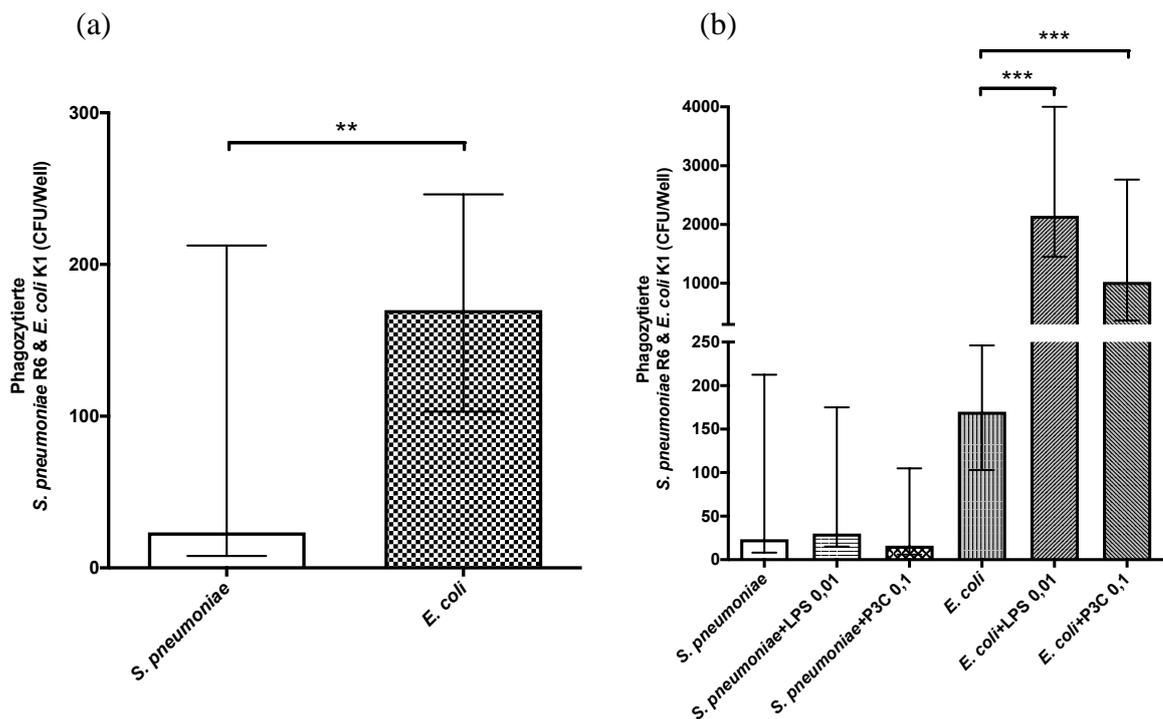
### 3.4.4 Vergleich *S. pneumoniae* R6 vs. *E. coli* K1

Durch die vorliegenden Ergebnisse wird deutlich, dass die AMs und PMs nur sehr unregelmäßig *S. pneumoniae* unter Normalbedingungen (unstimuliert) und stimuliert (LPS/P3C) phagozytierten. Bei den AMs in Abbildung 3-19 stellte sich dar, dass selbst die Kontrollgruppe unter hoher Ausgangsstimulation sehr großen Schwankungen unterlag (a) und die Zellen nicht durch Toll-like-Rezeptor-Agonisten stimuliert wurden (b). Hingegen zeigten die AMs bei den Versuchen mit *E. coli* eine signifikante Steigerung der Bakterien-Phagozytose unter Stimulation mit Toll-like-Rezeptor-Agonisten (\* $p < 0,05$ ).



**Abbildung 3-19** Vergleich der Bakterienstämme: Absolute Phagozytoseleistung (CFU/Well) von AMs, die mit verschiedenen Toll-like-Rezeptor-Agonisten inkubiert worden waren und denen jeweils *S. pneumoniae* R6 und *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\* $p < 0,05$ ). (a) Unstimulierte Kontrollgruppen (*S. pneumoniae* n = 12, *E. coli* n = 20). (b) Jeweils LPS & P3C in  $\mu\text{M}$  im direkten Vergleich (*S. pneumoniae*: Kontrolle n = 12, +LPS 0,01 n = 10, +P3C 0,1 n = 12; *E. coli*: Kontrolle n = 20, +LPS 0,01 n = 11, +P3C 0,1 n = 18).

In Abbildung 3-20 war bei *E. coli* im Vergleich zu *S. pneumoniae* die Phagozytoseleistung von PMs in der Kontrollgruppe signifikant erhöht (\*\* $p < 0,01$ ) (a). Es waren nur wenige intrazelluläre Bakterien nachweisbar, d.h. die Pneumokokken wurden kaum phagozytiert. Die Stimulation mit LPS und P3C hatte auch hier keinen signifikanten Effekt. Die mit LPS- und P3C-stimulierten PMs phagozytierten *E. coli* im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermehrt (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ) (b).

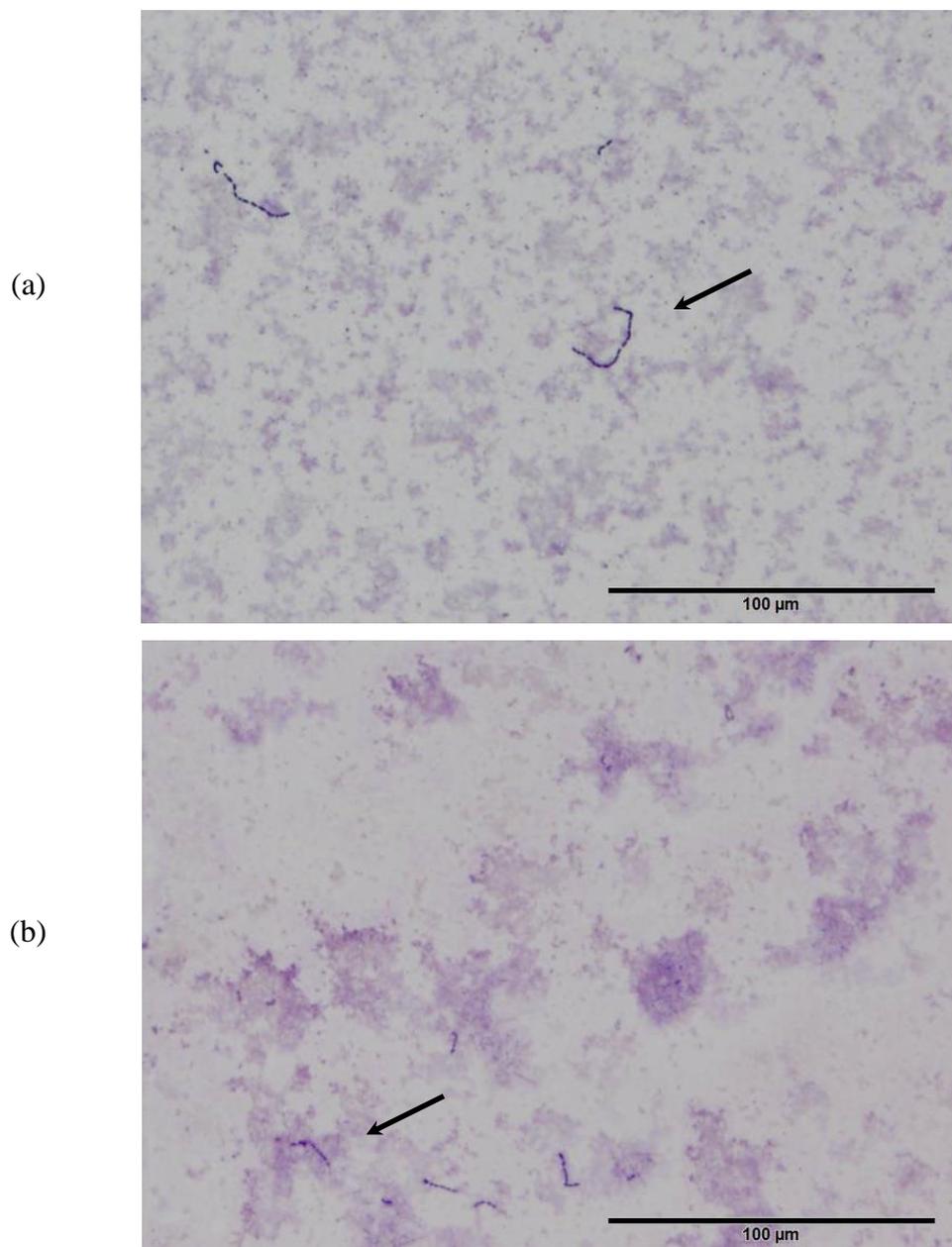


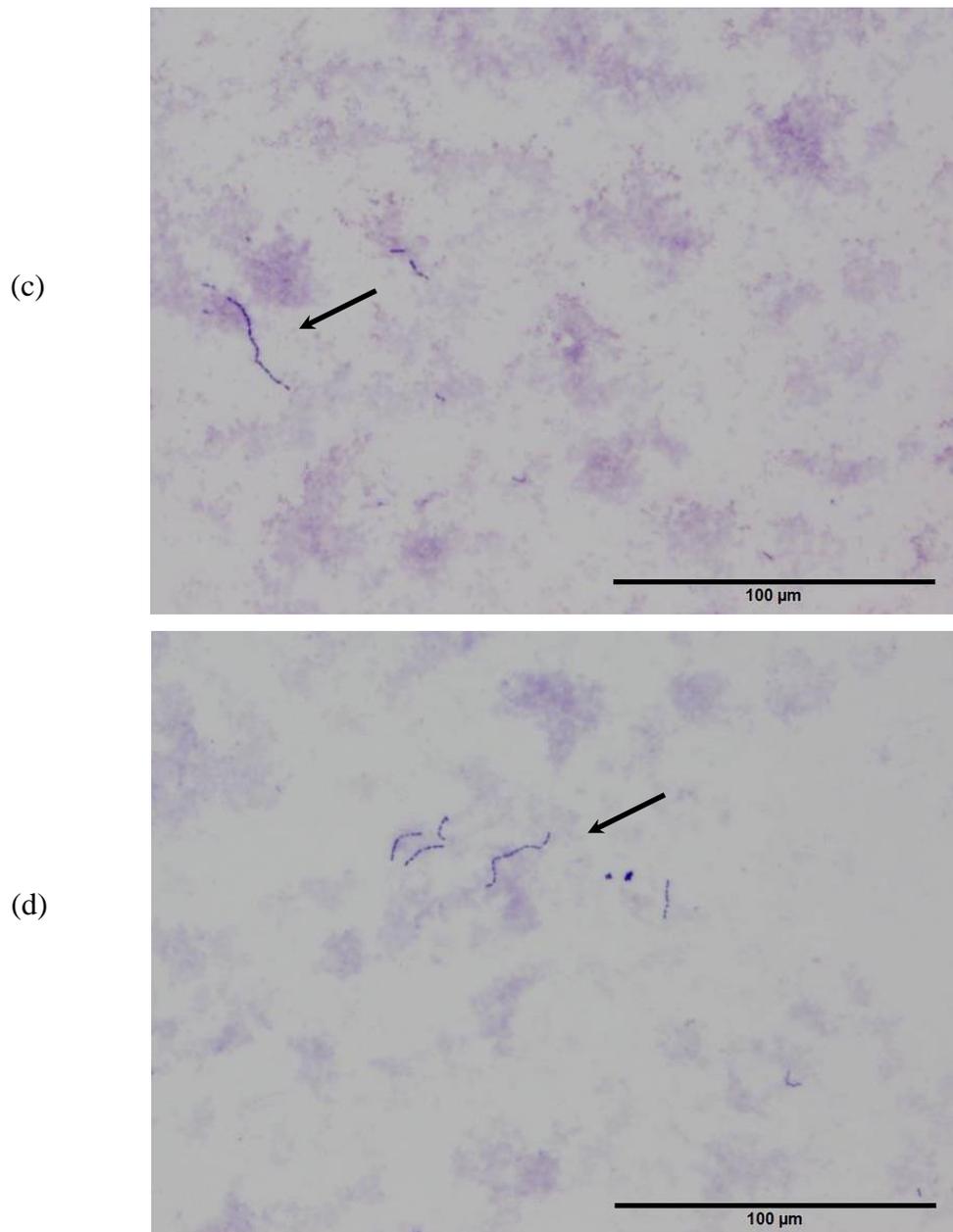
**Abbildung 3-20** Vergleich der Bakterienstämme: Absolute Phagozytoseleistung (CFU/Well) von PMs, die mit verschiedenen Toll-like-Rezeptor-Agonisten inkubiert worden waren und denen jeweils *S. pneumoniae* R6 und *E. coli* K1 zur Phagozytose angeboten wurden. Dargestellt sind die Medianwerte mit 25./75.-Perzentilen (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ; \*\*) ( $p < 0,01$ ; \*) ( $p < 0,05$ ). (a) Unstimulierte Kontrollgruppen (*S. pneumoniae* n = 40, *E. coli* n = 60). (b) Jeweils LPS & P3C in µM im direkten Vergleich (*S. pneumoniae*: Kontrolle n = 40, +LPS 0,01 n = 35, +P3C 0,1 n = 46; *E. coli*: Kontrolle n = 60, +LPS 0,01 n = 39, +P3C 0,1 n = 52).

### 3.5 Einfluss von Glycopyrronium auf die Morphologie der Bakterien

Abbildung 3-21 zeigt exemplarisch die zytologischen Färbungen der Überstände nach Phagozytose von *S. pneumoniae* R6 aus den Gruppen Kontrolle (a), Glycopyrronium 10  $\mu$ M (b), Glycopyrronium 1  $\mu$ M (c), Glycopyrronium 0,1  $\mu$ M (d).

Es kommt zu keiner Veränderung der Pneumokokken-Ketten unter dem Einfluss von Glycopyrronium. Ebenso ist auch keine Korrelation zwischen Konzentration von Glycopyrronium und Länge der Pneumokokken-Kette zu finden.





**Abbildung 3-21** Zytologische Färbungen der Überstände mit Methyleneblau nach der Phagozytose. Kalibrierung: 100 µm. (a) Kontrollgruppe, die mit Phosphatpuffer über 24 h inkubiert wurde. (b) Pneumokokken nach Inkubation mit Glycopyrronium 10 µM über 24 h (c) Pneumokokken nach Inkubation mit Glycopyrronium 1 µM über 24 h (d) Pneumokokken nach Inkubation mit Glycopyrronium 0,1 µM über 24 h.

## 4. Diskussion

In Deutschland waren 2010 schätzungsweise 6,8 Millionen Menschen an COPD erkrankt, bis 2030 wird mit einem Anstieg auf 7,9 Millionen gerechnet. Das entspricht derzeit ca. 10-12% aller Erwachsenen über 40 Jahre (Stoll 2018). Jeder fünfte Patient wird innerhalb eines Jahres aufgrund von Exazerbationen stationär behandelt (Miravitlles et al. 2007). Die Letalität nach Krankenhausaufenthalt liegt innerhalb des ersten Jahres zwischen 12 und 33% (Halpin et al. 2017). Die durch inhalative Gabe von Glycopyrronium hervorgerufene Bronchodilatation erzielt eine Verbesserung der Lungenfunktion bei Patienten mit COPD (Vogelmeier und Banerji 2011). Zudem zeigt sich eine Reduktion der Exazerbationen um mehr als ein Drittel (Kerwin et al. 2012). Die anfangs erwähnten lebensbedrohlichen Infektionen, verursacht durch *S. pneumoniae* und *E. coli*, treten gehäuft durch multiresistente Stämme ohne geeigneten Impfschutz auf (Ip et al. 2001). CBPs werden von allen Pneumokokken-Serotypen gebildet und lassen sich durch einen Überschuss an Cholin direkt inhibieren (Maestro et al. 2007; Hernández-Rocamora et al. 2009). Das nebenwirkungsreiche Spektrum von Cholin in hohen Konzentrationen steht jedoch dem klinischen Einsatz entgegen, sodass die bereits klinisch verwendeten Anticholinergika in therapeutischen Dosierungen für diese Arbeit in Frage kamen.

Deshalb bildet der Einfluss von Glycopyrronium als potentes Anticholinergikum auf die Phagozytose von *S. pneumoniae* und *E. coli* durch Makrophagen und Mikrogliazellen den Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit.

Neben der Wachstumskinetik der verwendeten Inokula wurde ein WST-1-Zellviabilitätstest mit den in den Phagozytoseversuchen eingesetzten Substanzen auf die Peritoneal- und Alveolarmakrophagen zum Ausschluss einer eventuellen Toxizität durchgeführt. Nach weiteren Vorversuchen zur Phagozytosedauer, Anzahl an Makrophagen/Well und Blutbeimischung im Well wurde der bewährte Phagozytose-Assay muriner Mikrogliazellen (Ribes et al. 2009) auf Peritoneal- und Alveolarmakrophagen übertragen und für *S. pneumoniae* und *E. coli* etabliert. Zusätzlich zu dem Einfluss der Inkubation von Bakterien mit Glycopyrronium während ihres Wachstums auf die Phagozytoseleistung der Makrophagen wurde bei den Phagozytoseversuchen der Einfluss des Alters der Mäuse vom Stamm C57BL/6J (10 und 20 Wochen alte Mäuse) untersucht.

## 4.1 Auswahl von Glycopyrronium und dessen Konzentration

Als Ribes et al. 2013 das Anticholinergikum Ipratropium und die Cholin funktionalisierten Dendrimere untersuchten, war die Phagozytoseleistung der Mikrogliazellen bei *S. pneumoniae* signifikant erhöht. Um diese Erkenntnisse zu erweitern, entschieden wir uns für den Einsatz von Glycopyrronium als gleichwertig potentes Anticholinergikum mit dem identischen Einsatzbereich in der Therapie der COPD. Hinzu kam die Tatsache, dass bei COPD häufig pulmonale Infektionen mit *S. pneumoniae* zu Exazerbationen führen (Sethi und Murphy 2008). Daher war besonders die Untersuchung der AMs als Zellen der ersten Immunabwehr ein Fokus dieser Arbeit.

Pahl et al. (2006) wiesen einen synergistischen Effekt von Glycopyrronium in Kombination mit einem Glucocorticoid bei humanen Monozyten in der Freisetzung von Tumornekrosefaktor-alpha nach. Hierbei verwendeten sie Glycopyrronium-Konzentrationen von 0,001  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$ . Diese hatten keinen Einfluss auf die Freisetzung von LPS-stimulierten Zytokinen aus den Monozyten.

Bei der Therapie der COPD werden inhalative Gaben einmal täglich von 44  $\mu\text{g}$  Glycopyrronium verabreicht. Unter dieser Einnahme konnte eine maximale Plasmakonzentration von ca. 0,5 nM gemessen werden. Nach ähnlich hoher gewichtsadaptierter inhalativer Gabe im tierexperimentellen Modell betrug die Plasmakonzentration bei Ratten maximal ca. 30 nM (Australian Public Assessment Report for Glycopyrronium 2013).

Infolgedessen entschieden wir uns für Konzentrationen des Glycopyrroniums in den Versuchsreihen mit Makrophagen und Mikrogliazellen von 0,3 nM bis 10  $\mu\text{M}$  mit dem Ziel, eine mögliche Phagozytose-steigernde Wirkung sicher abbilden zu können. Die Zytotoxizität der gewählten Konzentrationen konnte durch den Zellviabilitätstest sicher ausgeschlossen werden.

## 4.2 Diskussion der Methode

### 4.2.1 Bakterien

Die Kapsel von Pneumokokken stellt einen Virulenzfaktor dar und schützt die Bakterien vor der Phagozytose (Hoskins et al. 2001). Das Bakterium *S. pneumoniae* R6 ist hingegen unbekapselt. Daher ergibt sich eine gesteigerte Phagozytoserate bei diesem Pneumokokken-Stamm gegenüber dem bekapselten Stamm D39 (Tuomanen et al. 1995). Murine Mikrogliazellen phagozytieren ca. 10x mehr Pneumokokken vom Stamm R6 als D39 (Ribes et al. 2010).

Wegen des Vorteils der gesteigerten Phagozytoserate wählten wir den Pneumokokken-Stamm R6 aus. Bei allen Pneumokokken-Stämme sind CBPs zu finden (Crain et al. 1990; Yother und White 1994).

Bei *E. coli* sind bislang keine klassischen CBPs auf der Bakterienoberfläche bekannt. Eine direkte Inhibition von CBPs durch Anticholinergika wie bei den Pneumokokken-Stämmen ist somit unwahrscheinlich. Jedoch scheint eine indirekte Inhibition durch Cholinanaloga über spezifische zellwandgebundene Cholin-Transporter zu existieren (siehe 1.2.3). Landfald und Strøm (1986) beschrieben den Bet-Signalweg. Dieser führt letztendlich bei Inhibition zu Destabilisierung der Zelle (Tøndervik und Strøm 2007). Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit der gesteigerten Phagozytose von *E. coli*. Auch die verminderte Expression von betT mit folglich weniger Transportern (BetT) in der Zellwand, die Cholin in die Zelle aufnehmen und zu Betain umwandeln, könnte sich dysregulierend auf die Zelle auswirken.

In unseren Versuchen beobachteten wir keine Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose von *E. coli*. Grund hierfür könnte die fehlende Wirkung der daher vermutlich sehr schwachen Inhibition des Glycin-Betain-Signalweges sein. Die Hypothese einer Dysregulation der Zelle mit dem Effekt einer gesteigerten Phagozytose von *E. coli* kann demnach nicht bestätigt werden.

### 4.2.2 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Um die Bakterienkonzentrationen so genau wie möglich zu bestimmen, war es nötig Verdünnungsreihen auszuplattieren und so einzelne Kolonien zu detektieren (siehe Abbildung 2-1; 2-2). Einzelne Bakterienzellen können entweder eine eigene Kolonie bilden oder aber bei starker räumlicher Begrenzung auf der Blutagarplatte fälschlicherweise mit anderen Zellen zu einer Kolonie fusionieren. Die Anzahl der lebenden Zellen lässt sich nicht

fehlerfrei bestimmen, weil trotz Verdünnung einzelne Bakterienzellen aneinanderkleben können und dann zusammen eine CFU bilden. Für die Auswertung wurden deshalb die CFUs verwendet. Dementsprechend wurden CFUs mit nicht zählbar hoher Dichte und unverhältnismäßig hoher Anzahl in großen Verdünnungsstufen vernachlässigt.

Im Allgemeinen sind Messunsicherheiten durch Fehlereinflüsse beim Pipettieren und ungenügendes Durchmischen einer Suspension oder des Verdünnungsmediums nicht vollkommen auszuschließen (siehe 2.9.5). Durch mehrfache Wiederholung der Experimente sowie genaues und sorgfältiges Arbeiten konnten diese Fehlerquellen auf das Geringste reduziert werden.

#### **4.2.3 Gewinnung von Makrophagen**

Zhang et al. beschrieben 2008 ein detailliertes Verfahren zur Isolation von murinen Peritoneal- und Alveolarmakrophagen. Das Anlernen und Beherrschen dieser Techniken stellte sich für die Gewinnung der PMs im Vergleich zu den AMs einfacher dar (siehe 2.5.1). Die Präparation der Trachea und damit Gewinnung von AMs erforderte viel Geschick bei Vorhandensein mehrerer kleiner verletzlicher Strukturen im Halsbereich der Maus (siehe 2.5.2). Durch schonende und blutungsarme Präparation konnte eine hohe Ausbeute an vitalen Zellen erreicht werden.

Bei der Gewinnung von Makrophagen kam es gelegentlich zur Kontamination durch Blutzellen, zum einen durch die Injektionsnadel bei intraperitonealer Punktion, zum anderen durch die Präparation der Trachea und möglicher intrapulmonaler Verletzung bei Kanülierung durch die Braunüle®. Die Blut-kontaminierten Proben waren sowohl makroskopisch durch blutig tingiertes Material als auch mikroskopisch aufgefallen. In den Vorversuchen zeigte sich, dass eine Blutbeimengung die Phagozytoseleistung unter LPS und P3C falsch-positiv beeinflusst. Ein stimulatorischer Effekt der Blutbeimengung auf Glycopyrronium konnte jedoch ausgeschlossen werden. Resultierend wurde kontaminiertes zytologisches Material verworfen. Möglich wäre, dass trotz mikro- und makroskopischer Sichtung des Materials eine geringe Menge an Blutbestandteilen die Versuche beeinflusste. Diese mögliche Fehlerquelle ließ sich durch eine große Anzahl an unabhängigen Experimenten und viele Stichproben möglichst geringhalten.

### 4.3 Auswirkung von Glycopyrronium auf das Wachstum von *S. pneumoniae* und *E. coli* sowie die Morphologie der Bakterien

Glycopyrronium beeinflusste in den untersuchten Konzentrationen nicht das Bakterienwachstum von *S. pneumoniae* und *E. coli*. Wir konnten definitiv sicherstellen, dass durch Glycopyrronium keinerlei Modifizierung der Wachstumskinetik vorliegt und per se kein wachstumshemmender oder wachstumsfördernder Einfluss auf die Bakterien besteht. Dieser Effekt hätte sonst die Auswertung der gesamten Folgeversuche erschwert.

Die Morphologie der Bakterien betreffend kam es zu keiner Veränderung der Pneumokokken-Ketten unter dem Einfluss von Glycopyrronium. Eine Korrelation zwischen Konzentration von Glycopyrronium und Länge der Pneumokokken-Ketten konnte nicht bestätigt werden. Es scheint als würde schon die unveränderte Morphologie vorgeben, dass Glycopyrronium keine Auswirkung auf die CBPs hat. Die von Ribes et al. (2013) verwendeten Cholin-funktionalisierten Dendrimere erzielten die Formation langer Pneumokokken-Ketten, welche leicht durch Mikrogliazellen phagozytiert wurden. Bei LytA/B mutierten Pneumokokken-Stämmen bildete sich eine Kettenlänge von über 100 Zellen. Die Mutation verhinderte die Pneumokokken-Zellseparation am Ende der Zellteilung (García et al. 1999). Unserer Hypothese entsprechend sind längere Kokken-Ketten ein leichteres Ziel für die Makrophagen. Umgekehrt können kurze Pneumokokken-Ketten aufgrund ihrer geringen Größe Komplementablagerungen und anschließendes Eliminieren durch professionelle Phagozyten effektiver umgehen (Dalia und Weiser 2011). *S. pneumoniae* ist als Diplokokke vor allem bei einer Sepsis zu finden, um die geringste Angriffsfläche für Makrophagen zu bieten (Rodriguez et al. 2012).

## 4.4 Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose von Makrophagen und Mikrogliazellen

Der bewährte Phagozytose-Assay muriner Mikrogliazellen (Ribes et al. 2009) konnte auf Peritoneal- und Alveolarmakrophagen übertragen werden. In Vorversuchen wurden die Phagozytosedauer und die Anzahl der Makrophagen/Well für *S. pneumoniae* und *E. coli* festgelegt.

### 4.4.1 Auswirkung der Phagozytosedauer und Anzahl der Makrophagen/Well auf die Phagozytose

Die Annahme, je länger die Inkubationszeit mit den Pneumokokken, umso höher die Phagozytoseleistung der Makrophagen, konnte durch unsere Versuche nicht belegt werden. Der größte Unterschied bei der Phagozytose von *S. pneumoniae* nach Stimulation mit dem TLR-1/2-Agonisten war für die kürzeste Inkubationszeit nach 30 min zu messen (siehe Abbildung 3-7). Vermutlich bestand zu Beginn der Inkubation mit Pneumokokken eine hohe Aktivität der Makrophagen durch eine anfänglich hohe Bakteriendichte. Je länger die Inkubationszeit, umso geringer die extrazelluläre Dichte bei zunehmender Anzahl intrazellulärer Bakterien. Ein potentieller Sättigungseffekt mit Immobilität der Makrophagen wäre weiter zu erforschen. Auch die unter dem Mikroskop nachgewiesene kurze Kettenlänge der Pneumokokken könnte sich im zeitlichen Verlauf verstärkt auf die Umgehung der Phagozytose auswirken. Die vorbekannte optimale Inkubationszeit für *E. coli* wurde mit 90 min beibehalten (Ribes et al. 2009).

60 000 Makrophagen/Well ergaben nach Ko-Inkubation mit dem TLR-1/2-Agonisten eine signifikante Steigerung der Phagozytoseleistung ( $p = 0,0001$ ), die bei der Hälfte dieser Anzahl an Makrophagen, 30 000 Makrophagen/Well, nicht nachweisbar war (siehe Abbildung 3-8). Eine geringe Phagozytoseleistung verursacht durch eine zu geringe Anzahl an Makrophagen konnten wir so durch permanentes Arbeiten mit 60 000 phagozytierenden Zellen/Well ausschließen.

#### 4.4.2 Keine Auswirkung von Glycopyrronium auf die Phagozytose

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von Makrophagen und Mikrogliazellen durch TLR-1/2-, TLR-4- oder TLR-9-Agonisten ihre Fähigkeit erhöhen, sowohl *S. pneumoniae* als auch *E. coli* zu phagozytieren.

Glycopyrronium hingegen hatte in der Auswertung aller Versuche konzentrationsunabhängig keine Auswirkung auf die Phagozytoseleistung. Weder die Peritoneal- und Alveolarmakrophagen noch die Mikrogliazellen ließen sich signifikant stimulieren. Wir prüften dazu die Phagozytoseleistung mit Ko-Inkubation von Glycopyrronium und den einzelnen TLR- Agonisten, auch hier blieb der Erfolg aus. Entgegen unserer Hypothese ergab sich in den hier durchgeführten Versuchen kein Hinweis das Glycopyrronium die Cholin-bindenden Proteine der Pneumokokken inhibierte. Die unter 1.2.3 beschriebenen CBPs gelten bei Pneumokokken als sicher erforschte Virulenzfaktoren. In früheren Arbeiten ist zum Beispiel der Funktionsverlust von LytB einhergehend mit einer verringerten nasopharyngealen Besiedlung von *S. pneumoniae* bei Ratten dokumentiert (Gosink et al. 2000). Bei unseren Versuchen gab es demnach keinen Funktionsverlust von LytA oder LytB. Die natürliche Autolyse und Zellseparation zum Trennen einzelner Pneumokokken erfolgte ungehindert (García et al. 1999). Bestätigend hierzu war die unveränderte Morphologie der Pneumokokken (siehe 4.3). Für die vermuteten CBPs bei *E. coli* ergab sich in unseren Versuchen kein Hinweis, sodass auch hier kein Einfluss messbar war (siehe 4.2.1).

In allen Versuchen wurde Glycopyrronium mit der Stimulation durch TLR-1/2-, TLR-4- oder TLR-9-Agonisten verglichen. Die in der Einleitung beschriebenen TAs und LTAs sind Liganden des TLR-2 (Haddadi et al. 2015). Wird dieser mit TLR-1/2-Agonisten stimuliert, kann eine Steigerung der Phagozytoseleistung erreicht werden (Ribes et al. 2009; 2010). Die Steigerung durch TLR-Agonisten zeigte im Bakterienvergleich sogar innerhalb der Gruppen teilweise erhebliche Schwankungen. Lediglich die Mikrogliazellen wurden durch alle drei TLR-Agonisten signifikant stimuliert, sodass sich eine gesteigerte Phagozytose von *S. pneumoniae* darstellte. Im Vergleich *S. pneumoniae* vs. *E. coli* ergab die Stimulation von PMs und AMs mit TLR-Agonisten in der Zusammenschau der jeweiligen Versuche unterschiedliche Phagozytoseleistungen von Pneumokokken (siehe Abbildungen 3-19 und 3-20). Diese große Streubreite der phagozytierten Pneumokokken in den einzelnen Versuchen ist möglicherweise auf die beschriebenen CBPs bei *S. pneumoniae* zurückzuführen. Diese Virulenzfaktoren können daher für die erschwerte Phagozytose der Pneumokokken verantwortlich sein (Crain et al. 1990). Selbst die eigentlich unstimulierte

Kontrollgruppe der Pneumokokken unterlag sehr großen Schwankungen trotz hoher Anzahl an Wells (AMs n = 12; PMs n = 40). Diese erhöhte Ausgangsstimulation kann einerseits durch Kontamination mit Stimulanzen bei den Pipettierarbeiten, wie unter 4.2.2 beschrieben, bedingt gewesen sein. Andererseits lässt sich eine peritoneale und pulmonale Vorstimulation der phagozytierenden Zellen in situ unmittelbar vor Präparation nicht sicher ausschließen. Letztendlich kann die genaue Ursache für Schwankungen der Phagozytose an dieser Stelle nicht geklärt werden. *E. coli* hingegen wurde immer mit TLR-Agonisten stimulierten Peritoneal- und Alveolarmakrophagen vermehrt phagozytiert. Auffällig hierbei sind die Altersgruppen im direkten Vergleich (10 vs. 20 Wochen). AMs älterer Mäuse (20 Wochen) entwickelten anders, als zu erwarten war, eine signifikant gesteigerte Phagozytose nach Stimulation mit TLR-4-Agonisten (siehe Abbildung 3-15). Wong et al. (2017) erforschten das Altern der AMs hinsichtlich der Auswirkung auf die Phagozytose. Unter anderem induzierte das Altern der AMs die Retention von neutrophilen Granulozyten in der Lunge während einer pulmonalen Infektion und sorgte so für eine Beeinträchtigung der Phagozytose. In unseren Versuchen könnten die AMs jüngerer Mäuse jedoch aufgrund der kurzen Zeit nach Geburt noch nicht vollständig ausgereift sein. Somit hatten die AMs älterer Mäuse eine gesteigerte Phagozytose. Zur Bestätigung dieser Vermutung sind erneute Versuche mit einem größeren Altersunterschied wie z. B. 20 Wochen vs. 10 Monate empfehlenswert.

Andersherum verhalten sich die PMs jüngerer Mäuse (10 Wochen). Diese PMs haben eine signifikant erhöhte Phagozytoseleistung nach Stimulation mit TLR-4-Agonisten (siehe Abbildung 3-18). Bei älteren Mäusen verschlechtert sich das Immunsystem mit resultierender Infektanfälligkeit. Linehan et al. (2014) konnten nachweisen, dass PMs von jungen Mäusen, die in das Peritoneum alter Mäuse injiziert wurden, eine beeinträchtigte Phagozytose haben. Sie führten diese altersbedingten Defekte der Phagozytose auf die Veränderung der Gewebefaktoren des Peritoneums zurück.

## 4.5 Ausblick

Obwohl all unsere Experimente auf einen fehlenden Effekt von Glycopyrronium auf die Phagozytose von *S. pneumoniae* und *E. coli* durch Makrophagen und Mikrogliazellen hinwiesen, stellt die Forschung mit synthetischen Strukturen, die CBPs inhibieren, weiterhin einen interessanten Aspekt dar. Ribes et al. (2013) zeigten erfolgreich den Phagozytosesteigernden Effekt durch Inhibition der CBPs mit Strukturen auf, die Cholinendgruppen enthalten. Trotz der negativen Ergebnisse dieser Arbeit stehen heute die CBPs noch immer als Ziel der antimikrobiellen Therapie der Pneumokokken im Vordergrund. Die aktuelle Forschung legt nahe, CBPs könnten als Phagozytose-Enhancer vielversprechende nicht lytische antimikrobielle Kandidaten, basierend auf der natürlichen Aktivierung des Immunsystems, darstellen (Roig-Molina et al. 2020). Es folgen daher sicherlich noch weitere Arbeiten zu den CBPs und deren Einsatz zur Bekämpfung von Pneumokokken-Infektionen, besonders vor dem Hintergrund eines nicht vorhandenen Impfschutzes gegen alle Pneumokokken-Serotypen und der fortschreitenden Entwicklung von multiresistenten Stämmen (Cartwright 2002).

Abschließend birgt einerseits die Anwendung von Glycopyrronium in der bronchodilatatorischen Therapie der COPD kein Risiko hinsichtlich einer medikamentös-getriggerten erhöhten pulmonalen Infektanfälligkeit. Andererseits zeigen unsere Ergebnisse, dass das klinische Bild einer foudroyanten pneumogenen Sepsis nicht durch die vorherige inhalative Therapie und der damit vermuteten verstärkten pulmonalen Abwehrmechanismen verhindert werden kann.

## 5. Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* sind verantwortlich für eine Vielzahl von lebensbedrohlichen Infektionen wie Pneumonie, Sepsis und Meningitis. Multiresistente Erreger verbreiten sich trotz der Durchführung von Impfungen zunehmend, da ein Impfschutz nur gegen eine begrenzte Anzahl an Pneumokokken-Serotypen gewährleistet werden kann. Für *Escherichia coli* gibt es nur zur Vorbeugung von Harnwegsinfektionen eine Impfung. Cholin-bindende Proteine auf der Oberfläche zumindest aller Pneumokokken wirken als Virulenzfaktor und bieten so ein therapeutisches Ziel zur Bekämpfung von Pneumokokken-Infektionen. Die Inhibition dieser Cholin-bindenden Proteine durch potente Anticholinergika wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um eine erhöhte Phagozytose von Pneumokokken durch ein modifiziertes Bakterienwachstum zu erzielen. Wir vermuteten bei *Escherichia coli* eine indirekte Inhibition über cholinerge Transporter auf der Zellwand zur Synthese von Glycin-Betain und damit der Zellstabilität.

In dieser Arbeit wurde daher die Auswirkung von Glycopyrronium auf das Bakterienwachstum und die Bakterien-Phagozytose durch murine Peritonealmakrophagen, Alveolarmakrophagen und Mikrogliazellen von *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* untersucht. Glycopyrronium bindet an cholinerge Rezeptoren und wird hauptsächlich zur Behandlung von Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung eingesetzt. Durch eine verbesserte Lungenfunktion wird die Anzahl der Exazerbationen reduziert und möglicherweise eine Infektion durch eine erhöhte Phagozytoserate abgeschwächt. *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* wurden während ihres Wachstums mit Glycopyrronium inkubiert. Zudem wurden sie zur Bestimmung der Phagozytoseleistung mit den mit Glycopyrronium und Toll-like-Rezeptor-Agonisten stimulierten Makrophagen und Mikrogliazellen ko-inkubiert.

Glycopyrronium beeinflusste in den untersuchten Konzentrationen nicht das Bakterienwachstum von *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*. Ebenfalls beeinflusste es nicht die Länge der Kokken-Ketten von *Streptococcus pneumoniae*. Darüber hinaus hatte Glycopyrronium keine Auswirkung auf die Fähigkeit von Peritoneal- und Alveolarmakrophagen sowie Mikrogliazellen, *Streptococcus pneumoniae* oder *Escherichia coli* zu phagozytieren.

Entgegen den Erwartungen ergab sich in den hier durchgeführten Versuchen kein Hinweis das Glycopyrronium konzentrationsunabhängig die Cholin-bindenden Proteine der

Pneumokokken inhibierte. Ebenso war für Glycopyrronium in den hier durchgeführten Versuchen keine gesteigerte Phagozytose durch Inhibition cholinergischer Transporter auf der Zellwand bei *Escherichia coli* nachweisbar. Da Glycopyrronium keine Beeinträchtigung der Bakterien-Phagozytose der Makrophagen und Mikrogliazellen zeigte, kann es unbedenklich als Therapeutikum eingesetzt werden. Die pulmonale Infektanfälligkeit wird zum einen durch Glycopyrronium nicht gesteigert. Zum anderen führt der Gebrauch des Medikamentes während eines bestehenden Infektes zu keinem Schaden.

Auch heute noch stehen die Cholin-bindenden Proteine als Ziel der antimikrobiellen Therapie im Fokus der Forschung. Durch Inhibition dieser Cholin-bindenden Proteine lässt sich die Verbreitung aller Pneumokokken-Serotypen bei geringer Wahrscheinlichkeit der Resistenzbildung eindämmen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ali-Melkkilä T, Kanto J, Iisalo E (1993): Pharmacokinetics and related pharmacodynamics of anticholinergic drugs. *Acta Anaesthesiol Scand* 37, 633–642
- Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T (2001): Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 51, 443–456
- Australian Public Assessment Report (AusPAR) for Glycopyrronium from 10 July 2013: Therapeutic Goods Administration (TGA), Australian Government, Department of Health and Ageing; Sponsored by Novartis Pharmaceuticals Australia Pty Ltd; Woden, Australia 2013
- Bauer HW, Bessler WG (2016): Nicht antibiotische Strategien zur Rezidivprophylaxe von unkomplizierten Harnwegsinfektionen der Frau. *Aktuelle Urol* 47, 214–219
- Beeh KM, Singh D, di Scala L, Drollmann A (2012): Once-daily NVA237 improves exercise tolerance from the first dose in patients with COPD: the GLOW3 trial. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 7, 503–513
- Bergmann S, Hammerschmidt S (2006): Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* 152, 295–303
- Bigna JJ, Kenne AM, Asangbeh SL, Sibetcheu AT (2018): Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease in the global population with HIV: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 6, e193–e202
- Bowden DH (1984): The alveolar macrophage. *Environ Health Perspect* 55, 327–341
- Briles DE, Paton JC, Mukerji R, Swiatlo E, Crain MJ (2019): Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr* 7, GPP3-0028-2018
- Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AMB, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB et al. (2007): International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet Lond Engl* 370, 741–750
- Calix JJ, Porambo RJ, Brady AM, Larson TR, Yother J, Abeygunwardana C, Nahm MH (2012): Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 Strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem* 287, 27885–27894
- Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005): The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 5, 685–694
- Cartwright K (2002): Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr* 161, 188–195

- Cassado A dos A, D'Império Lima MR, Bortoluci KR (2015): Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* 6, 225
- Chen CH, Lai CC, Wang YH, Wang CY, Wang HC, Yu CJ, Chen L (2018): The impact of sepsis on the outcomes of COPD patients: a population-based cohort study. *J Clin Med* 7, 393
- Connors AF, Dawson NV, Thomas C, Harrell FE, Desbiens N, Fulkerson WJ, Kussin P, Bellamy P, Goldman L, Knaus WA (1996): Outcomes following acute exacerbation of severe chronic obstructive lung disease. The SUPPORT investigators (Study to Understand Prognoses and Preferences for Outcomes and Risks of Treatments). *Am J Respir Crit Care Med* 154, 959–967
- Cornu C, Yzèbe D, Léophonte P, Gaillat J, Boissel JP, Cucherat M (2001): Efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccine in immunocompetent adults: a meta-analysis of randomized trials. *Vaccine* 19, 4780–4790
- Crain MJ, Waltman WD, Turner JS, Yother J, Talkington DF, McDaniel LS, Gray BM, Briles DE (1990): Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 58, 3293–3299
- Dalia AB, Weiser JN (2011): Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. *Cell Host Microbe* 10, 486–496
- Daneman R (2012): The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72, 648–672
- Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR (2011): A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* 41, 2155–2164
- del Rio-Hortega P, Penfield W: *Cytology & cellular pathology of the nervous system: Microglia*. Hoeber, New York 1932
- Donaldson GC, Wedzicha JA (2006): COPD exacerbations 1: Epidemiology. *Thorax* 61, 164–168
- d'Urzo A, Ferguson GT, van Noord JA, Hirata K, Martin C, Horton R, Lu Y, Banerji D, Overend T (2011): Efficacy and safety of once-daily NVA237 in patients with moderate-to-severe COPD: the GLOW1 trial. *Respir Res* 12, 156
- Ebert S, Gerber J, Bader S, Mühlhauser F, Brechtel K, Mitchell TJ, Nau R (2005): Dose-dependent activation of microglial cells by Toll-like receptor agonists alone and in combination. *J Neuroimmunol* 159, 87–96
- El Moujabber G, Osman M, Rafei R, Dabboussi F, Hamze M (2017): Molecular mechanisms and epidemiology of resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Middle East region. *J Med Microbiol* 66, 847–858
- Franko BV, Lunsford CD (1960): Derivatives of 3-pyrrolidinols. III. The chemistry, pharmacology, and toxicology of some N-substituted-3-pyrrolidyl alpha-substituted phenylacetates. *J Med Pharm Chem* 2, 523–540

- García P, García J, García E, López R (1986): Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* 43, 265–272
- García P, González MP, García E, López R, García JL (1999): LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* 31, 1275–1281
- García-Aymerich J, Serra Pons I, Mannino DM, Maas AK, Miller DP, Davis KJ (2011): Lung function impairment, COPD hospitalisations and subsequent mortality. *Thorax* 66, 585–590
- Gehre F, Spisek R, Kharat AS, Matthews P, Kukreja A, Anthony RM, Dhodapkar MV, Vollmer W, Tomasz A (2009): Role of teichoic acid choline moieties in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 77, 2824–2831
- Ghosn EEB, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg Leonard A., Herzenberg Leonore A. (2010): Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2568–2573
- Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013): Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* 7, 45
- Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR (2000): Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 68, 5690–5695
- Haddadi S, Thapa S, Kameka AM, Hui J, Czub M, Nagy E, Muench G, Abdul-Careem MF (2015): Toll-like receptor 2 ligand, lipoteichoic acid is inhibitory against infectious laryngotracheitis virus infection in vitro and in vivo. *Dev Comp Immunol* 48, 22–32
- Halbert RJ, Natoli JL, Gano A, Badamgarav E, Buist AS, Mannino DM (2006): Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 28, 523–532
- Halpin DM, Miravittles M, Metzdorf N, Celli B (2017): Impact and prevention of severe exacerbations of COPD: a review of the evidence. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 12, 2891–2908
- Hammerschmidt S, Bethe G, H. Remane P, Chhatwal GS (1999): Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 67, 1683–1687
- Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch U-K (2002): Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16, 2113–2122
- Hernández-Rocamora VM, Maestro B, de Waal B, Morales M, García P, Meijer EW, Merckx M, Sanz JM (2009): Multivalent choline dendrimers as potent inhibitors of pneumococcal cell-wall hydrolysis. *Angew Chem Int Ed* 48, 948–951

- Hoskins J, Alborn WE, Arnold J, Blaszcak LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu D-J, Fuller W et al. (2001): Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183, 5709–5717
- Ip M, Lyon DJ, Cheng AFB (2001): Patterns of antibiotic resistance, serotype distribution, and patient demographics of *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Chemotherapy* 47, 110–116
- John TM, Deshpande A, Haessler S, Brizendine K, Yu PC, Imrey P, Rothberg MB (2018): 1457. *Escherichia coli* community acquired pneumonia. *Open Forum Infect Dis* 5, S451–S451
- Kerwin E, Hébert J, Gallagher N, Martin C, Overend T, Alagappan VKT, Lu Y, Banerji D (2012): Efficacy and safety of NVA237 versus placebo and tiotropium in patients with COPD: the GLOW2 study. *Eur Respir J* 40, 1106–1114
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011): Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91, 461–553
- Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B (2016): Biological and epidemiological features of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in pre- and post-conjugate vaccine eras: a United States perspective. *Clin Microbiol Rev* 29, 525–552
- Kribben A, Uppenkamp M, Heemann U, Höffkes HG, Meusers P (1995): [Postsplenectomy sepsis (overwhelming postsplenectomy infection (OPSI) syndrome)]. *Dtsch Med Wochenschr* 120, 771–775
- Lamark T, Røkenes TP, McDougall J, Strøm AR (1996): The complex bet promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J Bacteriol* 178, 1655–1662
- Landfald B, Strøm AR (1986): Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 165, 849–855
- Linehan E, Dombrowski Y, Snoddy R, Fallon PG, Kissenpfennig A, Fitzgerald DC (2014): Aging impairs peritoneal but not bone marrow-derived macrophage phagocytosis. *Aging Cell* 13, 699–708
- Maestro B, González A, García P, Sanz JM (2007): Inhibition of pneumococcal choline-binding proteins and cell growth by esters of bicyclic amines. *FEBS J* 274, 364–376
- Mirakhur RK, Dundee JW, Jones CJ (1978): Evaluation of the anticholinergic actions of glycopyrronium bromide. *Br J Clin Pharmacol* 5, 77–84
- Miravittles M, Anzueto A, Legnani D, Forstmeier L, Fargel M (2007): Patient's perception of exacerbations of COPD—the PERCEIVE study. *Respir Med* 101, 453–460
- Nesta B, Pizza M: Vaccines Against *Escherichia coli*. In: Frankel G, Ron EZ (Hrsg.): *Escherichia coli*, a versatile pathogen (Current topics in microbiology and immunology). Springer International Publishing, Cham 2018, 213–242

- Nichol KL, Baken L, Wuorenma J, Nelson A (1999): The health and economic benefits associated with pneumococcal vaccination of elderly persons with chronic lung disease. *Arch Intern Med* 159, 2437–2442
- Nwannunu CE, Limmer AL, Coleman K, Shah R, Patel RR, Mui UN, Tying SK (2019): Glycopyrronium Tosylate (Qbrexza) for hyperhidrosis. *Skin Ther Lett* 24, 1–3
- Pahl A, Bauhofer A, Petzold U, Cnota PJ, Maus J, Brune K, Szelenyi S (2006): Synergistic effects of the anti-cholinergic R,R-glycopyrrolate with anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 72, 1690–1696
- Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) (1997) *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* 46, 1–24
- Ribes S, Ebert S, Czesnik D, Regen T, Zeug A, Bukowski S, Mildner A, Eiffert H, Hanisch UK, Hammerschmidt S, Nau R (2009): Toll-like receptor prestimulation increases phagocytosis of *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and *Escherichia coli* K1 strains by murine microglial cells. *Infect Immun* 77, 557–564
- Ribes S, Ebert S, Regen T, Agarwal A, Tauber SC, Czesnik D, Spreer A, Bunkowski S, Eiffert H, Hanisch UK et al. (2010): Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect Immun* 78, 865–871
- Ribes S, Riegelmann J, Redlich S, Maestro B, Waal B de, Meijer EW, Sanz JM, Nau R (2013): Multivalent choline dendrimers increase phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* R6 by microglial cells. *Chemotherapy* 59, 138–142
- Rodrigo C, Lim WS (2014): The Relevance of pneumococcal serotypes. *Curr Infect Dis Rep* 16, 403
- Rodríguez JL, Dalia AB, Weiser JN (2012): Increased chain length promotes pneumococcal adherence and colonization. *Infect Immun* 80, 3454–3459
- Roig-Molina E, Sánchez-Angulo M, Seele J, García-Asencio F, Nau R, Sanz JM, Maestro B (2020): Searching for antipneumococcal targets: choline-binding modules as phagocytosis enhancers. *ACS Infect Dis* 6, 954–974
- Rote Liste® Service GmbH (Hrsg.): Rote Liste 2019 online. [www.rote-liste.de](http://www.rote-liste.de), aufgerufen am 15.12.2019. Frankfurt/Main 2019
- Russo TA, Johnson JR (2000): Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 181, 1753–1754
- Russo TA, Johnson JR (2003): Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5, 449–456
- Sallam M, Abbadi J, Natsheh A, Ababneh NA, Mahafzah A, Özkaya Şahin G (2019): Trends in antimicrobial drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates at Jordan University Hospital (2000–2018). *Antibiot Basel Switz* 8, 41

- Sanchez-Puelles JM, Ronda C, Garcia JL, Garcia P, Lopez R, Garcia E (1986): Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* 158, 289–293
- Schoell AR, Heyde BR, Weir DE, Chiang PC, Hu Y, Tung DK (2009): Euthanasia method for mice in rapid time-course pulmonary pharmacokinetic studies. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS* 48, 506–511
- Sethi S (2010): Infection as a comorbidity of COPD. *Eur Respir J* 35, 1209–1215
- Sethi S, Murphy TF (2001): Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clin Microbiol Rev* 14, 336–363
- Sethi S, Murphy TF (2008): Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 359, 2355–2365
- Stadmiller SS, Gorenssek-Benitez AH, Guseman AJ, Pielak GJ (2017): Osmotic shock induced protein destabilization in living cells and its reversal by glycine betaine. *J Mol Biol* 429, 1155–1161
- Ständige Impfkommission (STIKO): Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: August 2019; in: *Epidemiologisches Bulletin* Nr. 34; hrsg. v. Robert-Koch- Institut, Berlin 2019, 313-364
- Stenutz R, Weintraub A, Widmalm G (2006): The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30, 382–403
- Steppuhn H, Kuhnert R, Scheidt-Nave C (2017): 12-month prevalence of known chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in Germany. *Journal of Health Monitoring* 2(3), 43–50
- Stoll J. (2018): COPD.  
<https://www.umweltbundesamt.de/themen/gesundheit/umweltmedizin/copd>;  
aufgerufen am 12.05.2020
- Takahashi K, Yamamura F, Naito M (1989): Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J Leukoc Biol* 45, 87–96
- Tøndervik A, Strøm AR (2007): Membrane topology and mutational analysis of the osmotically activated BetT choline transporter of *Escherichia coli*. *Microbiol Read Engl* 153, 803–813
- Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR (1995): Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332, 1280–1284
- Ulrik CS (2012): Once-daily glycopyrronium bromide, a long-acting muscarinic antagonist, for chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review of clinical benefit. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 7, 673
- Viniol C, Vogelmeier CF (2018): Exacerbations of COPD. *Eur Respir Rev* 27, 170103

- Vlahos R, Bozinovski S (2014): Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Immunol* 5, 435
- Vogelmeier C, Banerji D (2011): NVA237, a long-acting muscarinic antagonist, as an emerging therapy for chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis* 5, 163–173
- Vogelmeier C, Buhl R, Burghuber O, Criée C-P, Ewig S, Godnic-Cvar J, Hartl S, Herth F, Kardos P, Kenn K et al. (2018): Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD). *Pneumologie* 72, 253–308
- Wong CK, Smith CA, Sakamoto K, Kaminski N, Koff JL, Goldstein DR (2017): Aging impairs alveolar macrophage phagocytosis and increases influenza-induced mortality in mice. *J Immunol* 199, 1060–1068
- World Health Organization. Global Health Estimates 2016: Disease burden by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2016. Geneva, Switzerland 2018
- Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillemins M, Misharin A et al. (2013): Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38, 79–91
- Yother J, White JM (1994): Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* 176, 2976–2985
- Zhang X, Goncalves R, Mosser DM (2008): The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 83, 14.1.1-14.1.14

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Roland Nau, meinem Doktorvater, für die stetige und unentwegte Unterstützung bei der Durchführung wie auch der Korrektur dieser Arbeit. Ich habe die vielfältige Ideengebung sehr zu schätzen gewusst.

Frau PD Dr. rer. nat. Sandra Ribes danke ich für ihr außerordentliches Engagement, ihre gute Betreuung und die gründliche Einführung in die Laborarbeit.

Ich danke allen anderen Mitdoktoranden für die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Stephanie Bunkowski danke ich für ihre andauernde Hilfsbereitschaft und Zuarbeit.

Herrn Peter Lange aus der Abteilung Neurologie danke ich für seine Unterstützung bei den ELISA-Messungen.

Für die Überlassung des Pneumokokken-Stamms danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.

Für die Überlassung des E.-coli-Stamms danke ich Herrn Dr. Gregor Zysk, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.