

**Die Koinfektion von Influenza A
Virus/*Staphylococcus aureus* und deren Einfluss auf
Surfactant Protein A im humanen Alveolus-on-a-
Chip Modell**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Elisabeth Schicke
geboren am 20.05.1992 in Leipzig**

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. Bettina Löffler, Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Universitätsklinikum Jena
2. Frau Prof. Dr. Christina Ehrhardt, Sektion Experimentelle Virologie,
Universitätsklinikum Jena
3. Frau Prof. Dr. Barbara Kahl, Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Universitätsklinikum Münster

Tag der öffentlichen Verteidigung

19.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Die Pneumonie	3
1.1.2 Die sekundäre bakterielle Infektion einer Influenzainfektion als Ursache der Pneumonie	3
1.2 Influenza Viren	5
1.2.1 Aufbau des IAV	5
1.2.2 Replikation	6
1.2.3 Variabilität	8
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.3.1 Virulenzfaktoren von <i>S. aureus</i>	10
1.4 Der letale Synergismus von IAV und <i>S. aureus</i>	11
1.5 Abwehrsysteme der Lunge	15
1.5.1 Pulmonales Surfactant	16
1.5.2 Makrophagen	23
1.6 Modelle zur Untersuchung der pulmonalen Koinfektion	28
1.6.1 <i>In vitro</i> Modelle	28
1.6.2 <i>In vivo</i> Modelle	29
1.6.3 Humanes Alveolus-on-a-Chip Modell	29
2 Ziele der Arbeit	31
3 Publierte Originalarbeiten	32
3.1 Co-infection with <i>Staphylococcus aureus</i> after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model	32

Stefanie Deinhardt-Emmer, Knut Rennert, Elisabeth Schicke, Zoltán Cseresnyés, Maximilian Windolph, Sandor Nietzsche, Regine Heller, Fatina Siwczak, Karoline Frieda Haupt, Swen Carlstedt, Michael Schacke, Marc Thilo Figge, Christina Ehrhardt, Bettina Löffler und Alexander S. Mosig, Biofabrication, Volume 12, Number 2, S. 1-18, 2020

3.2	<i>Staphylococcus aureus</i> Lung Infection Results in down-Regulation of Surfactant Protein-A Mainly caused by Pro-Inflammatory Macrophages	32
	Elisabeth Schicke, Zoltán Cseresnyés , Knut Rennert, Vanessa Vau, Karoline Frieda Haupt, Franziska Hornung, Sandor Nietzsche, Fatina Swiczak, Michaela Schmidtke, Brigitte Glück, Mirijam Koch, Michael Schacke, Regine Heller, Alexander S. Mosig, Marc Thilo Figge, Christina Ehrhardt, Bettina Löffler und Stefanie Deinhardt-Emmer, Microorganisms, Volume 8. Number 4, S. 1-18, 2020	
4	Diskussion.....	82
4.1	Etablierung eines human-spezifischen <i>in vitro</i> Modells.....	82
4.1.1	Zelllinien des hAC-Modells	82
4.1.2	Der dynamische Fluss und die Kokultur mit Makrophagen erhöhen die Barriereintegrität	84
4.1.4	Stärken und Grenzen des hAC-Modells.....	85
4.2	Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion am hAC-Modell	86
4.3	Untersuchung des Einflusses der Koinfektion auf Surfactant Protein A.....	89
5	Schlussfolgerung.....	92
6	Literatur-und Quellenverzeichnis	94
	Anhang	106
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	106
	Danksagung	107

Abkürzungsverzeichnis

AM	Alveolarmakrophagen
CAM	Zelladhäsionsmoleküle (engl. cell adhesion molecule)
CFU	koloniebildende Einheit (engl. colony forming unit)
CRD	Lektindomäne der Surfactant-Proteine (engl. carbohydrate recognition domain)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
HA	Hämagglutinin
hAC Modell	humanes Alveolus-on-a-Chip Modell
IAV	Influenza A Virus
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1/CCL2	monocyte chemotactic protein 1
MOTiF Biochip	multi-organ-tissue-flow Biochip
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	Neuraminidase/n
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Periphere Blutmonozyten (engl. peripheral blood mononuclear cells)
p.i.	post infectionem
PVL	Panton-Valentin-Leukozidin
qRT-PCR	quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SP-A/D	Surfactant Protein A/D
ssPA/ScpA	Cysteinprotease Staphopain A
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Zusammenfassung

Pneumonien gehören zu den häufigsten Infektionserkrankungen der Welt. Virale Infektionen durch Influenza A Virus (IAV) verursachen Epidemien und Pandemien, die mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität einhergehen können. Durch die hohe genetische Variabilität des Virus ist die Entwicklung eines Impfstoffes herausfordernd und die Möglichkeit weiterer Pandemien gegeben. Insbesondere bakterielle Sekundärinfektionen (im weiteren auch Koinfektion genannt) scheinen ein Grund für schwere klinische Verläufe von Influenzavirusinfektionen zu sein. Ein häufig nachgewiesenes Bakterium sekundärer Pneumonien ist *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), das bei etwa 20-30% der Bevölkerung den Nasenvorhof kommensal besiedelt. Diese Kolonisation ist einer der Risikofaktoren, an einer sekundären Pneumonie zu erkranken. Influenzaviren und *S. aureus* wirken während einer Infektion auf mehreren Ebenen zusammen und führen so zu einer stärkeren Infektion und Schädigung der Lunge. Zur Pathogenabwehr der Lunge gehören u.a. Makrophagen und Surfactant Protein A (SP-A). Makrophagen tragen entscheidend zum Inflammationsgeschehen bei und können ein Grund einer lungenschädlichen, überschießenden Immunantwort sein. SP-A übernimmt Aufgaben der nicht-adaptiven Immunantwort. Es kann jedoch in seiner Konzentration reduziert werden u.a. von dem durch Makrophagen exprimierten Zytokin TNF- α und durch die *S. aureus* Cysteinprotease Staphopain A (ssPA, ScpA). Ein verringertes pulmonales SP-A verlangsamt die Pathogenabwehr und erhöht die Anfälligkeit der Lunge für weitere eindringende Krankheitserreger.

Aktuell werden zur Untersuchung der Koinfektion hauptsächlich Monozellkulturen und Mausmodelle verwendet. Diese Modelle haben einige Grenzen: I) Einige bakterielle Toxine sind spezies-spezifisch, weshalb sich die vielfach verwendeten Mausmodelle nur bedingt eignen. II) Zellkulturmodelle mit menschlichen Zellen sind häufig nicht in der Lage, die Differenzierung und Expression alveolus-spezifischer Marker aufrecht zu erhalten. III) Eine detaillierte Untersuchung der Pathogenese der Koinfektion erfordert die physiologische Interaktion der verschiedenen alveolus-spezifischen Zelltypen.

Ziele dieser Arbeit waren daher I) die Etablierung eines human-spezifischen *in vitro* Modells, II) die Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion und III) die Analyse der Auswirkungen einer Koinfektion auf das SP-A in diesem Modell.

Das humane Alveolus-on-a-Chip (hAC) Modell besteht aus zwei Kammern, die durch eine Membran voneinander getrennt sind. In der oberen Kavität wurden NCI-H441 Zellen als

Typ-II-Pneumozyten und aus peripheren Blutmonozyten (PBMC) differenzierte Makrophagen kokultiviert. In der unteren Kammer befanden sich als endotheliale Zelllinie HUVECs. Um die Physiologie des Alveolus nachzubilden, befand sich auf alveolärer Seite Luft und auf endothelialer Seite wurde ein Mediumfluss angelegt, durch den die Versorgung der Zellen gewährleistet wurde. Verglichen wurden die Ergebnisse des hAC Modells mit den Resultaten von Monozellkulturen und von Tierversuchen mit Mäusen.

Das Modell war in der Lage eine hohe Barriereintegrität und die Produktion von pulmonalem Surfactant über 14 Tage aufrechtzuerhalten. Der dynamische Fluss und die Kokultivierung mit Makrophagen erhöhten die Barrierefunktion des Modells. Die Koinfektion von IAV und *S. aureus* induzierte eine starke Inflammationsantwort, die sich bis auf das Endothel ausbreitete und abhängig von der Zellinteraktion mit Makrophagen war. Während die Einzelnfektion keinen Einfluss auf die Barriereintegrität hatte, kam es während der Koinfektion zu massiven endothelialen Schäden und einem Verlust der Barrierefunktion. Die Koinfektion führte weiterhin zu einer erhöhten bakteriellen Last. Das Modell hat sich als immunreaktiv erwiesen und ist geeignet, um die Zellantwort und -interaktion während einer Infektion sowie die Ausbreitung der Pathogene zu untersuchen. Potenziale der Weiterentwicklung des Modells liegen beispielsweise im Hinzufügen von Granulozyten und dem Ersetzen der NCI-H441 durch primäre Alveolarepithelzellen.

Bei der Betrachtung des Einflusses der Koinfektion von IAV und *S. aureus* auf SP-A war maßgeblich *S. aureus* für die Reduktion von SP-A verantwortlich. Während das Bakterium die Proteinkonzentration in der Monozellkultur verringerte, hatten weder das Virus noch *S. aureus* Einfluss auf die SP-A mRNA-Expression. Diese wurde jedoch massiv durch TNF- α herabgesetzt. Während einer Infektion produzieren proinflammatorische Makrophagen große Mengen an TNF- α . Im hAC-Modell zeigte sich der Einfluss des durch die Makrophagen produzierten TNF- α auf SP-A durch eine geringere intrazelluläre Proteinkonzentration während der Koinfektion. In einem Pneumonie-Mausmodell konnte bestätigt werden, dass *S. aureus* die SP-A Konzentration *in vivo* senkt.

Die Arbeit untersuchte ein neues immunreaktives *in vitro* Zellmodell, das in der Lage ist, die komplexe Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen sowie zwischen Pathogen und Wirt zu spiegeln. Das Modell erlaubt es, die Ausbreitung der Pathogene zu verfolgen und durch die Infektion hervorgerufene funktionelle und morphologische Veränderungen zu charakterisieren. Die durch die Koinfektion erhöhte Zytokinausschüttung, die gestörte Barriereintegrität und die verringerte SP-A Konzentration könnten zu den Ursachen für die schweren klinischen Verläufe gehören, die bei Superinfektion und sekundären Pneumonien beobachtet werden.

1 Einleitung

1.1 Die Pneumonie

Die Pneumonie ist eine akut oder chronisch verlaufende mikrobielle Infektion des Lungengewebes und verzeichnet eine hohe Sterblichkeit weltweit. Davon sind v.a. Kinder unter 5 Jahre in Entwicklungsländern und Erwachsene über 75 Jahren in den Industrieländern betroffen (Ruuskanen et al., 2011). In Deutschland kommt es zu 400.000 bis 600.000 ambulanten Neuerkrankungen pro Jahr, von denen zwischen 30-50% eine stationäre Behandlung benötigen (Höffken et al., 2009). Gekennzeichnet ist der typische Pneumonieverlauf durch einen sehr plötzlichen Beginn mit Fieber, Schüttelfrost, Luftnot, Husten und rotbraunem Sputum (Hopstaken et al., 2003). Das Erregerspektrum variiert stark in Abhängigkeit der saisonalen Gegebenheiten sowie der untersuchten Patientenpopulation. Häufig werden Bakterien wie *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) nachgewiesen. Auch respiratorische Viren gehören zum Erregerspektrum (Höffken et al., 2009). Komplikationen viraler Pneumonien entstehen häufig durch eine bakterielle Sekundärinfektion. Beispielsweise war während der Influenzapandemie im Jahr 2009 die Koinfektion mit *S. aureus* besonders häufig mit Todesfällen assoziiert (Rice et al., 2012). Sehr schwerwiegende Infektionen zeichnen sich durch eine unregulierte Immunantwort mit einer erhöhten Zytokin- und Chemokinproduktion, einer massiven Immunzelleinwanderung, einer schädlichen Inflammation und einer hohen Keimanzahl aus (Klemm et al., 2017, Gao et al., 2013, Lee et al., 2011, Yu et al., 2011, Loffler et al., 2013). Außerdem kann es zu endothelialen Veränderungen mit einer erhöhten Permeabilität kommen, wodurch ein Gefäßleck und Ödeme entstehen (Huertas et al., 2018).

1.1.2 Die sekundäre bakterielle Infektion einer Influenzainfektion als Ursache der Pneumonie

Das Influenzavirus verursacht jedes Jahr Epidemien, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden sind. Im Jahr 2017/2018 kam es in Deutschland zu 60.000 Influenzavirus bedingten Krankenhausaufnahmen und 1.674 labordiagnostisch bestätigten Todesfällen. Die Exzess-Mortalität befindet sich jedoch weit darüber und lag in den letzten Jahren häufig oberhalb der 20.000 (Buda et al., 2018). In den vergangenen 100 Jahren war das Virus außerdem für 4 Pandemien verantwortlich, von denen die letzte nur 11 Jahre zurück liegt (Buchholz et al., 2016). Während eines Pandemiejahres kann bis zu 50% der

Bevölkerung durch Influenzaviren infiziert sein und die Mortalität kann noch höher liegen als während einer Epidemie (Morens et al., 2008, Simonsen, 1999). Es ist vor allem von Influenza A Viren (IAV) bekannt, dass sie Pandemien auslösen. Zu den Pandemien zählen die Spanische Grippe von 1918 durch den Subtyp A(H1N1), die Asiatische Grippe von 1957 Subtyp A(H2N2), die Hong Kong Grippe von 1968 Subtyp A(H3N2) und die Schweinegrippe von 2009 Subtyp A(H1N1) (Morens et al., 2008, Buchholz et al., 2016). Vor allem die Spanische Grippe hatte eine überdurchschnittlich hohe Sterblichkeitsrate. Von den 50 Millionen Todesopfern starben etwa 426.000 in Deutschland (Johnson and Mueller, 2002, Buchholz et al., 2016). Untypischer Weise für eine Grippeinfektion, verstarben viele junge Menschen zwischen 20 und 40 Jahren. Heutzutage wird davon ausgegangen, dass bakterielle Sekundärinfektionen der Grund für die hohe Mortalität waren (Morens et al., 2008). Auch während der späteren Pandemien, stellten Koinfektion durch Bakterien, die den oberen Respirationstrakt besiedelten, eine häufige Komplikation dar (Chertow and Memoli, 2013, Morens et al., 2008). Zum bakteriellen Erregerspektrum gehörten *S. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und Gruppe A Streptokokken und *S. aureus* (Siemens et al., 2017). Während 1918 noch Streptokokken zu den wichtigsten Erregern der sekundären Infektion gehörten, war es bereits im Jahr 1958 *S. aureus*, der hauptsächlich für tödliche Verläufe verantwortlich gemacht wurde (Robertson et al., 1958, Louria et al., 1959, Morens et al., 2008). Immer häufiger werden in den letzten Jahren auch Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme mit schweren Erkrankungen und Todesfällen assoziiert (Finelli et al., 2008, Chertow and Memoli, 2013). Während der Influenzapandemie von 2009 starben weltweit 284.000 Menschen. Etwa 1/3 der Krankheitsfälle, die auf Intensivstationen (ITS) behandelt wurden und die Hälfte aller Todesfälle, waren durch eine sekundäre bakterielle Pneumonie gekennzeichnet. Der am häufigsten isolierte Pathogen war *S. aureus*, von denen über die Hälfte wiederum zu den MRSA zählten. Risikofaktoren für eine Koinfektion sind das Alter, wobei vor allem Kinder unter 5 Jahren und Erwachsene über 65 Jahren betroffen sind, chronische Erkrankungen, eine vorliegende Immunsuppression und eine Schwangerschaft (Papanicolaou, 2013). Außerdem sind zusätzlich 20-50% der Bevölkerung kommensal durch *S. aureus* besiedelt (Wertheim et al., 2005). Eine Kolonisation erhöht das Risiko, an einer IAV-Infektion zu versterben (Chertow and Memoli, 2013). Eines der wirksamsten Mittel, um eine Koinfektion zu verhindern, ist die Impfung gegen Influenzaviren (Morens et al., 2008). Durch die Pandemie von 2009 zeigten sich deutlich die Herausforderungen, die eine Impfung an das Gesundheitssystem stellt. (1) Das Virus unterliegt ständigen Veränderungen, was es erschwert, eine wirksame Impfung zu entwickeln. (2) Die Anzahl von Immuninkompetenten, chronisch Kranken und

die der alternden Bevölkerung wächst und vergrößert die Gruppe der Menschen mit Risikofaktoren (Papanicolaou, 2013). (3) Der Anteil der MRSA Stämme von den die Bevölkerung kolonisierenden *S. aureus* Stämmen nimmt zu (Finelli et al., 2008, Mulcahy and McLoughlin, 2016b, Wertheim et al., 2005). Es ist sehr wahrscheinlich, dass es in Zukunft weitere Influenzapandemien geben wird, deren Zeitpunkt und Ätiologie nicht vorhergesagt werden kann. Zu der wichtigsten Prophylaxe gehören eine wirksame Antibiotikatherapie, Impfungen (Morens et al., 2008, Taubenberger and Morens, 2008) und ein verbessertes Verständnis der Koinfektion.

1.2 Influenza Viren

Influenza Viren besitzen eine hohe genetische Variabilität und verursachen saisonal auftretende respiratorische Infektionskrankheiten. Die Influenzaviren A, B und C sind drei der Genera, die zur Familie der Orthomyxoviridae gehören (Bouvier and Palese, 2008). Die Influenzaviren B und C wurden bisher beinahe ausschließlich beim Menschen isoliert, während IAV bei vielen Warmblütern u.a. Vögeln, Menschen, Schweinen und Pferden gefunden werden können. Als natürliches Reservoir für IAV dienen Wasservögel (Taubenberger and Morens, 2008). IAV werden anhand ihrer Oberflächenantigene Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen unterteilt. Es gibt 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidasetypen, von denen HA1, HA2, HA3 und NA1 und NA2 beim Menschen vorkommen. Die restlichen Subtypen treten hauptsächlich bei Vögeln auf (Taubenberger and Morens, 2008, Bouvier and Palese, 2008).

1.2.1 Aufbau des IAV

Das Influenzavirus A besitzt ein Virusgenom aus acht unterschiedlich langen, einzelsträngigen **RNA-Segmenten** negativer Orientierung, die jeweils mindestens ein Protein kodieren. Dank dieser Genomsegmentierung können Influenzaviren genetisches Material austauschen, was eine Voraussetzung für ihre außerordentlich hohe Variabilität ist (Bouvier and Palese, 2008, Pflug et al., 2017). Die RNA-Moleküle sind von **Nukleoproteinen (NP)** umhüllt und an die **Polymerase-Untereinheiten PB1, PB2 und PA** gebunden, die eine RNA-abhängige RNA-Polymerase-Aktivität besitzen. Sie können eigene Transkriptions- und Replikationsaktivität im Kern entfalten. Gemeinsam bilden sie den viralen **Ribonukleoprotein- (RNP-)** Komplex in Form eines helikalen Nukleokapsid (Portela and Digard, 2002). Der Virionkern wird von einer Lipidhülle umgeben, die hauptsächlich aus der Plasmamembran der Wirtszelle besteht. In diese sind Membranproteine eingebettet: die viralen Glykoproteine **Hämagglutinin (HA)** und

Neuraminidase (NA), die beide als Spikes über die Virusoberfläche herausragen und das **Matrixprotein M2**, das als Ionenkanal dient (Das et al., 2010, Gamblin and Skehel, 2010, Bouvier and Palese, 2008). Auf der Innenseite wird die Lipidmembran durch das **Matrixprotein M1** ausgekleidet. Außerdem besitzen Influenzaviren noch die **Nichtstrukturproteine NS1** und **NS2** (Abb. 1). NS2, auch Nuclear Export Protein (NEP) genannt, fördert den Transport neu gebildeter Nukleokapside aus dem Zellkern der Wirtszelle (Bouvier and Palese, 2008, Portela and Digard, 2002). NS1 übernimmt verschiedene regulatorische Funktionen wie z.B. die Hemmung der Interferonproduktion (Bouvier and Palese, 2008).

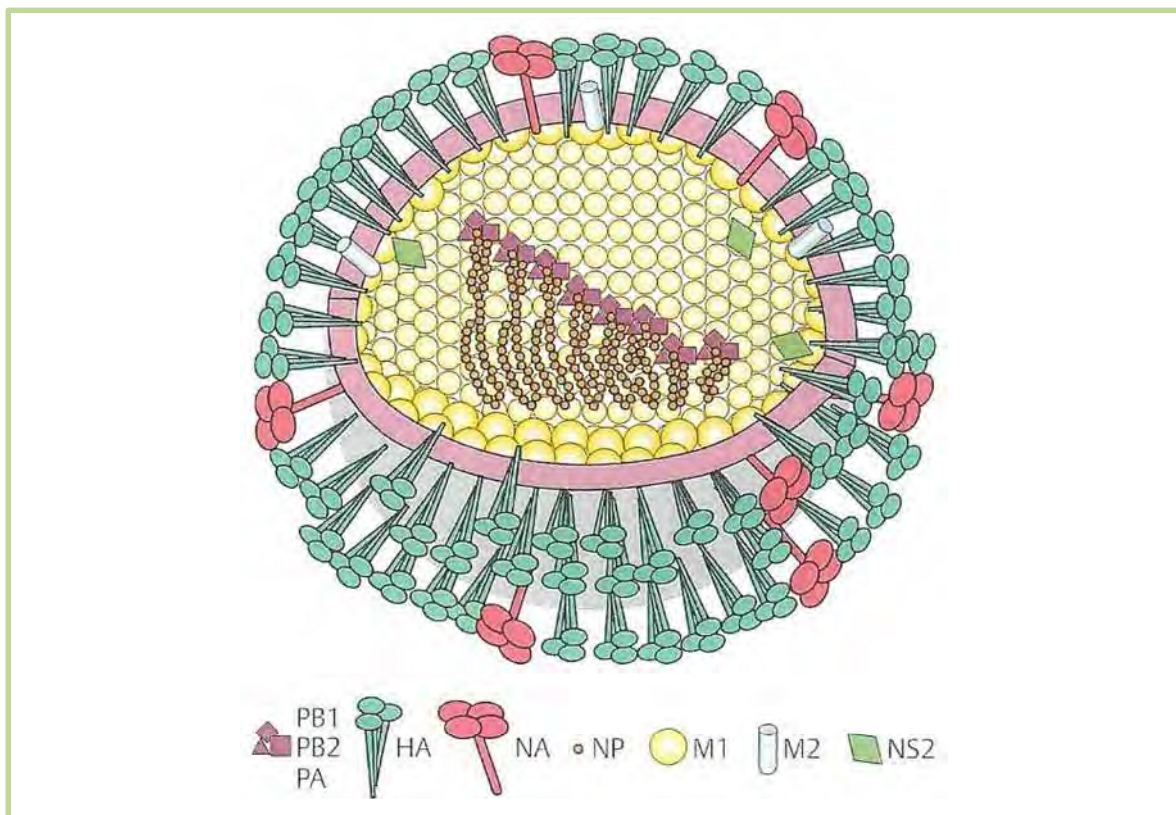


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Influenza A Virus (Doerr and Gerlich, 2010) In die Lipidhülle des Virus sind Hämagglutinin- (HA-) und Neuraminidase- (NA-) Spikes, sowie Matrixproteine 2 (M2) eingebettet. Auf der Innenseite ist sie mit dem Matrixprotein 1 (M1) ausgekleidet. Die acht Ribonukleoproteine bestehen aus den RNA-Segmenten, die von Nukleoproteinen (NP) umhüllt und an die Polymerase-bindenden Proteine 1 und 2 (PB1, PB2) und die RNA-Polymerase (PA) gebunden sind. Weiterhin lassen sich Nichtstrukturproteine 2 (NS2) im Virus finden.

1.2.2 Replikation

1) Die Virusaufnahme in die Wirtszelle wird durch HA vermittelt, das Sialinsäuren an der Zelloberfläche erkennt und bindet (Gamblin and Skehel, 2010) (Abb. 2). 2) Darauf folgt die Aufnahme mittels rezeptorvermittelter Endozytose (Dou et al., 2018). 3) Um die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran zu gewährleisten, muss HA durch zelluläre

Proteasen in zwei Untereinheiten gespalten werden. Durch den niedrigen pH-Wert in den Endosomen kommt es zur Konformationsänderung des HA-Moleküls, sodass seine Fusionsdomäne freigelegt ist (Das et al., 2010). Diesen Prozess unterstützt das Matrixprotein M2, über das Protonen aus dem sauren Milieu der Endosomen in das Virus gelangen.

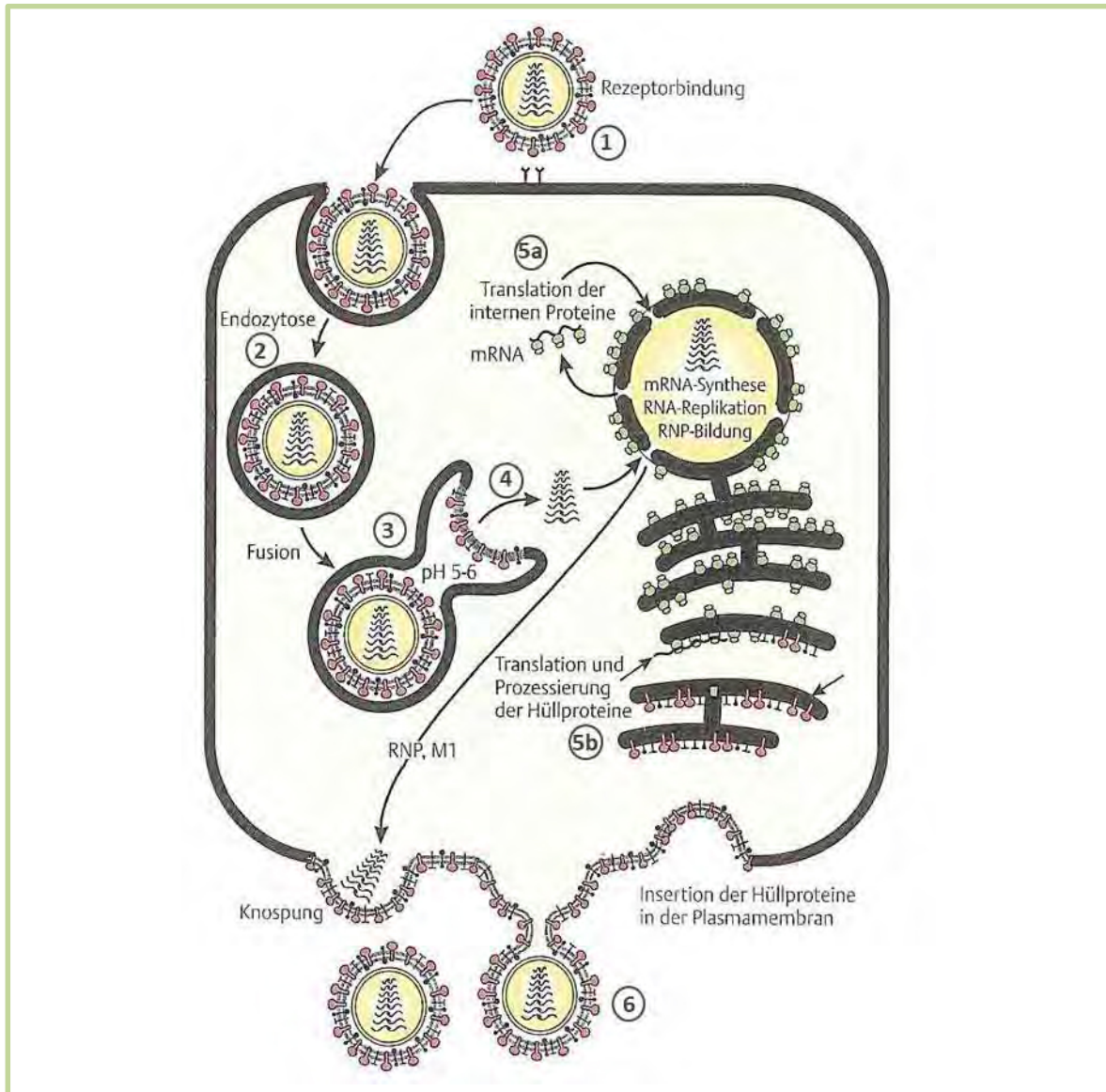


Abbildung 2: Die Virusreplikation (Doerr and Gerlich, 2010) 1) Die Virusaufnahme in die Wirtszelle wird über HA vermittelt worauf die 2) Endozytose folgt. 3) Für die Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran muss HA in zwei Untereinheiten gespalten werden. 4) Durch die gebildeten Poren gelangen die Ribonukleoproteinsegmente (RNP) in das Zytoplasma und werden zum Zellkern transportiert, wo sie repliziert werden. Darauf folgt die Translation durch die zelluläre Translationsmaschinerie 5a) NP, PB1 und 2, PA und Matrixprotein 1 (M1) werden an freien Polysomen translatiert und anschließend wieder in den Kern transportiert, wo sie mit der genomischen RNA zusammengelagert werden. Das RNP und M1 werden dann zur Plasmamembran geschleust. 5b) Die Translation der Hüllproteine (HA, NA, M2) erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum. Anschließend werden auch sie zur Plasmamembran transportiert wo dann durch 6) Knospung das neue Virus entsteht. NA sorgt für die Freisetzung des Virus.

4) Durch die gebildeten Poren können die RNP-Komplexe in das Zytoplasma der Wirtszelle gelangen und zum Zellkern transportiert werden. Dort kommt es zur Transkription und RNA-Replikation mit Hilfe des viralen Polymerasekomplexes (Dou et al., 2018). Es werden zwei RNA-Spezies hergestellt: zum einen eine komplementäre RNA (cRNA), die eine genaue Kopie der viralen RNA (vRNA) ist und auch zur Produktion der vRNA-Tochtersträngen genutzt wird, zum anderen die mRNA, die für die Synthese viraler Proteine benötigt wird (Portela and Digard, 2002). 5a) Die virale mRNA wird aus dem Nucleus heraustransportiert und durchläuft die Translation. Dabei werden NP, PB1 und 2, PA und M1 an freien Polysomen im Zytoplasma translatiert und anschließend in den Kern zurücktransportiert. Dort lagern sich die Proteine mit der genomischen RNA zusammen, die dann aus dem Zellkern zur Plasmamembran transportiert wird (Dou et al., 2018). 5b) Die Translation der Proteine der Virushülle geschieht am rauen endoplasmatischen Retikulum. Mit Hilfe des Exozytose-Apparats der Zelle werden sie zur Zellmembran befördert. Nachdem die Hüllenproteine in die Plasmamembran eingefügt wurden, kommt es 6) zur Knospung des Viruspartikels (Bouvier and Palese, 2008). Das Virion bleibt so lange durch HA an die Sialinsäuren der Wirtszelle gebunden, bis NA diese spaltet und so die Akkumulation an der bereits infizierten Zelle verhindert (Gamblin and Skehel, 2010). Das Virus benötigt zwischen 6 h und 8 h für einen vollständigen Replikationszyklus (Dou et al., 2018).

1.2.3 Variabilität

Der Hauptangriffspunkt des Immunsystems sind die Glykoproteine der Virusoberfläche HA und NA. Antikörper gegen HA verhindern die Bindung an Rezeptoren und eine Reinfektion mit demselben Virus, während Antikörper gegen NA die Virusausbreitung im Körper hemmen (Gamblin and Skehel, 2010). Das Virus vermeidet bereits bestehende Immunität durch einen *Antigendrift* oder *Antigenshift*. Durch das fehlerhafte Arbeiten und die fehlende Korrekturlesefunktion des viralen Polymerasekomplexes kommt es zum Einbau falscher Basen in die virale RNA und somit zu Punktmutationen, die über die Zeit akkumulieren. Betreffen diese Punktmutationen die Gene für NA oder HA, verändern sie die Oberflächenantigene des Virus und verschaffen ihm einen Selektionsvorteil (Taubenberger and Morens, 2008). Dieser Vorgang wird *Antigendrift* genannt.

Als *Antigenshift* wird der vollständige Austausch von NA oder HA bezeichnet, sodass ein neuer Subtyp entsteht. HA und NA liegen auf unterschiedlichen RNA-Molekülen kodiert. So kann bei einer Infektion des Wirts mit zwei unterschiedlichen Virustypen ein Reassortment stattfinden, das heißt ein Austausch und somit eine Neukombination von

Hämagglutinin und Neuraminidase. Diese genetische Variabilität ist bisher vor allem bei Influenza A Viren bekannt und kann der Ursprung einer Pandemie sein, wie es wahrscheinlich bei der „Spanischen Grippe“ im Jahr 1918 der Fall war (Bouvier and Palese, 2008).

1.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus gehört zu den grampositiven, nicht sporenbildenden Bakterien, die sich durch ihre Unbeweglichkeit auf einem Haufen anordnen und daher auch Traubenzellen genannt werden. Das Bakterium bildet goldene pigmentierte Kolonien aus und ist Koagulase positiv. *S. aureus* ist ein häufiger Erreger ambulant erworbener und nosokomialer Infektionen und verursacht ein breites Spektrum an Erkrankungen (Thomer et al., 2016, Lowy, 1998). Dabei spielen zahlreiche Virulenzfaktoren des Bakteriums eine Rolle (Abb. 3). Die Infektionen reichen von Haut- und Weichteilinfektionen, über Knochen- und Gelenkentzündungen bis zur Bakteriämie, Endokarditis und Sepsis. Dies ist u.a. durch seine Fähigkeit möglich, sich in Form septischer Metastasen über die Blutbahn auszubreiten und in anderen Geweben anzusiedeln (Coates et al., 2014, Tong et al., 2015, Lowy, 1998). Es versterben jährlich etwa 20.000 Menschen in den USA an verschiedenen Infektionen durch das grampositive Kugelbakterium (Thomer et al., 2016). Obwohl Pneumokokken häufiger die Ursache von Pneumonien sind als Staphylokokken, verursacht *S. aureus* den schwerwiegenderen Krankheitsverlauf mit einer häufigeren Aufnahme auf die ITS und einer höheren Mortalität (13,3% vs. 4,4%) (Self et al., 2016).

Das Bakterium ist ein fakultativ pathogener Keim und kann als Kommensale so gut wie jedes Gewebe oder Organsystem besiedeln. Am häufigsten ist *S. aureus* auf der Schleimhaut der Nase und den oberen Atemwegen zu finden. So sind bis zu 20% der Bevölkerung permanent und etwa 30% intermittierend mit dem Bakterium besiedelt. Kinder sind abhängig vom Alter tendenziell häufiger mit *S. aureus* kolonisiert als Erwachsene. Oft findet er sich auch auf der Haut, im Perineum, in der Vagina oder dem Pharynx (Mulcahy and McLoughlin, 2016a, Wertheim et al., 2005). Besonders prädestiniert für eine Kolonisation sind Menschen mit Adipositas und Komorbiditäten wie chronischen Erkrankungen (Gorwitz et al., 2008, Verhoeven et al., 2014). Diese kommensale Besiedlung, vor allem eine durch einen MRSA, ist ein anerkannter Risikofaktor und wahrscheinlich der häufigste Ausgangspunkt für invasive Infektionen (Coates et al., 2014, Verhoeven et al., 2014, Gorwitz et al., 2008). Dies gilt auch für nosokomiale Infektionen. Ein Grund dafür scheint das Durchbrechen der Haut (z.B. durch intravenöse Katheter) zu sein, die eine der wichtigsten Barrieren des Körpers gegen Pathogene ist. Dadurch kann sich *S. aureus* im

subkutanen Gewebe ansiedeln und in den Blutstrom vordringen (Thomer et al., 2016). Bei bis zu 80% der nosokomialen Infektionen ist der krankheitsauslösende Stamm der gleiche, der von der Haut oder aus der Nase isoliert werden konnte (von Eiff et al., 2001, Wertheim et al., 2005).

1.3.1 Virulenzfaktoren von *S. aureus*

S. aureus bildet eine Reihe von Virulenzfaktoren (Abb. 3) wie **Adhäsine**, **Enzyme** und **Toxine**. Diese dienen der Besiedlung des Wirtes bzw. der Verbreitung in diesem oder können krankheitsauslösend sein (Coates et al., 2014, Lowy, 1998). Zu den **Adhäsinen** gehört unter anderen das Protein A, das fast alle Stämme besitzen und das Immunglobuline an ihrem F_c-Segment bindet. Dadurch kann *S. aureus* der Phagozytose entgehen. Gewebeerstörende **Enzyme** wie Proteasen, Lipasen oder Hyaluronidasen erleichtern dem Bakterium die Verbreitung im Wirt (Lowy, 1998). Eine gefürchtete Erkrankung durch *S. aureus* ist das Toxische-Schock-Syndrom. Verursacht durch das Superantigen Toxic-shock-syndrom-Toxin 1 (TSST-1) kommt es zu einer überschießenden Immunantwort mit septischem Schock und Organversagen (Tong et al., 2015). Ein weiteres Toxin ist das Panton-Valentin-Leukozidin (PVL). Es ist in der Lage, Poren in den Zellwänden von Makrophagen und Neutrophilen zu bilden und die Immunzellen so abzutöten.

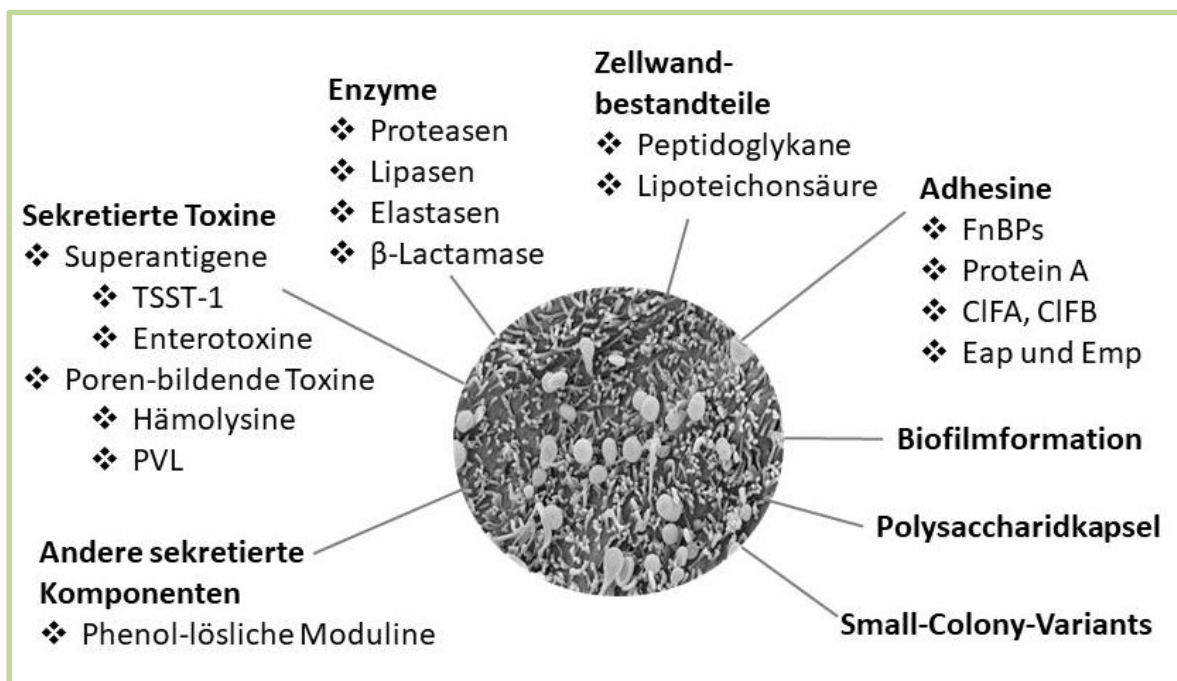


Abbildung 3: Virulenzfaktoren von *S. aureus* eigene Aufnahme (Hof et al., 2014, Bartlett and Hulten, 2010, Tuchscher et al., 2010, Otto, 2010, Tong et al., 2015, Loffler et al., 2013) Eap: extrazelluläres Adhäsionsprotein, Emp: extrazelluläres Matrixprotein, FnBPs: Fibronectinbindeprotein, ClFA: Clumping-Faktor A, TSST-1: Toxic Shock Syndrom Toxin 1, PVL: Panton-Valentin-Leukozidin

Durch die ungehinderte Ausschüttung von intrazellulären Proteasen in das umliegende Gewebe kommt es u.a. zu nekrotisierenden Pneumonien (Loffler et al., 2013, Niemann et al., 2012).

S. aureus ist außerordentlich anpassungsfähig, da das Bakterium die Fähigkeit hat, unter verschiedenen Stämmen Gene durch horizontalen Gentransfer auszutauschen (Lowy, 1998, Stryjewski and Corey, 2014). Bereits 1 Jahr, nachdem Penicillin entdeckt wurde, konnte beobachtet werden, dass *S. aureus* nicht mehr sensibel reagierte. Verantwortlich dafür war die Betalaktamase, die die Spaltung des β -Laktamringes der Penicilline verursacht. Ähnlich schnell entwickelte sich die Resistenz gegen Methicillin, was zu einer weiten Verbreitung des MRSA im und außerhalb des Krankenhauses führte. Inzwischen konnten auch Stämme isoliert werden, die gegen Glykopeptide wie Vancomycin und gegen Linezolid resistent sind (Stryjewski and Corey, 2014, Howden et al., 2010).

Um sowohl einer Antibiotikatherapie als auch der Immunabwehr des Wirts zu entgehen, kann *S. aureus* während einer Infektion seinen Phänotyp vom virulenten Wildtyp zu den **Small-Colony-Variants** (SCV) und bei Bedarf wieder zurück wechseln. In dieser metabolisch kaum aktiven Form stimuliert er nur wenig die Immunantwort und kann innerhalb von nicht phagozytierenden Zellen, wie z.B. Endothelzellen, überleben (Tuchscherr et al., 2010, Tuchscherr et al., 2011). Auf diese Weise kommt es zu rezidivierenden und chronischen Infektionen trotz adäquater Antibiotikatherapie (Proctor et al., 2006, Sendi and Proctor, 2009).

S. aureus ist in der Lage einen **Biofilm** an verschiedensten Fremdmaterialien zu bilden. Dazu gehören im klinischen Alltag vor allem Herzklappen, Gelenke und intravaskuläre Katheter. Dieser Biofilm bietet den Bakterien ebenfalls Schutz vor dem Immunsystem und einer antimikrobiellen Therapie. Eine Beseitigung der Infektion ist häufig nur über eine Entfernung des Implantats zu erreichen, was zwingend notwendig ist, da sich die Bakterien aus dem Biofilm herauslösen und eine Bakteriämie oder Endokarditis verursachen können (Tong et al., 2015).

1.4 Der letale Synergismus von IAV und *S. aureus*

Die Koinfektion von *S. aureus* und IAV ist mit einer wesentlich erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden als die jeweiligen Einzelinfektionen (Chertow and Memoli, 2013). Die in den letzten Jahren zunehmend durch MRSA wie den *S. aureus* Stamm USA 300 verursachten sekundären Pneumonien verliefen sogar bei Immunkompetenten oft tödlich (Mulcahy and McLoughlin, 2016b). Sie führen häufiger zu starken Gewebeschäden und Nekrosen im respiratorischen Trakt vor allem dann, wenn der betreffende *S. aureus* Stamm

PVL exprimiert (Reddinger et al., 2016, Loffler et al., 2013, Niemann et al., 2012). IAV und *S. aureus* interagieren auf mehreren Ebenen zusammen und bestärken sich in ihrem letalen Synergismus. Ursachen dafür sind: I) Die Virusinfektion führt zu immunologischen Wirtsveränderungen, die den Übergang von einem kommensalen, die Nase besiedelndem *S. aureus* zu einem Erreger, der invasiven Erkrankung verursacht, begünstigen (Mulcahy and McLoughlin, 2016b). II) Das Virus bewirkt Veränderungen im respiratorischen Epithel, die die Besiedlung, das Wachstum und die Ausbreitung von *S. aureus* erleichtern (Morens et al., 2008). III) Das Virus nimmt Einfluss auf das Immunsystem, so dass es eindringende Bakterien nicht mehr effektiv abwehren kann. IV) Die inflammatorische Immunantwort wird durch die Koinfektion verstärkt, so dass es das Krankheitsgeschehen verschlimmert (Iverson et al., 2011). V) Die Bakterien tragen zu einer erhöhten Pathogenität der Viren bei (Warnking et al., 2015).

Im Folgenden werden diese Strategien einzeln dargestellt.

I. Übergang der nasalen Kolonisation durch *S. aureus* zu einer invasiven Erkrankung

Die Virusinfektion fördert über eine kombinierte Veränderung von Umweltfaktoren und Immunsystem den Übergang von einem den Nasenvorhof kolonisierenden *S. aureus* zu einem Bakterium, das invasive Erkrankungen hervorruft. (Mulcahy and McLoughlin, 2016b). Durch das Virus werden physiologische Veränderungen im Wirt hervorgerufen, die zur Ausbreitung von *S. aureus* führen. Dazu gehören Fieber, die Ausschüttung von ATP und Norepinephrin sowie erhöhte Glukosewerte (Reddinger et al., 2016). Die *S. aureus* Ausbreitung begünstigenden immunologischen Veränderungen durch das Virus ähneln denjenigen, die auch für eine pulmonale bakterielle Superinfektion verantwortlich sind. Essentiell für die Beseitigung von *S. aureus* aus der Nase sind die Aktivierung und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (Archer et al., 2013) sowie die Bildung von antimikrobiellen Peptiden durch Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-22 (IL-22) (Archer et al., 2016, Mulcahy et al., 2016). Das Virus behindert diese Schutzmechanismen über die immunologische Wirtsantwort, die es hervorruft, trägt so zu einer vermehrten Kolonisierung und einer sekundären bakteriellen Infektion bei (Mulcahy and McLoughlin, 2016b).

II. Schädigung der epithelialen Barriere und Schaffung von Bindungsstellen durch das Virus für *S. aureus*

Durch die unterbrochene zelluläre Proteinsynthese, die die Influenzaviren verursachen, kommt es zu Zelldysfunktionen und Apoptose im respiratorischen Epithel. Diese Schädigung wird weiterhin verstärkt durch die Inflammationsantwort des Gewebes. Dadurch wird die mukoziliäre Clearance eingeschränkt, sowie die Basalmembran exponiert, weshalb

die Bakterien einerseits nicht mehr effektiv aus dem Respirationstrakt entfernt werden können und andererseits vermehrt Bindungsstellen zur Verfügung haben (Chertow and Memoli, 2013, Morens et al., 2008). Proteasen wie FnBPA, ClFA und ClFB ermöglichen es *S. aureus*, an beschädigte Zellen oder Moleküle wie Fibronectin, Fibrin oder Kollagen der extrazellulären Matrix zu binden (Siemens et al., 2017). Für eine erleichterte Adhärenz sorgt auch die virale Neuraminidase, die Sialinsäuren spaltet und dadurch weitere bakterielle Bindungsstellen bereitstellt (Chertow and Memoli, 2013, McCullers and Bartmess, 2003). So schafft das Virus eine günstige Umgebung für das Wachstum, die Invasion und die Verbreitung der Bakterien.

III. Veränderungen im Immunsystem durch das Virus, die eine bakterielle Infektion begünstigen

Eine IAV Infektion macht das Immunsystem des Wirts auf verschiedene Weisen empfänglich für eine bakterielle Koinfektion. Eine besondere Rolle kommt dabei den durch das Virus induzierten Interferonen (IFN) zu. IFN- α und $-\beta$ hemmen unter anderem die Produktion der Chemoattractants Cxcl1 und Cxcl2. Dadurch werden vermindert neutrophile Granulozyten rekrutiert, die somit nicht mehr zur Vernichtung der Bakterien bereitstehen (Shahangian et al., 2009). Weiterhin hemmen die Interferone die Produktion von IL-23 und IL-1 β . Diese Zytokine sind verantwortlich für die Aktivierung der Th-17-Zellen, die wiederum IL-17 und IL-22 produzieren. IL-22 ist wichtig für die Produktion von antimikrobiellen Peptiden (Liang et al., 2006, Kudva et al., 2011), während IL-17 die Bildung von G-CSF und Chemokinen unterstützt, die dem Recruitment von neutrophilen Granulozyten dienen (Ye et al., 2001). Durch die Minderung der beiden Zytokine IL-17 und IL-22 und den durch sie produzierten Botenstoffen ist die bakterielle Clearance deutlich eingeschränkt. Weiterhin induziert die IAV-Infektion die Bildung von IFN- γ und IL-27. IL-27 hemmt einerseits zusätzlich die IL-23 und IL-1 β Produktion und fördert andererseits die Bildung von IL-10. Sowohl IL-10 als auch IFN- γ erhöhen im Wirt die Empfänglichkeit für eine sekundäre bakterielle Infektion (Rynda-Apple et al., 2015).

IAV ist in der Lage, die Aktivität von residenten Alveolarmakrophagen zu hemmen und sie sogar zu töten. Sie werden durch aus dem Blut rekrutierte Monozyten ersetzt, die zu Makrophagen polarisieren. Auch diese zeitliche Verzögerung vereinfacht den Bakterien die Infektion (Siemens et al., 2017).

Es sollte jedoch auch nicht außer Acht gelassen werden, dass die Mechanismen der viralen Begünstigung einer bakteriellen Infektion noch nicht abschließend geklärt sind. Erschwert wird dies auch durch unterschiedliche experimentelle Versuchsaufbauten. V.a. der zeitliche

Abstand zwischen der viralen und der folgenden bakteriellen Infektion spielt eine große Rolle und wird nicht einheitlich verwendet (Rynda-Apple et al., 2015).

IV. Durch die Koinfektion kommt es zu einer überschießenden Immunantwort mit verstärkter Schädigung der Lunge

Schwere Infektionen sind durch eine unregulierte Immunantwort mit einer erhöhten Zytokin- und Chemokinproduktion, einer massiven Immunzelleinwanderung, einer schädlichen Inflammation und einer hohen Keimanzahl gekennzeichnet (Klemm et al., 2017, Gao et al., 2013, Lee et al., 2011, Yu et al., 2011, Loffler et al., 2013).

In murinen Modellen sind Einzelinfektionen durch milde Inflammationsinfiltrate ohne Nekrosen geprägt, während bei Koinfektionen ausgedehnte inflammatorische Zellinfiltrate bis in das Interstitium und die Pleura reichen und Nekrosen und Hyperplasien häufig vorkommen (Iverson et al., 2011, Jia et al., 2018). Außerdem kann eine verstärkte Zytokinausschüttung durch die zusätzliche bakterielle Infektion gemessen werden. So sind unter anderem TNF- α , IL-6, CCL3 und CCL5 durch die Superinfektion deutlich erhöht (Klemm et al., 2017, Jia et al., 2018). Vor allem IL-6 wurde während der Influenzapandemie von 2009 mit schweren klinischen Verläufen assoziiert und konnte sogar als prädiktiver Wert für die Aufnahme der Patienten auf die ITS verwendet werden (Lee et al., 2011, Yu et al., 2011).

Die Schwere der Inflammation ist auch stark von den Pathogenen abhängig. So führt das Virustoxin PB1-F2, das in dem A(H1N1)-Virus von 1918 zu finden war, zu einer sehr starken Entzündungsreaktion, einer erleichterten bakteriellen Superinfektion und einem schwereren Krankheitsverlauf (Iverson et al., 2011, Chertow and Memoli, 2013). Auch das bakterielle PVL beeinflusst die Schwere der Infektion maßgeblich. Es ist ein Toxin, das unter anderem bei dem immer häufiger werdenden MRSA-Stamm USA300 gefunden wird, der inzwischen auch ambulante Infektionen verursacht (Limbago et al., 2009). Da Influenzaviren einen proinflammatorischen Stimulus darstellen, werden während einer Infektion Immunzellen wie Monozyten und neutrophile Granulozyten angezogen. PVL ist ein porenbildendes Endotoxin, das in der Lage ist, die Immunzellen zu aktivieren und lysieren. Durch diesen unkontrollierten Zelltod kommt es zur Freisetzung von Proteasen in das umliegende Gewebe, was eine massive Gewebeerstörung und weitere Verstärkung der Inflammation zur Folge hat. Dieser Mechanismus führt zu einer nekrotisierenden Pneumonie mit hoher Morbidität und Mortalität (Loffler et al., 2013, Niemann et al., 2012).

Auch weniger pathogene *S. aureus* Stämme verursachen Gewebsnekrosen. So konnte van Kruchten et al. zeigen, dass *S. aureus* die durch das Virus induzierte Apoptose hemmt und dafür den nekrotischen Zelltod unterstützt (van Kruchten et al., 2018). Während die

Apoptose ein antiinflammatorischer Prozess ist, kommt es durch die Nekrose zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, die durch in die Umgebung ausgeschüttete Zellbestandteile hervorgerufen wird (Edinger and Thompson, 2004).

Obwohl eine ausreichende Zytokinantwort essentiell für die Abwehr der Virusinfektion ist, kommt es im Laufe einer Koinfektion häufig zu einer exazerbierten pulmonalen Situation bis hin zum Zytokinsturm und einer aggressiven und dysregulierten Zytokinausschüttung. Das führt zu vermehrten Gewebeschäden und –dysfunktionen mit erhöhter Morbidität und Mortalität (Loffler et al., 2013).

V. *S. aureus* erhöht die Virulenz der Influenza A Viren während der Koinfektion

Verschiedene Koinfektionsmodelle zeigen, dass sowohl der bakterielle als auch der virale Titer während einer Koinfektion erhöht ist (Warnking et al., 2015, Iverson et al., 2011). Das legt die Vermutung nahe, dass Bakterien ebenfalls das virale Wachstum positiv beeinflussen. Einige *S. aureus* Stämme produzieren Proteasen, die virales HA, was als Vorläuferprotein gebildet wird, spalten, es damit aktivieren und so die virale Replikation und Infektiosität des Virus fördern (Tashiro et al., 1987). Die Ausbreitung und Pathogenität des Virus wird auch indirekt durch die Staphylokinase erhöht. Diese aktiviert die Wirtsprotease von humanem inaktiven Plasminogen zu Plasmin, das wiederum in der Lage ist, die HA-Aktivierung durch Spaltung zu unterstützen (Tse and Whittaker, 2015, Lazarowitz et al., 1973, Scheiblaue et al., 1992).

Des Weiteren zeigte eine Studie von Warnkin et al., dass *S. aureus* auch Einfluss auf die gegen das Virus gerichtete Immunantwort nimmt, indem er den Signalweg von Typ I IFN über die Hemmung der STAT1-STAT2- Dimerisierung behindert. Dies führt zu einer effizienteren Virusreplikation während einer Koinfektion (Warnking et al., 2015).

1.5 Abwehrsysteme der Lunge

Ein Mensch inhaliert täglich etwa 10.000 Liter Gas am Tag, das Bakterien, Viren, Oxidantien, Verschmutzung und Allergene enthält. Um die Lunge und den Körper vor diesen Schadstoffen zu schützen, ist das Abwehrsystem der Lunge essentiell. Zu diesem gehören u.a. das Epithel, der Mukus und die mukoziliäre Clearance, Immunglobuline, das Komplementsystem, das **pulmonale Surfactant** und phagozytierende Zellen wie z.B. **Makrophagen** (Wright, 2005, Moldoveanu et al., 2009). Auf die beiden zuletzt genannten Abwehrstrategien der Lunge wird im Rahmen dieser Dissertation detaillierter eingegangen.

1.5.1 Pulmonales Surfactant

Surfactant ist eine oberflächenaktive Substanz, die hauptsächlich dafür bekannt ist, die Oberflächenspannung in den Alveolen zu reduzieren und somit die Atmung zu ermöglichen. Eine weitere wichtige Funktion von Surfactant ist seine nicht-adaptive Immunantwort auf eingedrungene Krankheitserreger und Schadstoffe, die vor allem durch die Surfactant Proteine A und D (SP-A und SP-D) gewährleistet wird (Wright, 2005, Kishore et al., 2005).

1.5.1.1 Zusammensetzung und Struktur von Surfactant Protein A

90% des molekularen Gewichts von Surfactant wird von Lipiden gebildet. Ihr Hauptanteil sind die Phospholipide deren wichtigster Vertreter für die Herabsetzung der Oberflächenspannung Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) ist. Der Proteinanteil beträgt ca. 10%, von dem wiederum ein großer Teil Plasmaproteine wie Albumin, Lysozym und Immunglobuline sind. Ein anderer Teil wird durch Apoproteine, die sogenannten Surfactant-Proteine gebildet (Rooney et al., 1994). Die Surfactant-Proteine werden in SP-A, SP-B, SP-C und SP-D eingeteilt [Nomenklatur nach (Possmayer, 1988)]. SP-A und SP-D sind hydrophil während SP-B und SP-C hydrophob sind (Khubchandani and Snyder, 2001). Es existieren noch zwei weitere Surfactant-Proteine: Surfactant Protein G und Surfactant Protein H, die erst vor kurzem entdeckt wurden (Vieira et al., 2017). SP-A und SP-D haben mengenmäßig den größten Anteil unter den Surfactant-Proteinen (Han and Mallampalli, 2015). SP-A hat ein Molekulargewicht von 34-36 kDa und wird durch zwei Gene codiert, SP-A1 und SP-A2, die auf Chromosom 10 lokalisiert sind (Khubchandani and Snyder, 2001). Es besteht aus einer amino-terminalen (N-terminalen) Domäne, einem kollagenartigen langgestreckten Anteil, der über eine α -helikal gewundene Halsregion mit der Lektindomäne verbunden ist (Abb. 4). Die Lektindomäne wird auch Carbohydrate Recognition Domain (CRD) genannt (Kishore et al., 2006, Pastva et al., 2007, Khubchandani and Snyder, 2001). Sie kann kalziumabhängig Kohlenhydratsequenzen, die sich auf bakteriellen Zellwänden oder Viren befinden, binden und die Pathogene opsonieren (Han and Mallampalli, 2015).

Die monomeren SP-A Moleküle sind zu Trimeren zusammengefügt. SP-A besteht aus 6 Trimeren, die durch kovalente Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen in einer bouquet-artigen Struktur organisiert sind. So entsteht ein Oktadekamer (Kishore et al., 2006, Khubchandani and Snyder, 2001) (Abb. 4). Dadurch ähnelt SP-A strukturell der Komplementkomponente C1q, das ebenfalls Teil des angeborenen Immunsystems ist. Durch seine kollagen- und lektinartigen Eigenschaften wird SP-A auch zu den Kollektinen gezählt (Khubchandani and Snyder, 2001, Pastva et al., 2007).

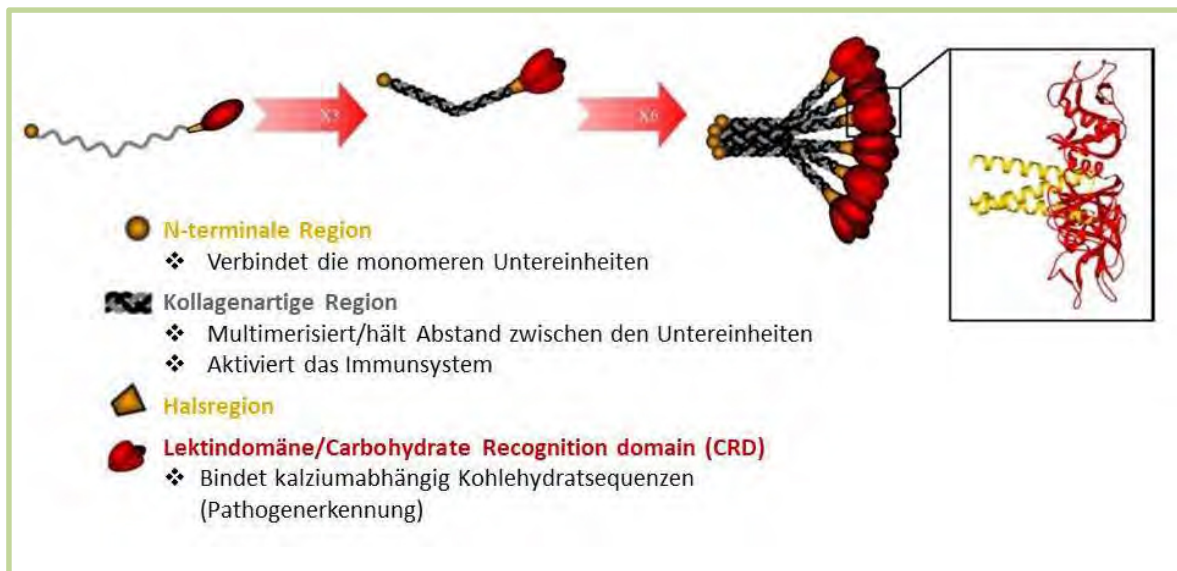


Abbildung 4: Strukturelle Domänen von SP-A und ihre Funktionen (Kishore et al., 2006), SP-A besteht aus einer N-terminalen Region, die über die kollagenartige Region mit der Halsregion verbunden ist, an der sich die Carbohydrate Recognition Domain (CRD) anschließt. Die monomeren SP-A Moleküle sind zu Trimeren zusammengefügt. Sechs Trimere sind zu einer bouquet-artigen Struktur organisiert.

1.5.1.2 Metabolismus von Surfactant

Surfactant-Phospholipide und -Proteine werden von Typ-II-Pneumozyten produziert. Zusätzlich dazu werden die Surfactant Proteine A und D auch noch von den Clara-Zellen der Bronchioli respiratorii und in submukösen Drüsen synthetisiert (Pastva et al., 2007). Es können ein intrazelluläres und ein extrazelluläres Surfactant-Kompartiment unterschieden werden, die in einem engen Austausch miteinander stehen. (1) Für die **Surfactant-Produktion** werden Ernährungssubstrate verwendet, die aus dem Blutstrom in die Zelle aufgenommen werden (Han and Mallampalli, 2015). Zusätzlich werden Surfactant-Bestandteile, vor allem die Phospholipide, aus dem Alveolarraum zurückgewonnen und wiederverwertet (Wright and Dobbs, 1991) (2) Die **Biosynthese** der Phospholipide und Apoproteine findet am endoplasmatischen Retikulum statt, von dem aus sie in den (3) **Golgi-Apparat** transportiert und modifiziert werden. (4) Anschließend werden sie in den sogenannten **Lamellar-Körperchen** verpackt und gespeichert (Rooney et al., 1994, Wright, 2005). Während die Lipidzusammensetzung in den Lamellar-Körperchen bereits derjenigen des Surfactant in der Alveole entspricht, findet sich wenig SP-A und kein SP-D in diesen (Johansson et al., 1994). Die Sekretion dieser beiden Proteine scheint unabhängig von den Lamellar-Körperchen zu verlaufen (Rooney, 2001). (5) Durch **Exozytose** werden die Lamellar-Körperchen in die dünne, wässrige Hypophase des Alveolarraums sezerniert, wo sie zunächst (6) eine dreidimensionale gitterartige Struktur, das **tubuläre Myelin** ausbilden (Wright, 1997, Wright and Dobbs, 1991, Rooney et al., 1994).

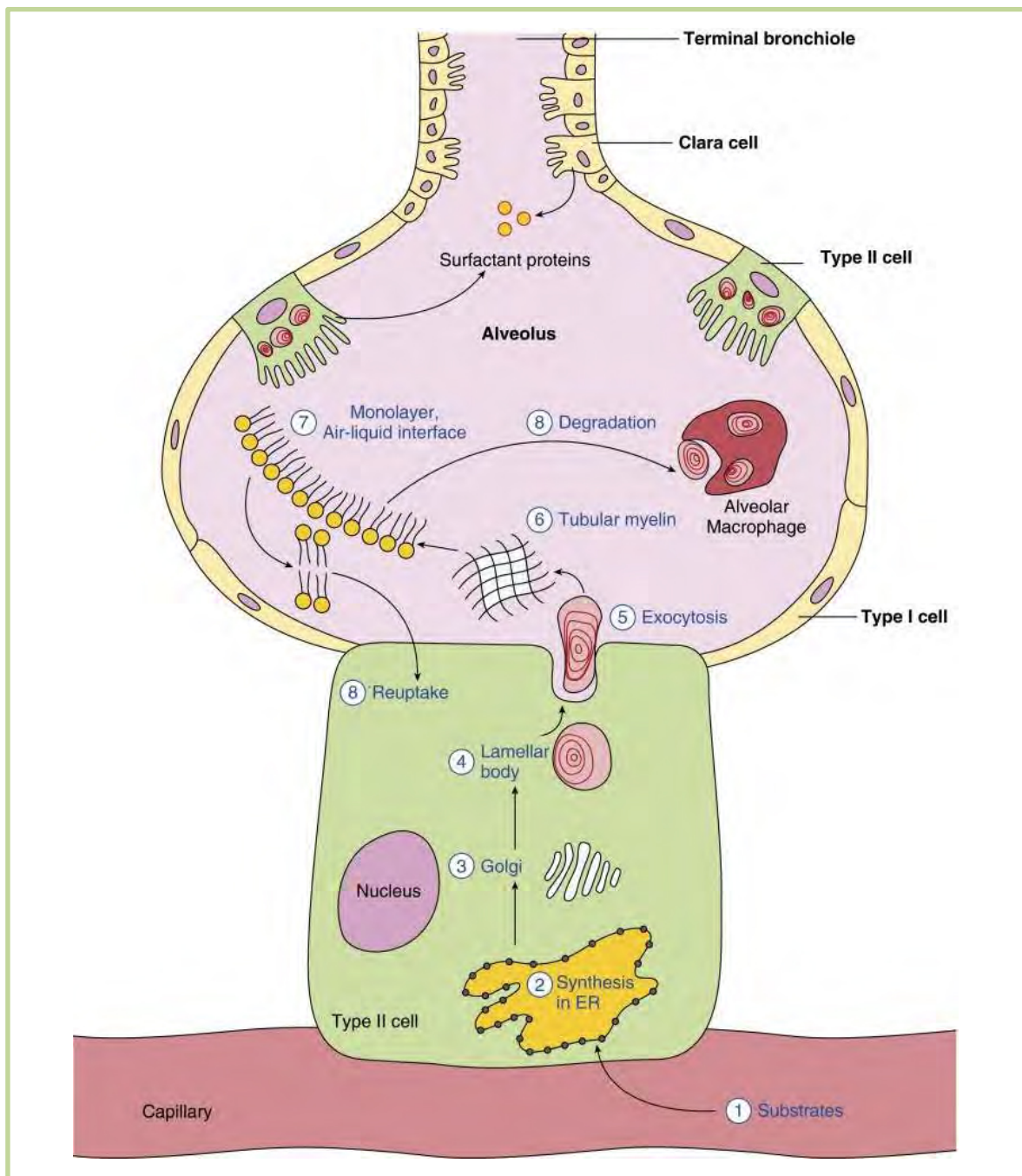


Abbildung 5: Surfactant-Metabolismus (Han and Mallampalli, 2015) Surfactant wird von Typ-II-Pneumozyten gebildet. Außerdem produzieren auch Clara-Zellen Surfactant Proteine A und D. 1) Die benötigten Substrate werden u.a. aus Nährstoffbestandteilen gewonnen. 2) Im endoplasmatischen Retikulum werden die Surfactant-Bestandteile synthetisiert, um dann 3) im Golgi-Apparat modifiziert zu werden. 4) In den Lamellar-Körperchen wird Surfactant verpackt und gespeichert und durch 5) Exozytose in die wässrige Hypophase des Alveolarraums sezerniert, wo es zunächst als 6) tubuläres Myelin strukturiert ist. 7) Aus der Hypophase werden die Lipide zur Luft-Wasser-Grenzfläche transportiert, wo sie die Oberflächenspannung reduzieren. 8) Zum größten Teil werden die Phospholipide und z.T. auch Proteine wieder von Typ-II-Pneumozyten aufgenommen und wiederverwerten. Alternativ wird Surfactant durch Makrophagen phagozytiert. So wird eine Akkumulation der Surfactant-Bestandteile im Alveolarraum verhindert.

Bei der Bildung des tubulären Myelins spielen SP-A und SP-B eine essentielle Rolle (Hawgood and Clements, 1990, Khubchandani and Snyder, 2001). Die wichtigsten

physiologischen Stimuli der Exozytose sind die Geburt und eine mechanische Dehnung der Pneumozyten durch tiefe Inspiration (Wright, 2005, Oyarzun and Clements, 1978). In Versuchen mit isolierten Typ-II-Pneumozyten wird sie u.a. auch durch Agonisten für β -adrenerge Rezeptoren (Oyarzun and Clements, 1978, Rooney, 2001), ATP, Adenosin und Histamin ausgelöst und durch Surfactant Protein A gehemmt (Wright and Dobbs, 1991). (7) Von der wässrigen Hypophase aus können die Lipide zur Luft-Wasser Grenzfläche transportiert werden, wo sie einen **Monolayer** bilden, der nun in der Lage ist, die Oberflächenspannung zu reduzieren. SP-B und SP-C beschleunigen diesen Vorgang erheblich (Hawgood and Clements, 1990, Johansson et al., 1994).

Die Surfactant-Synthese und -sekretion befindet sich in einem Fließgleichgewicht mit dem **Abbau** beziehungsweise der **Wiederaufnahme** und **Wiederverwertung** von Surfactant-Bestandteilen, wodurch eine Akkumulation im Alveolarraum vermieden wird und eine Anpassung an sich verändernde Anforderungen möglich ist. Die Entfernung von Surfactant aus dem Alveolarraum kann über mehrere Wege erfolgen. (8) Die Phospholipide und auch die Proteine werden zu einem großen Teil durch Typ-II-Pneumozyten aufgenommen und können möglicherweise direkt wieder in die Lamellar-Körperchen eingebaut und wiederverwertet werden. Alternativ werden sie lysosomal abgebaut. Die daraus entstehenden Komponenten können zur Neubildung von Surfactant-Lipiden und -proteinen verwendet werden. Ein weiterer Weg zur Beseitigung von Surfactant ist die **Phagozytose** durch Makrophagen oder der Abtransport über die Atemwege (**mukoziliäre Clearance**) (Wright and Dobbs, 1991). Die Wiederaufnahme der Phospholipide wird durch SP-A stimuliert (Khubchandani and Snyder, 2001) (Abb. 5). Der alveoläre Bestand an Surfactant-Phospholipiden erneuert sich etwa alle 5-10 h vollständig (Wright and Dobbs, 1991).

1.5.1.3 Funktionen von Surfactant Protein A

Surfactant ist hauptsächlich für seine biophysikalische Funktion während der Atmung bekannt. Es verhindert den Kollaps der Alveolen während der Expiration und erleichtert die Einatmung durch die Senkung der Oberflächenspannung von ca. 70 nN/m auf nur etwa 0-1 nN/m (Han and Mallampalli, 2015). Obwohl die Surfactant-Proteine nur einen geringen Teil des molekularen Gesamtgewichts ausmachen, sind sie doch unerlässlich für die Funktion von Surfactant. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zur Surfactant-Homöostase, zur Bildung des tubulären Myelins und zur Stabilisierung des Surfactantfilms während der Atmung (Johansson et al., 1994). Zusätzlich spielen vor allem SP-A und SP-D eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunität (Kishore et al., 2005, Wright, 2005). Einige der wichtigsten Funktionen von SP-A sind im Folgenden aufgezählt.

I. Einfluss von SP-A auf die Surfactant-Homöostase und die biophysikalische Funktion

Vor allem von SP-A ist bekannt, dass es einen wichtigen Teil zur korrekten Synthese und Funktion des Surfactant beisteuert. Es hemmt die Exozytose der Lamellar-Körperchen (Johansson et al., 1994) und die Wiederaufnahme von Surfactant-Bestandteilen in die Typ-II-Zellen (Khubchandani and Snyder, 2001). Außerdem ist es essentiell für die Konversion des sezernierten endogenen Surfactant in tubuläres Myelin und fördert die Absorption von Surfactant-Lipiden durch die Luft-Wasser-Grenzschicht (Kishore et al., 2006).

II. Erkennung und Bindung von pulmonalen Pathogenen

Trotz der Rolle von SP-A für die physiologische Funktion von Surfactant, scheint sein immunologischer Einfluss einen höheren Stellenwert einzunehmen. So hatten SP-A knock-out Mäuse eine normale Lungenfunktion (Korfhagen et al., 1996), waren jedoch wesentlich anfälliger für Infektionen mit Streptokokken der Gruppe B (LeVine et al., 1999b, LeVine et al., 1997), *Haemophilus influenzae* (LeVine et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (LeVine et al., 1998), und Respiratorischen Syncytial-Virus (LeVine et al., 1999a). Die CRD des Kollektins bindet Oligosaccharide, die auf der Oberfläche von vielen pulmonalen Pathogenen zu finden sind. Sie hat eine höhere Affinität zu Oligosacchariden als zu Monosacchariden. Es wird angenommen, dass dieser Unterschied dazu dient, körpereigene von körperfremden Zuckern zu unterscheiden, sodass die CRD spezifischer an pulmonale Pathogene binden kann. Dadurch agglutiniert und opsoniert SP-A Bakterien, Viren und Pilze (Pastva et al., 2007, Wright, 2005).

III. Unterstützung der Phagozytose durch Immunzellen

SP-A unterstützt die Phagozytose von Pathogenen gleich auf mehreren Wegen: über das Opsonieren von Pathogenen, über die Funktion als Aktivationsligand für Immunzellen und über die Heraufregulierung von Oberflächenrezeptoren auf diesen.

SP-A opsoniert die Pathogene über die CRD. Durch die Interaktion des Kollektins mit Immunzellen kommt es zu einer verstärkten Phagozytose des assoziierten Partikels. Durch SP-A agglutinierte Pathogene können zusätzlich leichter von Immunzellen erkannt werden, auch ohne dass SP-A mit diesen interagiert (Wright, 2005). SP-A kann die Aufnahme von Partikeln erhöhen, wenn diese bereits opsoniert sind (z.B. mit IgG). Dieser Mechanismus ist ähnlich dem des Komplementfaktors C1q (Tenner et al., 1989). Weiterhin wird die Phagozytose durch die Regulation von Pattern Recognition Receptors (PRRs) erhöht. U.a. nimmt SP-A Einfluss auf den Scavenger-Rezeptor A (Kuronuma et al., 2004) und den Mannose-Rezeptor der Makrophagen (Beharka et al., 2002).

IV. Antibakterielle Funktion

SP-A interagiert mit verschiedenen Bakterien und Bakterienbestandteilen. So bindet SP-A Lipopolysaccharide (LPS), einen wichtigen Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien (Pikaar et al., 1995). Weitere Bakterien, mit denen SP-A interagiert, sind zum Beispiel *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* (Wright, 2005). Die Bindung von SP-A an Bakterien über die CRD führt zu einer verstärkten Agglutination, Opsonisierung und Phagozytose (Khubchandani and Snyder, 2001). SP-A gebundener *S. aureus* wird durch die Interaktion von SP-A mit dem C1q Rezeptor (Geertsma et al., 1994) oder den SP-A-Rezeptor 210 (SP-R210) (Sever-Chroneos et al., 2011) auf den Makrophagen von diesen phagozytiert. Durch die Agglutination der Pathogene wird auch das Wachstum und die Weiterverbreitung der Bakterien gehemmt, sowie die mukoziliäre Clearance erleichtert (Khubchandani and Snyder, 2001). SP-A kann zusätzlich die Permeabilität der Bakterienmembran erhöhen und die Pathogene dadurch abtöten (Wu et al., 2003).

V. Antivirale Funktion

Die Interaktion mit Viren findet hauptsächlich über die N-linked Oligosaccharide auf der CRD statt (Kishore et al., 2006, Khubchandani and Snyder, 2001). Beim Eindringen des Virus in die Lunge bindet es normalerweise mittels HA an Sialinsäurereste auf den epithelialen Zellen. Vor allem Influenza A Viren bietet SP-A Sialinsäurereste als alternatives Bindungsziel an. (Benne et al., 1995, Hsieh et al., 2018). Die Infektiosität und Verbreitung des Virus wird durch diesen Mechanismus eingeschränkt und die Clearance erleichtert.

VI. Einfluss auf die Inflammationsantwort der Makrophagen

SP-A nimmt Einfluss auf die Immunantwort der Phagozyten. Durch verschiedene Mechanismen kann es die Immunantwort sowohl herauf als auch herunter regulieren. Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Funktionen von SP-A auf die Immunantwort versucht die „*head or tail hypothesis*“ zu geben. Wenn SP-A über die CRD ein Pathogen gebunden hat, interagiert es mit seiner kollagenartigen Domäne mit dem CD91/Calretikulinkomplex der Phagozyten und stimuliert dadurch die Phagozytose und die Produktion von Inflammationsmarkern, wie TNF- α und Interleukinen. Ist kein Pathogen assoziiert, bindet SP-A über seine CRD an das Signalregulationsprotein- α (SIRP- α) der Alveolarmakrophagen, wodurch die Produktion von Inflammationsmarkern unterdrückt wird (Gardai et al., 2003, Haczku, 2008). Die Herunterregulierung der Immunantwort ist wichtig, um das Gewebe vor einem möglichen, den Gasaustausch beeinträchtigendem Schaden zu bewahren und um die Gewebereparaturen zu unterstützen (Zhang and Wang, 2014).

Surfactant Protein A hat noch verschiedene andere Funktionen und Aufgaben. So bindet SP-A an apoptotische und nekrotische Zellen *in vitro* und erleichtert ihre Phagozytose durch Makrophagen (Schagat et al., 2001, Vandivier et al., 2002). Die Aufnahme von apoptotischen Zellen stimuliert Phagozyten zu einer antiinflammatorischen Antwort (Fadok et al., 1998) und trägt so zum Erhalt des Gewebes bei. Weiterhin interagiert SP-A auch mit verschiedenen Pilzen, nimmt Einfluss auf die Dendritische-Zellreifung und die T-Zellproliferation (Haczku, 2008) und ist ein Mediator, der die Geburt auslöst (Condon et al., 2004). Obwohl der Großteil der Kollektine SP-A und SP-D innerhalb der Lunge exprimiert wird, findet man sie auch an nicht pulmonalen Orten wie dem Auge (Bhatti et al., 2014), dem Gastrointestinaltrakt, dem Thymus, der Milz etc., wo sie der Abwehr von Pathogenen dienen (Khubchandani and Snyder, 2001).

1.5.1.4 Einflussfaktoren auf die SP-A Konzentration

Bei verschiedenen Erkrankungen wurde eine Abnahme oder Zunahme der Konzentration von SP-A beschrieben. Dabei ist nicht immer eindeutig, ob diese Veränderungen Ursache oder Folge der Krankheit sind.

Ein Surfactant-Mangel bei Frühgeborenen durch eine unreife Lunge führt zum neonatalen Respiratory Distress Syndrom (RDS) (Joshi and Kotecha, 2007). Dabei zeigte sich, dass das Risiko eines Kindes, mit RDS geboren zu werden, erhöht war, wenn die Amnionflüssigkeit der Schwangeren verhältnismäßig wenig SP-A aufwies (Katyal et al., 1984). In Übereinstimmung damit wiesen auch die Trachea-Aspirate der Kinder einen verringerten SP-A-Gehalt auf (Chida et al., 1988). Es werden zwei Therapieansätze verfolgt. Präpartal werden bei drohender Frühgeburt Kortikosteroide v.a. Betamethason verabreicht, um die Lungenreifung zu beschleunigen (Liggins and Howie, 1972) und die pulmonale Surfactant-Konzentration zu erhöhen (deLemos et al., 1970, Kotas and Avery, 1971). Durch die Behandlung konnten auch erhöhte Mengen an SP-A und SP-B nachgewiesen werden (Guarino et al., 2000). Die zweite Therapiestrategie ist die postpartale Verabreichung von Surfactant (Konishi et al., 1988). Vor allem die Kombination dieser beiden Therapien, zeigte ein verbessertes Outcome von mit RDS betroffenen Kindern (Jobe et al., 1993).

Während der Schwangerschaft kann SP-A ab der 20. Woche in Vorläuferzellen der Typ-II-Pneumozyten gemessen werden (Khoor et al., 1993). Zu den Faktoren, die das SP-A Level während der Gestation beeinflussen, gehören Zytokine und Hormone. Die SP-A mRNA in fetalen Zellen wird u.a. durch zyklisches AMP (cAMP) und cAMP-Analoga (Mendelson et al., 1998, Whitsett et al., 1987a), Epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF) (Whitsett et al., 1987b), IFN- γ (Ballard et al., 1990), Prostaglandine (Acarregui et al., 1990), und β -

Sympathomimetika (Odom et al., 1987) erhöht. Gesenkt wird SP-A durch Insulin (Snyder and Mendelson, 1987), *Transforming Growth Factor* (TGF- β) (Whitsett et al., 1987b) und TNF- α (Miakotina and Snyder, 2002). Für Glukokortikoide wurden sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte in Abhängigkeit der Konzentration beschrieben, wobei höhere Konzentrationen die SP-A Expression senken (Boggaram et al., 1991). Infektionen sind häufig die Ursache einer reduzierten SP-A Konzentration. Bei vielen viralen und bakteriellen Pneumonien ist der SP-A Gehalt und die pulmonale Compliance deutlich vermindert. In einer Patientenstudie war der Einfluss auf die SP-A Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) durch gram-positive Bakterien größer als durch gram-negative Bakterien. Bei den gram-positiven Bakterien dieser Pneumonien handelte es sich hauptsächlich um *S. pneumoniae* und *S. aureus* (Baughman et al., 1993, LeVine et al., 1996). Während einer Infektion haben verschiedene Zytokine Einfluss auf die SP-A Expression über noch nicht vollständig verstandene Signalwege (Haczku, 2008). TNF- α verringert die SP-A mRNA über die Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) (Miakotina and Snyder, 2002). Auch IL-6 scheint die SP-A Expression zu senken (Doumanov et al., 2012). IFN- γ und IL-1 wiederum führen zu einer verstärkten SP-A Genexpression (Wispe et al., 1990, Islam and Mendelson, 2002, Ito and Mason, 2010). SP-A wird möglicherweise auch über die Toll like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 beeinflusst. In Retina- und Müllerzellen wurde SP-A durch TLR-2 und TLR-4 Liganden herauf reguliert (Bhatti et al., 2014). Einige Krankheitserreger haben auch direkten Einfluss auf SP-A. So besitzt *Pseudomonas aeruginosa* eine Elastase die SP-A abbaut (Mariencheck et al., 2003). *S. aureus* kann durch seine Cysteinprotease Staphopain A (ScpA, ssPA) SP-A spalten und inaktivieren. Damit hemmen die Bakterien direkt die antimikrobielle Aktivität des Proteins und erleichtern die Kolonisation des Respirationstraktes für sich und andere Pathogene (Kantyka et al., 2013). Durch seine vielen wichtigen Funktionen kann eine verminderte SP-A Konzentration womöglich zu einer Aggravation der Infektion der Lunge führen.

1.5.2 Makrophagen

Während einer Infektion der Lunge spielen Makrophagen eine wichtige Rolle für die Beseitigung von Pathogenen. Makrophagen sind Immunzellen mit vielfältigen Aufgaben und Funktionen (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) und einer einzigartigen Plastizität (Sica and Mantovani, 2012). Sie gehören zu den Leukozyten und werden auch Riesenfresszellen genannt (Nourshargh and Alon, 2014, Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Allard et al., 2018). Als Teil des angeborenen Immunsystems verbinden sie dieses mit dem adaptiven

Immunsystem (Sica et al., 2015, Epelman et al., 2014). Makrophagen kommen sowohl im Blutstrom als Monozyten vor als auch gewebständig in den einzelnen Organen. Die gewebständigen Makrophagen werden wahrscheinlich schon vor der Geburt dort angelegt. Zu ihnen zählen unter anderem die Kupffer-Sternzellen der Leber, Langerhans-Zellen der Haut und Alveolarmakrophagen der Lunge (Epelman et al., 2014). Monozyten werden im Knochenmark gebildet und gelangen in den Blutstrom, von wo aus sie bei Bedarf in infizierte Gewebe einwandern können und sich durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokine und Pathogenprodukten zu Makrophagen differenzieren (Sica et al., 2015, Wynn et al., 2013).

Aufgaben der Makrophagen während einer Infektion sind die Phagozytose von Pathogenen, von infizierten und toten Zellen oder Zelltrümmern, die Antigenpräsentation, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und sie rekrutieren zusätzliche Monozyten aus dem Blutstrom (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Makrophagen besitzen auch antiinflammatorische Fähigkeiten, die dem Schutz und der Regeneration des Gewebes dienen (Sica et al., 2015). Ob eine Makrophage eher anti- oder proinflammatorisch agiert, hängt von der jeweiligen Polarisierung der Zelle ab.

1.5.2.1 Makrophagenpolarisierung

Makrophagen polarisieren sich zu einem proinflammatorischen M1-Typ oder einem antiinflammatorischen M2-Typ in Abhängigkeit von den Einflüssen der Umgebung, denen sie ausgesetzt sind. M1-Makrophagen werden auch klassisch aktivierte und M2-Makrophagen alternativ aktivierte Makrophagen genannt. Dabei sollte beachtet werden, dass diese Einteilung jeweils nur die zwei Extreme der Makrophagenphänotypen beschreibt (Sica et al., 2015, Sica and Mantovani, 2012). Unterschieden werden die Polarisierungen anhand der von den Makrophagen exprimierten Oberflächenmarkern und dem produziertem Zytokinprofil (Bertani et al., 2017). M1 Makrophagen entwickeln sich durch Th-1 Zytokine wie $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ oder auch durch Kontakt mit LPS (Nathan et al., 1983). Sie exprimieren die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 und verschiedene Chemokine wie CXCL9 oder CXCL10 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Typische Oberflächenmarker sind CD80 und CD86 (Stoger et al., 2012). Sie haben starke antimikrobielle Aktivität und sind für die Beseitigung der Pathogene unter anderem durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder Stickstoffspezies (RNS) (Sica et al., 2015), eine verstärkte komplementausgelöste Phagozytose und Antigenpräsentation zuständig (Zhang and Wang, 2014).

Tabelle 1: Makrophagenpolarisierungen (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Martinez and Gordon, 2014) Abhängig von der Stimulation können Makrophagen ihren Phänotyp und damit auch ihre Funktion verändern, was mit bestimmten Expressionsmarkern und einem veränderteten Expressionsprofil von Zytokinen und Chemokinen einhergeht. LPS: Lipopolysaccharid, ROS: reaktive Sauerstoffspezies, IL: Interleukin, IL-1Ra: IL-1 Rezeptorantagonist, TGF- β : Transforming Growth Factor-beta, TLR: Toll-like Rezeptor, iNOS: Stickstoff-Synthase, VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, CXCL: CXC-Chemokin Ligand , CCL: CC-Chemokin Ligand , IFN- γ : Interferon- γ , TNF- α : Tumornekrosefaktor- α , CD: cluster of differentiation, Th-1/2: Typ1/2-T-Helferzellen

Phänotyp	Stimuli	Expressionsmarker	Zytokine, Chemokine und andere sekretierte Mediatoren	Funktion
M1	IFN- γ , TNF- α , LPS	CD80, CD86, CD68, MHC-II, TLR-2, TLR-4, iNOS, IL-10 ^{low} , IL-12 ^{high}	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 ^{high} , IL-10 ^{low} , IL-23, IL-27, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL16, CCL5, ROS	Proinflammatorisch, Th-1-Antwort, Tumor Resistenz, Abtöten intrazellulärer Pathogene
M2a	IL-4, IL-13	CD206, IL-1Ra, IL-1R II, MHC-II	IL-10, TGF- β , CCL17, CCL18, CCL22, CCL24	Anti-inflammatorisch, Gewebereparaturen, Abtöten von Parasiten, Allergien
M2b	Immunkomplexe TLR-Liganden, IL-1 β	IL-10 ^{high} , IL-12 ^{low} , CD86, MHC-II,	TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, CCL-1	Th2-Aktivierung, Immunregulation
M2c	IL-10, TGF- β , Glukokortikoide	CD206, TLR-1, TLR-8	IL-10, TGF- β , CCL16, CCL18, CXCL13	Immunregulation, Phagozytose von apoptotischen Zellen, Gewebereparaturen
M2d	TLR-Liganden, Adenosinrezeptor-Liganden	10 ^{high} , IL-12 ^{low} , VEGF, TNF- α ^{low}	IL-10, VEGF	Angiogenese, Tumorprogression

M2-Makrophagen werden nochmals unterteilt in M2a-d. Auch die Untergruppen haben verschiedene Funktionen und werden jeweils durch unterschiedliche Stimuli aktiviert (Martinez and Gordon, 2014). Insgesamt produzieren sie hauptsächlich antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF β , haben eine starke

Phagozytosekapazität zur Beseitigung von Zelltrümmern oder apoptotischen Zellen, sind aber auch für die Bekämpfung von Parasiten verantwortlich. Sie sind beteiligt an der Gewebereparatur und Wundheilung, dämpfen die Inflammation und fördern die Angiogenese (Sica et al., 2015, Stoger et al., 2012, Wynn et al., 2013, Martinez et al., 2009) (Tabelle 1). In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass die Benennung der Makrophagen in M1 und M2 als unzureichend gilt. Murray et al. schlägt vor, die Bezeichnung durch die Nennung von drei Standards zu verbessern: die Makrophagenquelle, die Definition der verwendeten Aktivatoren und die Bestimmung von Markern, die die Makrophagenaktivierung beschreiben. Dadurch sollen verschiedene experimentelle Versuchsaufbauten besser vergleichbar sein (Murray et al., 2014).

Weiterhin können Makrophagen durch eine ausgesprochen hohe Plastizität repolarisieren und den Phänotyp wechseln. So sind die M1- und M2-Polarisierungen nur die jeweiligen Extreme. *In vivo* finden sich häufig Übergangsstadien der beschriebenen Phänotypen (Sica et al., 2015, Zhang and Wang, 2014, Mantovani et al., 2004). Zur besseren Übersicht wurde in dieser Arbeit dennoch die M1- und M2-Bezeichnung beibehalten.

1.5.2.2 Makrophagen während der Infektion

Während einer Infektion lassen sich bei der Makrophagenreaktion verschiedene Stadien erkennen (Zhang and Wang, 2014). (1) Zunächst werden eindringende Pathogene durch PRRs anhand ihrer Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) erkannt (Elinav et al., 2011, Kawai and Akira, 2011, Osorio and Reis e Sousa, 2011). Dadurch kommt es zur Aktivierung eines Transkriptionsprogramms, das zur Phagozytose, zellulärer Aktivierung und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt (Sica et al., 2015, Zhang and Wang, 2014). (2) Daraufhin folgt entweder die Rekrutierung von weiteren Monozyten in das infizierte Gewebe oder eine durch IL-4 angeregte Proliferation der Makrophagen (Epelman et al., 2014). Die Migration wird hauptsächlich durch PAMPs oder Damage-associated Molecular Pattern (DAMPs), Chemokinen und der Aktivierung des Endothels initiiert (Nourshargh and Alon, 2014). Eines der bekanntesten Chemoattractants ist das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1, CCL2), das unter anderem von aktivierten Fibroblasten (Rolfe et al., 1992), endothelialen Zellen (Brown et al., 1994) und Monozyten (Conti and DiGiacchino, 2001) exprimiert wird. Es kommt zur Adhäsion und transendothelialen Migration von Makrophagen. Dafür spielen u.a. Adhäsionsmoleküle wie Selektine und Integrine eine Rolle (Nourshargh and Alon, 2014, Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

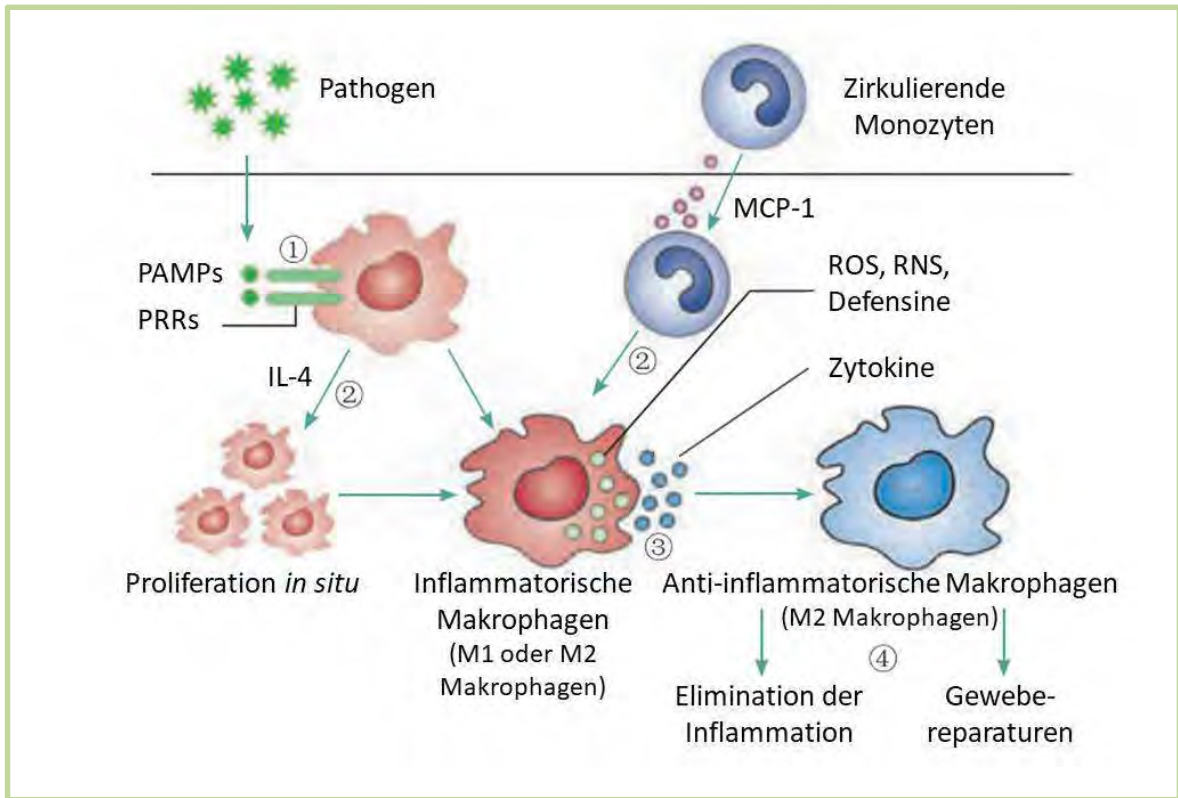


Abbildung 6: Aktivierung der Makrophagen während einer Infektion (Zhang and Wang, 2014)

1) Eindringende Pathogene besitzen Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) die durch Pattern Recognition Receptors (PRRs) der Makrophagen erkannt werden. 2) Es kommt unter Stimulation von IL-4 zur Proliferation der Makrophagen *in situ* und zusätzlich zur Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut, unter anderem durch das Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1), um die Anzahl der Makrophagen zu erhöhen. 3) Die Makrophagen differenzieren zu inflammatorischen Makrophagen des M1- (bei bakteriellen- oder Virusinfektionen) und des M2- (bei Wurminfektionen) Typ. Sie schütten Zytokine wie $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6 etc. aus und bilden bakterizide Defensine, Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) und Reaktive Stickstoff Spezies (RNS). 4) Im Anschluss an die Infektion polarisieren die Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp, der Gewebereparaturen unterstützt und die Inflammation beendet.

(3) Für die Elimination der Pathogene kommt es bei einer bakteriellen oder viralen Infektion zur Polarisierung von klassisch aktivierten M1-Makrophagen und bei Wurminfektionen zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen. Die Makrophagen bilden die oben beschriebenen proinflammatorischen Zytokine und Chemokine und präsentieren nach Aufnahme der Pathogene deren Antigene an ihrer Zelloberfläche (Wynn et al., 2013, Zhang and Wang, 2014). Dies dient unter anderem der Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Sica et al., 2015). (4) Nach Beseitigung der Infektion polarisieren Makrophagen zu einem antiinflammatorischen Phänotyp, der Gewebereparaturen gewährleistet und die Homöostase wiederherstellt (Zhang and Wang, 2014, Sica et al., 2015). Alternativ vollziehen sie den apoptotischen Zelltod. Dies dient dazu, durch die Inflammationsantwort hervorgerufene Gewebeschäden zu vermeiden (Wynn et al., 2013) (Abb.6). Obwohl Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr spielen, sind sie

auch beteiligt an der Pathogenese vieler Erkrankungen wie z.B. bei der Arteriosklerose (Stoger et al., 2012), Krebserkrankungen (Sica et al., 2015) und Diabetes mellitus (Di Gregorio et al., 2005).

1.6 Modelle zur Untersuchung der pulmonalen Koinfektion

Die Lunge gewährleistet den lebensnotwendigen Gasaustausch über die Alveolen. Über sie gelangt CO₂ aus dem Blutstrom in die Lunge, um abgeatmet zu werden und O₂ aus der Lunge in das Blut zur Sauerstoffversorgung der Organe. Weiterhin kann über die Lunge bis zu einem gewissen Grad der Säure-Basen-Haushalt des Körpers reguliert und der Blutdruck beeinflusst werden (Kizilkurtlu et al., 2018). Das Epithel wird hauptsächlich von den flachen Typ-I-Pneumozyten gebildet, die über Tight Junctions miteinander verbunden sind. Sie entwickeln sich aus den kubischen Typ-II-Pneumozyten, die auch für die Surfactant-Produktion verantwortlich sind. Unterhalb des Epithels finden sich die Endothelzellen der Blutgefäße, mit denen sie gemeinsam die alveolo-endotheliale Barriere bilden (Herzog et al., 2008). Die Integrität dieser Barriere ist essentiell für die Aufrechterhaltung der physiologischen Lungenfunktion. Eine Beschädigung insbesondere der endothelialen Zellbarriere und eine damit einhergehende Veränderung der Permeabilität ist Kennzeichen einer akuten oder chronischen Lungenerkrankung. Es kommt zum kapillären Leck mit einem Flüssigkeits- und Proteineinstrom in die Alveolen (Huertas et al., 2018). Weitere Zellen des Alveolus sind Fibroblasten, die die Alveolarstruktur unterstützen und Alveolarmakrophagen (Herzog et al., 2008). Alveolarzellen und Alveolarmakrophagen sind ein wichtiger Teil der Immunabwehr gegen eindringende Pathogene (Chuquimia et al., 2013).

Es sind verschiedene Modelle verfügbar, um die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt während einer pulmonalen Infektion zu untersuchen. Die am häufigsten verwendeten Modelle sind dabei **Mono-Zellkulturen** und **Tiermodelle**, bei denen vor allem mit Mäusen gearbeitet wird (Mairpady Shambat et al., 2015, Siemens et al., 2017).

1.6.1 *In vitro* Modelle

In vitro Modelle, wie die zweidimensionalen Mono-Zellkulturen, haben den Vorteil, dass sich Zellreaktionen auf Infektionen leicht beobachten und messen lassen, sie relativ geringe Kosten und Aufwand verursachen und sehr gut etabliert sind, weshalb es unzählige Studien zur Vergleichbarkeit von Ergebnissen gibt (Kizilkurtlu et al., 2018). Nachteilig ist, dass sie sehr wenig mit dem intakten Gewebe eines lebenden Organismus gemein haben (Mairpady Shambat et al., 2015). Sie sind nicht repräsentativ dafür, wie sich Zellen tatsächlich in einem

System verhalten, in dem sie von anderen Zellen umgeben sind und in dem eine intra- und interzelluläre Interaktion stattfindet (Kizilkurtlu et al., 2018).

1.6.2 *In vivo* Modelle

Murine Modelle sind geeignet um die Konsequenzen einer Infektion *in vivo* zu studieren. Vor allem Mäuse werden häufig für Pneumoniemodelle und Koinfektionen genutzt aufgrund ihrer schnellen Replikationsrate, geringen Größe und dem detaillierten Wissen um ihre Genetik und Immunantwort (Siemens et al., 2017). Auch die Möglichkeit, Gene durch „knock-in“ oder „knock-out“ einzufügen bzw. zu inaktivieren, ist ein Vorteil der Mausmodelle (Parker, 2017). Dadurch konnten bereits viele Erkenntnisse gewonnen werden, wie die gegenseitige synergistische Beeinflussung von Viren und Bakterien oder die erhöhte Inflammationsantwort auf eine Koinfektion im Vergleich zu einer Einzelinfektion (Iverson et al., 2011, Jia et al., 2018). Allerdings weist dieses Modell auch einige schwerwiegende Limitationen auf. So sind die Anatomie, Physiologie und vor allem das Immunsystem von Menschen und Mäusen nur bedingt vergleichbar. Es wurden Unterschiede in der Inflammationsantwort der Makrophagen, der Regulation und Entwicklung der T-Zellen, der Zytokin- und Chemokinantwort, den Toll-like Rezeptoren und vielem mehr beschrieben (Mestas and Hughes, 2004). Weiterhin beruhen einige Pathomechanismen auf spezies-spezifischen Virulenzfaktoren, wie der des von *S. aureus* exprimierten PVLs. Auf Zellen von Mäusen hat es keine Wirkung, bei humanen Zellen jedoch kommt es zur Porenbildung bei neutrophilen Granulozyten, die eine nekrotisierende Pneumonie zur Folge haben kann (Loffler et al., 2013, Loffler et al., 2010). Auch andere Superantigene oder Enterotoxine, die von *S. aureus* gebildet werden, haben auf den menschlichen Organismus einen stärkeren Effekt als auf Mäuse, bei denen viel höhere Dosen dieser Proteine verabreicht werden müssen, um eine Antwort zu provozieren (Parker, 2017).

1.6.3 *Humanes Alveolus-on-a-Chip* Modell

Es werden seit einiger Zeit dreidimensionale Modelle entwickelt, um die Lunge und andere Organe *in vitro* zu simulieren (Kizilkurtlu et al., 2018). Dies hat den Vorteil, dass gut definierte, menschliche Zellen verwendet werden können (Niemann et al., 2012). Darüber behalten Zellen ihren differenzierten Phänotyp bei und bilden eine Architektur aus, die stark den *in vivo* Strukturen gleicht. Sie eignen sich, um die Gewebeinflammation und Infektion unter physiologischen Bedingungen sowie die Interaktion zwischen Nicht-Immunzellen und Immunzellen zu untersuchen (Mairpady Shambat et al., 2015, Nguyen Hoang et al., 2012).

Das für die Versuche verwendete *humane Alveolus-on-a-Chip* (hAC)-Modell ist an der anatomischen Struktur der Alveolen ausgerichtet. Es wurde ein multi-organ-tissue-flow (MOTiF) Biochip genutzt, der zwei Kammern besitzt, die durch eine mit Poren besetzte Membran getrennt sind (Abb. 7). Auf der vaskulären Seite befinden sich primäre Endothelzellen - die humanen umbilicalen Endothelialzellen (HUVECs). Sie werden unter einer Perfusion mit Mediumfluss kultiviert. Die hämodynamischen Kräfte durch den Blutfluss sind essentiell, für die Funktion der Endothelzellen. So kommt es im MOTiF Biochip durch die mechanische Stimulation zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts, einer erhöhten endothelialen Zelldichte und gesteigerter Bildung von endothelialen Markerproteinen z.B. von-Willebrandfaktor und PECAM-1 (Raasch et al., 2015). Auf der anderen Seite der Membran befinden sich die Alveolarepithelzellen und aus Monozyten differenzierte Makrophagen. In dieser Kammer befindet sich Luft und die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt durch die endotheliale Seite über die Poren in der Membran (Abb. 7). Durch die Poren können ebenfalls Moleküle, Zellen und Pathogene von einer Kammer in die andere gelangen. In dem hAC-Modell können die zellulären Interaktionen und die immunologischen Reaktionen unter dem Einfluss einer Koinfektion direkt untersucht werden (vgl. Kapitel 3.1 unter Materials and methods).

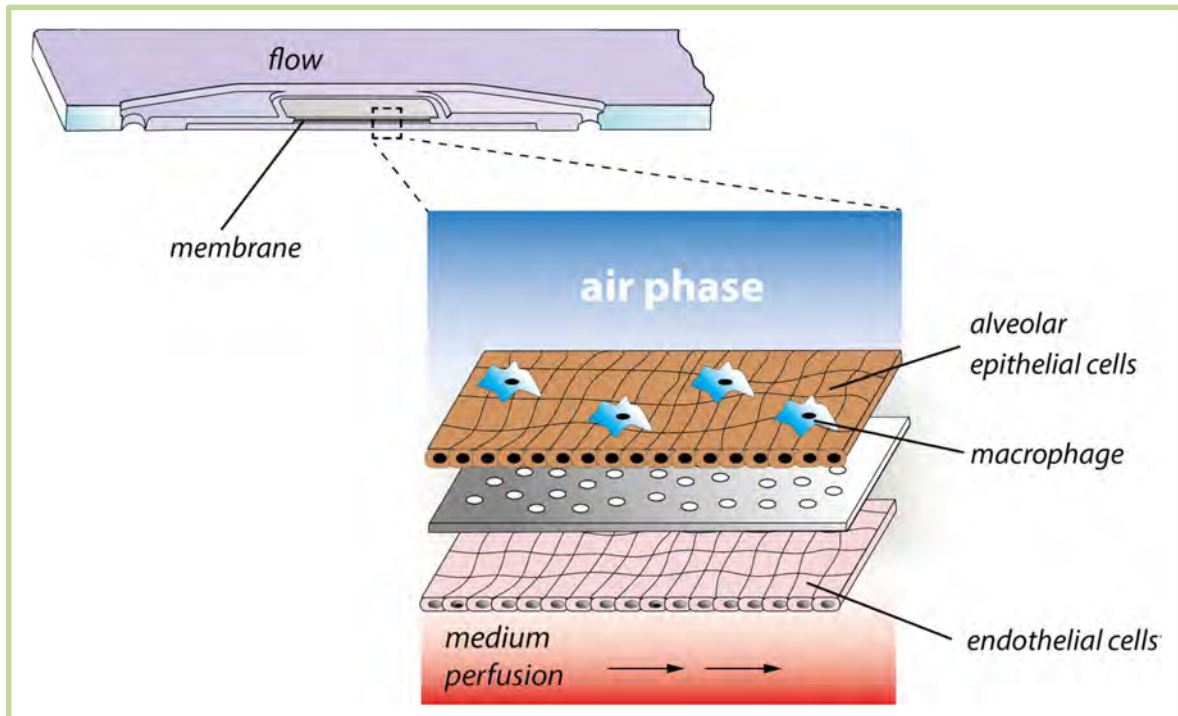


Abbildung 7: Aufbau des Human Alveolus-on-a-Chip Modells Das hAC Modell besteht aus zwei Kammern, die durch eine mit Poren versehene Membran getrennt sind. In der einen Kammer werden Endothelzellen kultiviert, die durch die Mediumperfusion unter Scherstress gesetzt werden. Auf der anderen Seite der Membran befinden sich sowohl Epithelzellen als auch Makrophagen. In dieser Kammer befindet sich kein Medium – die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt über die endotheliale Seite.

2 Ziele der Arbeit

Pneumonien gehören zu den häufigsten zum Tode führenden Infektionserkrankungen in den Industrieländern (Ruuskanen et al., 2011) und insbesondere viral-bakterielle Koinfektionen gehen mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Chertow and Memoli, 2013). Ziele dieser Arbeit sind die:

I. Etablierung eines human-spezifischen *in vitro* Modells

Da die immunologische Antwort auf Pathogene in vielen Bereichen spezies-spezifisch ist (Mestas and Hughes, 2004), war das erste Ziel der Arbeit die Etablierung eines human-spezifischen Modells, das der menschlichen Anatomie möglichst nahekommt. Die komplexe Interaktion von verschiedenen Zelltypen und Immunzellen untereinander sowie ihre Reaktion auf Pathogene sollten in einem solchen Modell möglichst gut zu analysieren sein. Das hAC Modell wurde auf gewebetypische Proteine und Eigenschaften der menschlichen Lunge mit besonderem Schwerpunkt auf antimikrobiellen Eigenschaften geprüft.

II. Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion am hAC Modell

Anschließend wurden die Mechanismen der viral-bakteriellen Infektion an dem human-spezifischen Modell untersucht. Um weitere Erkenntnisse über den letalen Synergismus der Pathogene zu gewinnen, wurde vor allem auf Merkmale schwerer Infektionen geachtet. Dazu gehörten die Pathogenlast, die Zytokinausschüttung und die alveolär-endotheliale Barrierefunktion bzw. die Zellintegrität. Studien und Auswertungen von Patientendaten legten nahe, dass die Koinfektion allgemein mit schweren Folgen für das Lungengewebe verbunden ist (Klemm et al., 2017, Louria et al., 1959). Dies sollte im hAC Modell bestätigt werden.

III. Analyse der Auswirkungen der Koinfektion auf das Surfactant Protein A

Im Besonderen sollten die Auswirkungen von Infektionen auf das pulmonale SP-A analysiert werden, da dieses zu den Mechanismen der Pathogenabwehr der Lunge gehört. Durch einen erniedrigten SP-A Gehalt kann die Lunge geschwächt und somit anfälliger für weitere Infektionserreger sein (LeVine et al., 2000, Kantyka et al., 2013). Es wurde vermutet, dass die Koinfektion einen stärkeren Einfluss auf den SP-A Gehalt in der Lunge als die Einzelinfektionen hat. So wurden Parameter untersucht, die sich während einer Koinfektion im Vergleich zur Einzelinfektion verändern und die gleichzeitig Einfluss auf die SP-A Konzentration haben. Dies sollte vor allem im hAC Modell überprüft werden, da auch die Zellinteraktionen zwischen Immunzellen und Nicht-Immunzellen vor allem über exprimierte Zytokine Auswirkungen auf SP-A haben könnten.

3 Publierte Originalarbeiten

3.1 Co-infection with Staphylococcus aureus after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model

Titel: Co-infection with Staphylococcus aureus after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model

Autoren: Stefanie Deinhardt-Emmer*, Knut Rennert*, Elisabeth Schicke, Zoltán Cseresnyés, Maximilian Windolph, Sandor Nietzsche, Regine Heller, Fatina Siwczak, Karoline Frieda Haupt, Swen Carlstedt, Michael Schacke, Marc Thilo Figge, Christina Ehrhardt, Bettina Löffler und Alexander S. Mosig
*Erstautoren

Zeitschrift: Biofabrication, Volume 12, Number 2, S. 1-18

Jahr: 2020

Biofabrication



PAPER

OPEN ACCESS

RECEIVED
11 November 2019

REVISED
17 January 2020

ACCEPTED FOR PUBLICATION
27 January 2020

PUBLISHED
19 February 2020

Original content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 licence](#).

Any further distribution of this work must maintain attribution to the author(s) and the title of the work, journal citation and DOI.



Co-infection with *Staphylococcus aureus* after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model

Stefanie Deinhardt-Emmer^{1,2,3,10,11} , Knut Rennert^{2,4,10,11}, Elisabeth Schicke^{3,5}, Zoltán Cseresnyés⁶, Maximilian Windolph³, Sandor Nietzsche⁷, Regine Heller⁸, Fatina Siwczak², Karoline Frieda Haupt³, Swen Carlstedt², Michael Schacke³, Marc Thilo Figge^{6,9}, Christina Ehrhardt³, Bettina Löffler^{1,2} and Alexander S Mosig² 

¹ Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, D-07747 Jena, Germany

² Center for Sepsis Control and Care, Jena University Hospital, D-07747 Jena, Germany

³ Section of Experimental Virology, Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Hans-Knöll-Str. 2, D-07745, Jena, Germany

⁴ Dynamic42 GmbH, Winzerlaer Str. 2, D-07745 Jena, Germany

⁵ Interdisciplinary Center of Clinical Research (IZKF), Jena University Hospital, D-07747 Jena, Germany

⁶ Research Group Applied Systems Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knöll Institute, D-07745, Jena, Germany

⁷ Center for Electron Microscopy, Jena University Hospital, D-07743 Jena, Germany

⁸ Institute of Molecular Cell Biology, Jena University Hospital, Hans-Knöll-Str. 2, D-07745, Jena, Germany

⁹ Institute of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Friedrich Schiller University of Jena, D-07745, Jena, Germany

¹⁰ These authors contributed equally to this work.

¹¹ Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: stefanie.deinhardt-emmer@med.uni-jena.de and knut.rennert@dynamic42.com

Keywords: human alveolus-on-a-chip model, pneumonia, *Staphylococcus aureus*, influenza virus, co-infection, epithelial/endothelial barrier

Supplementary material for this article is available [online](#)

Abstract

Pneumonia is one of the most common infectious diseases worldwide. The influenza virus can cause severe epidemics, which results in significant morbidity and mortality. Beyond the virulence of the virus itself, epidemiological data suggest that bacterial co-infections are the major cause of increased mortality. In this context, *Staphylococcus aureus* represents a frequent causative bacterial pathogen. Currently available models have several limitations in the analysis of the pathogenesis of infections, e.g. some bacterial toxins strongly act in a species-specific manner. Human 2D mono-cell culture models often fail to maintain the differentiation of alveolus-specific functions. A detailed investigation of the underlying pathogenesis mechanisms requires a physiological interaction of alveolus-specific cell types. The aim of the present work was to establish a human *in vitro* alveolus model system composed of vascular and epithelial cell structures with cocultured macrophages resembling the human alveolus architecture and functions. We demonstrate that high barrier integrity maintained for up to 14 d in our model containing functional tissue-resident macrophages. We show that flow conditions and the presence of macrophages increased the barrier function. The infection of epithelial cells induced a high inflammatory response that spread to the endothelium. Although the integrity of the epithelium was not compromised by a single infection or co-infection, we demonstrated significant endothelial cell damage associated with loss of barrier function. We established a novel immune-responsive model that reflects the complex crosstalk between pathogens and host. The *in vitro* model allows for the monitoring of spatiotemporal spreading of the pathogens and the characterization of morphological and functional alterations attributed to infection. The alveolus-on-a-chip represents a promising platform for mechanistic studies of host-pathogen interactions and the identification of molecular and cellular targets of novel treatment strategies in pneumonia.

Introduction

Pneumonia is the most common infectious disease and also the most serious inflammatory event of the lower respiratory tract. Acute respiratory disease is a major medical concern, particularly for the immunocompromised host [1]. Pneumonia can be caused by a wide variety of microorganisms, including bacteria, viruses, and fungi. In particular, seasonal influenza virus (IV)-associated bronchopneumonia belongs to the infectious diseases with the highest population-based mortality. A major cause of mortality of IV infection consists of the onset of subsequent bacterial superinfection, i.e. with *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) or *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*). The bacterium *S. aureus* is recognized as a major public health burden and a leading cause of severe invasive infections. Nasopharyngeal colonization with *S. aureus* can reach approximately 30% of the human population, and published data indicate that colonization is a known risk factor for an invasive disease such as pneumonia [2]. The lung is a preferred entry point for pathogens, and infections can be associated with a depressed immune cell function [3].

To date, the majority of studies investigating microbial infections of the lung rely on the use of animal models such as mice. However, lung anatomy and physiology, as well as the immune response, significantly differ between mice and men [4]. In particular, significant differences in the composition of innate and adaptive immune cells, including the expression of toll-like receptors, chemokines, and the differentiation of Th1/Th2, were described [5]. The interactions of pathogens and the immune system are partly based on species-specific effects [6]. The pathogenic mechanisms of *S. aureus* are largely dependent on a panel of species-specific virulence factors. Hence, the activity of toxins plays a major role in acute respiratory failure in humans [7]. Thus, reliable *in vitro* models closely resembling physiologically relevant conditions that reflect the human situation are required for the identification of novel targets in the interaction between microbial communities and their host.

The human alveolus, as a prominent part of the air-blood barrier, is mainly composed of type I and type II alveolar epithelial cells, endothelial cells and alveolar macrophages. This composition of various cells leads to the development of a solid permeability barrier of the human alveolus [8]. Epithelial cells function as oxygen and carbon dioxide exchange systems, but in addition, their immunological tasks are highly relevant. However, human alveolar cells often fail to maintain the differentiation and expression of lung-specific functions due to static mono-cell culture conditions. We generated a human alveolus model that provides immune-responsive cellular interphase between a vascular endothelium and an epithelial layer exposed to an air phase. The TEER-measurement as well as the permeability assays is able to show a high

barrier formation of the human-alveolus-on-a-chip after 14 d of cultivation demonstrating the optimal comparability to the human alveolus. The coculture of epithelial, endothelial and myeloid THP-1 cells to recreate a lung barrier model was already proposed by Dohle *et al* [9]. This approach was extended by us to a triple cell co-culture system comprising human monocyte-derived macrophages as THP-1 cells are known to possess limitation in their inflammatory response to stimulation with bacteria derived molecules and therefore do not fully reflect the human monocyte/macrophage biology *in vitro* [10]. In addition, the culture approach was improved by perfusion of the endothelial cell layer to recreate more physiological conditions and to prevent endothelial dedifferentiation that is often associated with static culture conditions [11]. By integrating tissue-resident immune cells and monitoring their function, biochips represent a valuable tool to perform complex analysis of host-pathogen interactions in an immune competent environment *in vitro*. In a model of human endotoxemia caused by LPS and in infection models with IV and *S. aureus*, we demonstrated that central pathophysiological aspects of pneumonia can be emulated in the system. The alveolus model has been used to characterize the spatiotemporal spreading of *S. aureus* in mono- and co-infection conditions with IV and to identify endothelial dysfunction as a potential therapeutic target in the course of superinfection within the lung.

1. Materials and methods

1.1. Composition of the human alveolus-on-a-chip model

Multiorgan tissue flow (MOTiF) biochips were manufactured by microfluidic ChipShop GmbH (Jena, Germany). Briefly, MOTiF biochips consist of two chambers separated by a porous membrane (figure 1) [11]. The membrane has a thickness of 12 μm and is made of polyethylene-terephthalate. It contains pores randomly distributed with a diameter of 8 μm and a median pore density of 1×10^5 pores cm^{-2} .

The volume of the epithelial chamber is 220 μl (including the afferent and efferent channels), while the volume of endothelial chamber is 120 μl (including the channels). The channel and chamber structures are covered by a gas permeable polystyrene (PS) bonding foil. The biochip was perfused by peristaltic pumps (Ismatec REGLO digital MS-CA-4/12-100, Wertheim, Germany), silicon tubing (Ismatec), and connectors and plugs (microfluidic ChipShop). Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were isolated from human umbilical cord veins as described previously and seeded into the biochip (vascular cavity) at a density of 2.7×10^5 HUVECs cm^{-2} in endothelial cell growth medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) [12]. Cells were cultured for 48 h

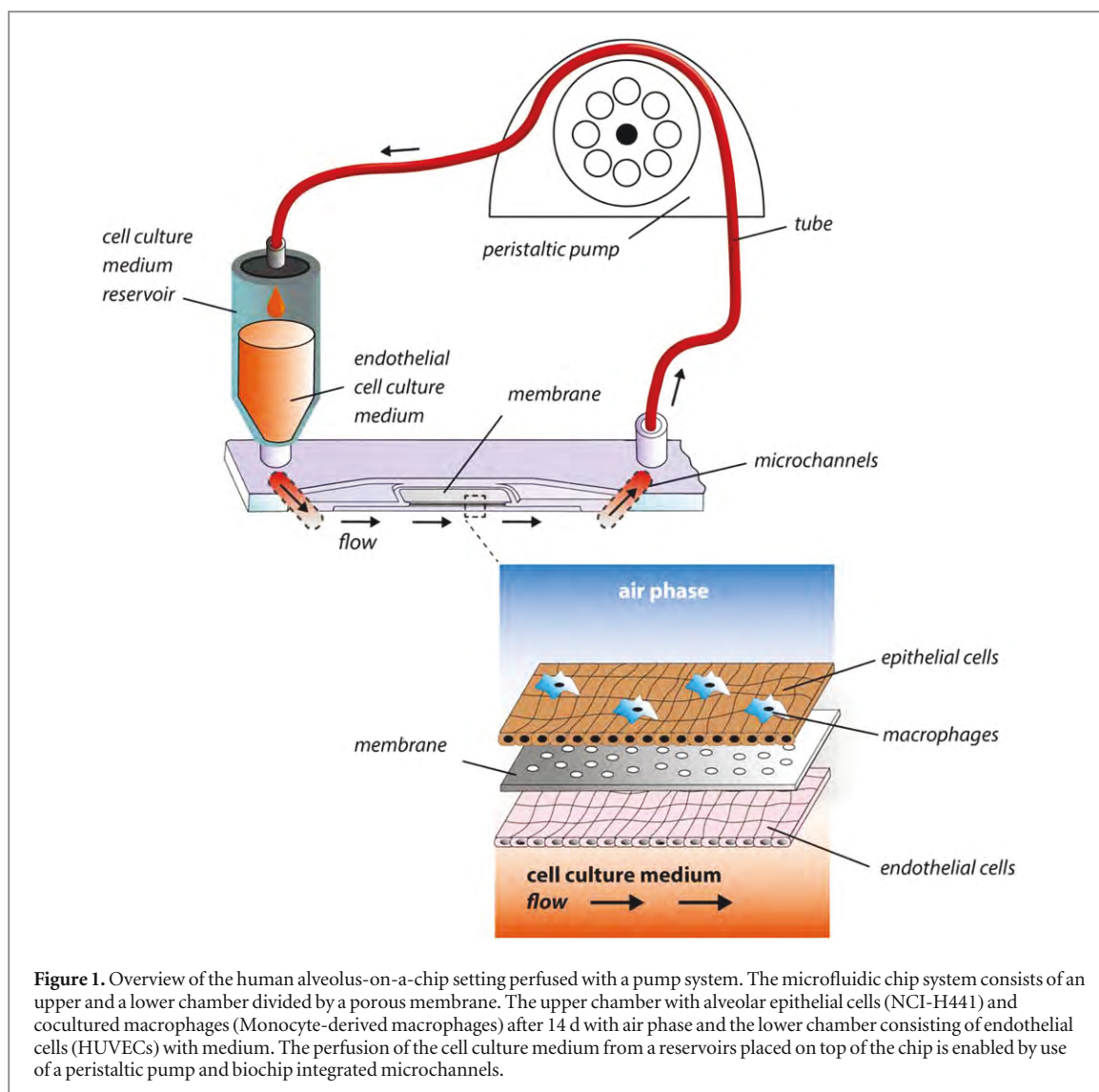


Figure 1. Overview of the human alveolus-on-a-chip setting perfused with a pump system. The microfluidic chip system consists of an upper and a lower chamber divided by a porous membrane. The upper chamber with alveolar epithelial cells (NCI-H441) and cocultured macrophages (Monocyte-derived macrophages) after 14 d with air phase and the lower chamber consisting of endothelial cells (HUVECs) with medium. The perfusion of the cell culture medium from a reservoirs placed on top of the chip is enabled by use of a peristaltic pump and biochip integrated microchannels.

with a daily medium exchange. NCI-H441 cells (ATCC, Manassas, USA) were cultured in RPMI-1640 (Lonza, Cologne, Germany) and 10% fetal calf serum (FCS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and were seeded on the opposite side of the membrane (epithelial chamber) with a density of 2.7×10^5 NCI-H441/cm². Cells were cultured for 2-3 d until confluency with a daily media exchange. Subsequently, NCI-H441 medium was supplemented with 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). After 1 week of culture, monocyte-derived macrophages were seeded on top of the NCI-H441 cell layer with a density of 0.9×10^5 macrophages cm⁻². Beside the epithelial cell line NCI-H441, we used human primary epithelial cells (NHBE, human bronchial epithelial cells, Lonza Group AG, Basel, Switzerland) to verify the key-findings of our model. For this, cells were seeded with a density of 3×10^5 NHBE cm⁻² at the epithelial side of the human alveolus-on-a-chip. The cells were cultured for 7 d and afterwards, monocyte-derived macrophages were seeded on the chip as described above.

After the integration of macrophages, the cells were cultivated until day 9 with media in both chambers and without connection to the pump system. From the next day on, the system was cultivated under flow condition on the endothelial side of the membrane (dynamic condition). To determine the effect of this flow condition, we have compared the parameters with the chip model which was not connected to the peristaltic pump (static condition).

The medium composition for the epithelial cavity was adjusted to RPMI-1640 containing 20% autologous human serum, 10 ng ml⁻¹ human granulocyte macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF, Peprotech, New York, USA), 1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). After one day of macrophage attachment, chip perfusion was initiated in the vascular cavity with a flow rate of 21 μ l min⁻¹ corresponding to a shear stress of 0.23 dyn cm⁻². Flow rates and shear stress values were calculated as recently described [11]. One day later, the air-liquid interface

(ALI) was established in the alveolar cavity and the vascular medium was supplemented with EC-medium containing 20% autologous human serum, 10 ng ml^{-1} GM-CSF, and $1 \text{ } \mu\text{M}$ dexamethasone. During the maintenance of the alveolar biochip cell culture, a medium exchange was performed on a daily basis in both cavities with the respective media. As soon as the epithelial cavity was filled with air, medium exchanges ceased in this cavity, and cells were nourished by the vascular side (supplementary figure 1 is available online at stacks.iop.org/BF/12/025012/mmedia).

1.2. Infection and stimulation

The human alveolus-on-a-chip model was perfused for a total of 7 d. The infection with IV and/or *S. aureus* was subsequently performed under static conditions. All infection scenarios were performed in a complete human alveolus-on-a-chip model with integrated macrophages. The IV strain PR8 (H1N1) was passaged on Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) and stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until infection. The methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strain USA300 was grown in brain heart infusion-medium at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ with shaking. For the determination of the multiplicity of infection (MOI), the colony forming units (CFUs) were ascertained weekly.

For infection, we simultaneously performed single bacterial and viral infection as well as co-infection consisting of a primary virus and a secondary bacterial infection [13]. NCI-H441-cells or human primary epithelial cells (NHBE) were infected with IV (MOI 1) or *S. aureus* (MOI 5) or superinfected with both pathogens. For the control, cells were mock treated. Briefly, cells were incubated with the virus for 30 min. Subsequently, the media were changed, and the cells were superinfected with *S. aureus*. Extracellular bacteria were removed by lysostaphin treatment ($6 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, 20 min) 90 min after bacterial infection [13]. Subsequently, lysostaphin was rinsed with phosphate buffer solution (PBS), and cells were supplied with fresh medium. Chambers were incubated for 3 h after a lysostaphin washing step to analyze the cytokine production.

Furthermore, the alveolus model was cultured under perfused conditions for 7 d and subsequently stimulated with 100 ng ml^{-1} LPS (from *Escherichia coli* (*E. coli*) strain E0111:B4; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for additional 24 h.

Supernatants of the epithelial and endothelial chamber were stored at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. The verification of the infection with *S. aureus* (MOI 5) and with both pathogens (co-infection) was performed by collecting the supernatants of the epithelial and endothelial layer of the human alveolus-on-a-chip model. Supernatants were collected and promptly plated on

agar plates in 3 different dilutions. After 24 h of growth, CFUs were counted.

1.3. Monocyte isolation and cell culture

Primary monocytes were isolated from whole peripheral blood of healthy donors. The blood was diluted in an equal volume with phosphate buffer saline (PBS), 2 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA, Sigma-Aldrich, Germany), and 0.1% bovine serum albumin (BSA, Carl Roth GmbH and Co. KG, Karlsruhe, Germany) and gently transferred on top of a Biocoll separation solution (Biochrom, Berlin, Germany). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from blood cells by centrifugation without brakes. Cells were washed three times with PBS, 2 mM EDTA, and 0.1% BSA with centrifugation steps in between. For alveolar chip generation, 1×10^7 PBMCs/well were cultured in 6-well dishes in X-VIVO 15 medium supplemented with 10% autologous human serum, 10 ng ml^{-1} human GM-CSF (PeproTech, Hamburg, Germany), 10 ng ml^{-1} macrophage colony-stimulation factor (M-CSF) (PeproTech, Hamburg, Germany), and penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The cells were incubated for 2 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ and 5% CO_2 and subsequently washed twice with X-VIVO 15 (Lonza, Cologne, Germany) and cultured in X-VIVO 15 with supplements [14]. Cells were cultured for 1 d and subsequently used for seeding in the human alveolus-on-a-chip model (supplementary figure 1).

1.4. Quantification of cytokines

Measurement of cytokines was performed by using multiplex bead-based immunoassays (LEGENDplex, BioLegend, San Diego, CA, USA) [15]. Briefly, supernatants from both chambers were collected 3 h post infection (p.i). Experiments were repeated at least three times, and all samples were measured in duplicate within a 96-well plate by using the BD Accuri flow cytometer (BD, Heidelberg, Germany). Data analysis was performed with LEGENDplex™ data analysis software from BioLegend (San Diego, CA, USA).

1.5. Quantitative real-time PCR

The isolation of total RNA from all cells of the human alveolus-on-a-chip model was performed by using QIAshredder homogenizers (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA was isolated with RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following manufacturer's directions. The gene expression of indicated genes was determined by quantitative RT-PCR on a Thermo Scientific™ PikoReal™ Real-Time PCR System using the QuantiTect SYBR Green kit (Qiagen) and gene-specific primers. For this we use GAPDH(fwd) 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3' and GAPDH(rev) 5'-CAATACGACCAAATCCGTTGAC-3' and for the

detection of IV we use IV(fwd) 5'-GACCAATCCTGT-CACCTCTGAC-3' and IV(rev) 5'-AGG GCA TTT TGG ACA AAG CGT CTA-3'. For the detection of the surfactant protein A (SP-A) mRNA we use the following primer set SP-A(fwd) 5'-GAT GGG CAG TGG AAT-3' and SP-A(rev) 5'-GGG AAT GAA GTG GCT AAG GGT G-3'. All primers were synthesized by metabion international AG (Planegg, Germany).

1.6. Permeability assay

To test the permeability of the epithelial and endothelial barrier, 1 mg ml⁻¹ of 3–5 kDa fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (Sigma-Aldrich, Germany) in phenol-red free DMEM/F12 medium (Sigma-Aldrich, Germany) was injected into the upper chamber of the chip. The lower chamber contained only phenol red free DMEM/F12. The alveolus model was incubated for 60 min under static conditions. Afterwards, the media from the lower and upper chambers were collected, and fluorescence intensity (exc. 488 nm; em. 518 nm) was measured in a 96-well μ Clear black plate (Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) by a Tecan Infinite M200 Pro microplate reader (Tecan Group Ltd, Maennedorf, Switzerland). The permeability coefficient (P_{app}) was calculated according to $P_{app} \text{ (cm s}^{-1}\text{)} = (dQ/dt)(1/AC_o)$. For this, dQ/dt represent the steady-state flux (g s⁻¹), A the culture surface area (cm²) and C_o the initial concentration (mg ml⁻¹) [16].

1.7. Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER)

To determine the integrity of the barrier, we performed TEER measurements. For this, indium tin oxide (ITO)-covered glass slides (Sigma-Aldrich) were attached with adhesive foil to the top and bottom of MOTiF biochips facing the cell seeded membrane. Slides were pressed for 24 h to the chips to achieve fluid impermeable 'bonding'. Cell seeding was performed according to the 'Composition of the human alveolus-on-a-chip model' section. Every 24 h transepithelial resistance measurements were performed until the establishment of an ALI. Subsequently, resistance was measured on days 1, 3, 5, and 7. For these measurements, the air-containing channel was carefully filled with medium allowing current flow between the fixed ITO slides. After the measurement, the channel was emptied by aspirating the medium. For TEER monitoring, the AC resistance of the biochip chamber was measured. Therefore, the ITO-covered slides were connected by copper clamps and supplied with a constant amplitude AC voltage of 0.87 V_{RMS} at a frequency of 1.6 kHz. The resulting AC current was measured by means of a U1251A digital multimeter (Agilent, Santa Clara, USA). The maximum possible AC current of the given structure of the biochip filled with growth medium and without cells was found to

be 1.7 mA_{RMS}, which corresponds to a resistance of 512 Ω .

1.8. Immunofluorescence staining

The membranes of the chip with attached cell layers were carefully excised 3 h p.i and washed in PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ (Lonza). Subsequently, membranes were fixed in 4% paraformaldehyde (at room temperature (RT) for 10 min) or 100% methanol (at -20 °C for 10 min). Further, membranes were washed three times with PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺ and then blocked in PBS with 3% normal donkey serum (Dianova) 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Germany) or PBS with 3% normal donkey serum and 0.1% saponin (Sigma-Aldrich, Germany). Subsequently, membranes were incubated overnight by combinations of the following primary antibodies against aquaporin-5 (Abcam, Cambridge, UK), von Willebrand Factor (VWF) (DAKO, Hamburg, Germany), vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), zonula occludens-1 (ZO-1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), endothelial cadherin (E-cadherin) (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), SP-A (Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Germany), CD68 (BD Biosciences, Heidelberg, Germany), *S. aureus* (Squarix biotechnology, Marl, Germany) and IV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Following three washing steps in PBS or PBS/0.1% saponin, membranes were incubated for 30 min at RT with DAPI (Life Technologies) and the following secondary antibodies: donkey immunoglobulin (Ig)G anti-mouse IgG-Cy3, donkey IgG F(ab') anti-rabbit IgG-AF488 and donkey anti-goat IgG-Cy5 (all obtained from Dianova, Hamburg, Germany). Membranes were washed 4 times and finally mounted in fluorescent mounting medium (DAKO). Finally, images were recorded using an AXIO Observer Z1 fluorescence microscope with an Apo-tome 2 extension (Carl Zeiss AG, Jena, Germany).

1.9. Infection kinetics

To investigate the replication of IV within epithelial and endothelial cells, we performed infection kinetics testing. For this, cells were infected with different MOIs (0.01, 0.1, 1 and 0.05, 0.5 and 5) and fixed after 1 h, 6 h, 24 h and 48 h of incubation with ice-cold methanol. Subsequently, the immunocytochemical staining of IV nucleoprotein (monoclonal antibody: Acris GmbH, Hiddenhausen, Germany) was performed according to the manufacturers protocol (DAKO, Hamburg, Germany). The detection of the virus-infected cells was carried out by microscopy (AxioCamERc 5s, Carl Zeiss Jena, Germany). The experiment was performed three times per time point.

1.10. Scanning electron microscopy (SEM)

The cell structures were fixed inside the biochip by switching the flow of the medium to the fixative solution (2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer) for 90 min. Afterwards, the flow was switched again to fresh cacodylate buffer for 30 min to wash out the fixative. Then, the populated membranes were removed carefully, cut into two halves and needle-pinned onto pieces of cork, with one of the halves flipped to offer access to both sides. Next, the samples were dehydrated in ascending ethanol concentrations (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 15 min each. The samples were critical-point dried using liquid CO₂ and sputter coated with gold (thickness approx. 2 nm) using an SCD005 sputter coater (BAL-TEC, Liechtenstein) to avoid surface charging. Finally, the specimens were investigated with a field emission SEM LEO-1530 Gemini (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany).

1.11. Image acquisition

Images were acquired on the structured-illumination system 'Apotome.2' from Zeiss (Carl Zeiss Ag, Oberkochen, Germany) built in the inverted configuration on a Zeiss Observer.Z1 microscope. Illumination was provided by an HPX 120C external unit. For the overview experiments a 10× magnification, NA0.3 immersion-free objective was used with 0.645 × 0.645 μm pixel size. The detailed images were recorded with a 20×/NA0.8 immersion-free objective lens at 0.3225 × 0.3225 μm pixel size. The Z-stack images were acquired at 2 μm Z-slice distance. The various fluorescence channels were recorded with the following filter settings: excitation centered at 353 nm, 488 nm, 548 nm and 653 nm; emission centered at 465 nm, 509 nm, 561 nm, 572 nm and 668 nm, respectively. The images were recorded with an AxioCam MRm camera with 6.45 μm pixel size at 1388 × 1040 pixels (total area 8952.6 × 6708 μm). The camera exposure time was set at 20, 50, 100, 200, 1000 or 2000 ms, according to the intensity of the labeling.

1.12. Image analysis and quantification

Images were provided for analysis as Z stacks in the Zeiss native image format 'CZI'. This data contained the Apotome images that were already processed by the ZEN software (Carl Zeiss Ag, Oberkochen, Germany) to create optical sections. During preprocessing, the Z-stack images were first deconvolved using the Huygens Professional software (SVI, Hilversum, Holland), where the spinning disk deconvolution module was utilized by setting the pinhole spacing at 4 micrometers, according to the corresponding SVI guidelines for handling Apotome image data. The deconvolved image stacks were segmented in Imaris 9.2.1 (Bitplane, Zürich, Switzerland) using either the 'Cells' module (for per-cell analysis of the endo- and epithelial cells) or the 'Surfaces' and 'Spots' modules

(for per-image analysis and to characterize individual macrophages). Here the blue (DAPI) channel was selected to segment the cell nuclei, whereas either the orange or the green channel was chosen to identify either the E-(VE-) cadherin or the ZO-1 labeling, respectively. The segmented nuclei (from the blue channel) served as seeds to assist the search for the cell membranes (from the orange or the green channel). After the cell membranes were successfully segmented, the area between the nuclei and the cell membrane were identified as the cytoplasm. For the endothelial side of the samples the Imaris 'Cells' module was restricted to segment only the nuclei (DAPI labeling in blue) and the cell membranes (VE-cadherin in orange). The quantification of the segmented images was carried out in Imaris 9.2.1. Here we measured the mean value and the standard deviation of the fluorescence intensity for all channels; the volume and the sphericity of the cells; the number of cells per Z stack. Similarly, the *S. aureus* content of the entire fields of view of the images was determined from the corresponding fluorescence channel, using the 'Spots' module of Imaris that allowed the determination of the number of *S. aureus*, in addition to their individual and summed-up fluorescence intensity.

1.13. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software version 7 and 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) or Microsoft Excel (Microsoft Office, 2010). Comparison between more than two groups was performed using a one-way or two-way ANOVA test. Where indicated, comparison between two groups was performed using a paired, two tailed Student's t-test. $P \leq 0.05$ was considered significant.

1.14. Informed consent

The study was approved by the ethics committee of the Jena University Hospital, Germany (3939-12/13). Informed consent was obtained from all individuals participating in the study who provided blood in accordance with the Declaration of Helsinki.

2. Results

2.1. Flow conditions and macrophage coculture increase barrier integrity

To establish the alveolus-on-a-chip model, we used the microfluidic MOTiF biochip with a suspended porous membrane serving as a perusable cell substrate [17] (figure 1). At the membrane facing the lower chamber, HUVECs were cultured. On the top of the membrane NCI-H441 cells and monocyte-derived macrophages were cocultured. To verify the key-findings of the NCI-H441 cultured model, we used also human primary epithelial cells (NHBE). The design of the chip resulted in a stable ALI 14 d after cultivation (supplementary figure 1). Pores in the

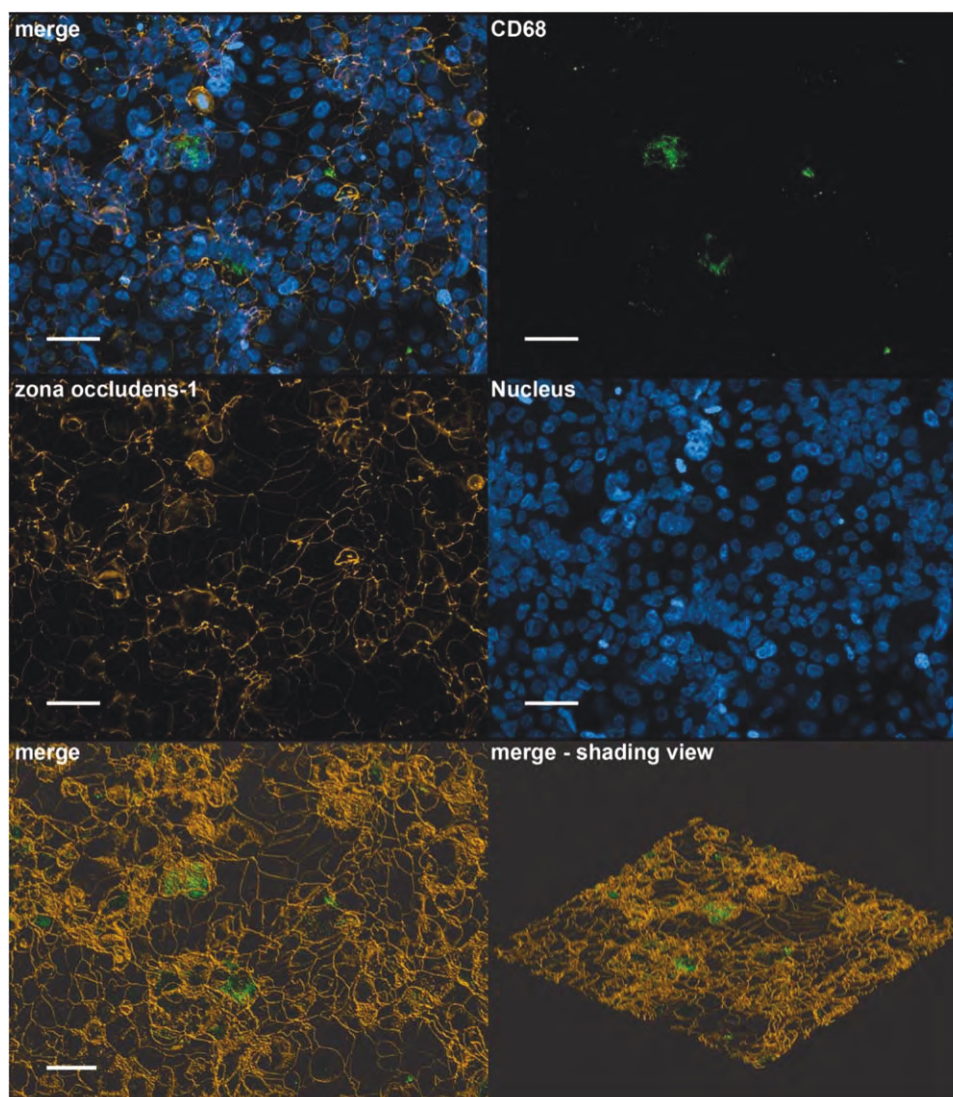


Figure 2. Marker expression of the epithelial cell layer of the human alveolus-on-a-chip model. Expression of epithelial marker zona occludens-1 (orange) and for macrophage marker CD68 (green) was confirmed by immunofluorescence staining. Nuclei were stained with 4',6-diamidin-2 phenylindol (DAPI), shown in blue. Lower panel shows images in shading projection/view. Scale bar represents 50 μm .

membrane allow molecules, cells and pathogens to translocate between the chambers and allow for an exchange of nutrients and oxygen during perfusion of the endothelial cell layer. In this context, the establishment of a selective biological barrier formed by confluent cell layers expressing proteins of the apical junctional complex is a central morphological feature of the lung. Immunofluorescence staining for epithelial and endothelial cell layers of the alveolus-on-a-chip model demonstrated the expression of zona occludens-1 (figure 2) and the alveolar epithelial type I specific marker AQP-5 (supplementary figure 2) as well as the detection of SP-A, an alveolar epithelial type II marker (figure 3, supplementary figure 2).

We are able to show, that SP-A is well distributed over a wide area. Although we are able to stain AQP-5, its expression pattern in NCI-H441 cells does not fully reflect the situation found on primary cells. As published before [18] NCI-H441 cells show excellent

properties regarding their barrier function as well its surfactant production. Although the expression of the water channel AQP-5 on the apical surface of AT1 cells is not present, this fact does not affect the barrier function determined by TEER-measurement or protein quantification based on immunofluorescence staining.

Furthermore, E-cadherin signal (figure 3) for the epithelium and expression of CD68 by macrophages (figure 2) were detected. In addition, the mRNA expression of SP-A by NCI-H441 cells was significantly higher compared to A549 epithelial cells (supplementary figure 2). A549 cells are frequently used in infection research but do not have specific advantages such as the production of surfactant, demonstrating the higher comparability of NCI-H441 cells and primary human alveolar epithelial cells.

The endothelium was stained with VE-cadherin and VWF (figure 4). Furthermore, NCI-H441 cells were shown to form microvilli under perfused culture

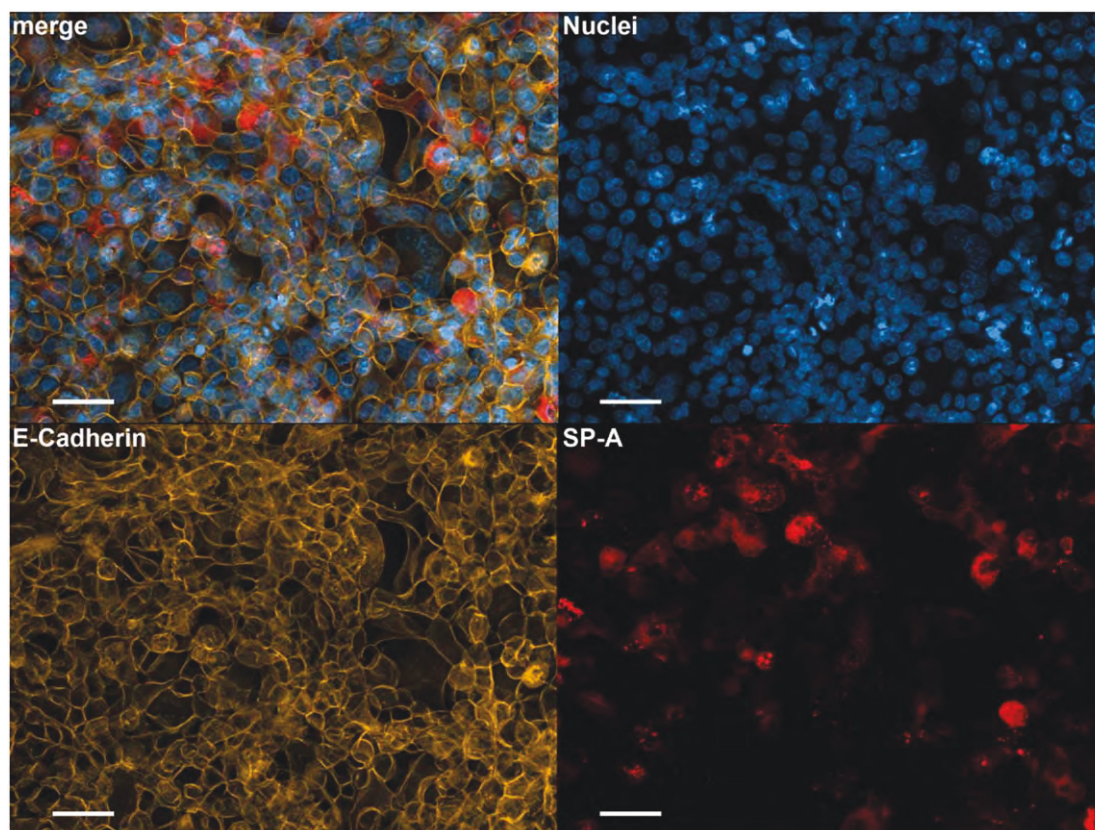


Figure 3. Marker expression of the epithelial cell layer of the human alveolus-on-a-chip model. Expression of epithelial marker E-cadherin (yellow) and surfactant protein A (SP-A) (red) was confirmed by immunofluorescence staining. Nuclei were stained with 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI), shown in blue. Scale bar represents 50 μm .

conditions (figure 5). Our results show that both perfusion and coculture with monocyte-derived macrophages improved barrier formation, which was confirmed by the reduced permeability of the cell layers for FITC-labeled dextran (figure 6(A)).

Interestingly, the perfusion further increased the tightness of the lung tissue in the presence of macrophages (supplementary figure 3). Thus, subsequent infection studies were performed only in presence of macrophages. In contrast, stimulation with LPS caused a significant reduction in barrier function as a result of a provoked proinflammatory immune response (figure 6(B)) and led to significant reduction of VE-cadherin expression (supplementary figures 4, 5).

2.2. Bacterial infections, in particular, co-infections, induce a high inflammatory response and spread to the endothelium

Based on the fact that macrophages lead to higher barrier integrity we next addressed their function in the context of infection. We established protocols to stimulate the human alveolus-on-a-chip model comprising primary macrophages with LPS as well as infection protocols with living pathogens *S. aureus* and IV. To determine the response of our model we analyzed cytokine secretion in the upper and lower

chambers of the lung model after exposure to LPS or infection with virus and/or bacteria. After 14 d of culture, LPS was exposed to the epithelial cell layer for 24 h, and media from both chambers were collected. A considerable release of pro-inflammatory interleukin (IL)-1 β , IL-6, TNF- α and anti-inflammatory IL-10 was observed (figures 7(A)–(H)) in the presence of macrophages.

Furthermore, the presence of bacteria attached to the microvilli was confirmed by SEM (figure 8). It is important to note that IV is able to infect but not to perform a complete replication cycle within macrophages [19]. Thus, infection experiments in monocultures of macrophages were not performed.

Next, we established a protocol to infect the human alveolus-on-a-chip model with integrated macrophages and live pathogens *S. aureus* and IV. For infection, we used the strain *S. aureus* (MOI 5) and IV (MOI 1), which were applied over the epithelial cell layer. We were able to show an infection by *S. aureus* through the determination of CFUs (figures 9(A), (B)) after an additional antibiotic washing step removing remaining live bacteria in the extracellular environment. In addition, the presence of intracellular *S. aureus* was validated and quantified by immunofluorescence staining (figure 9(C)). We have shown that the number of *S. aureus* particles during co-

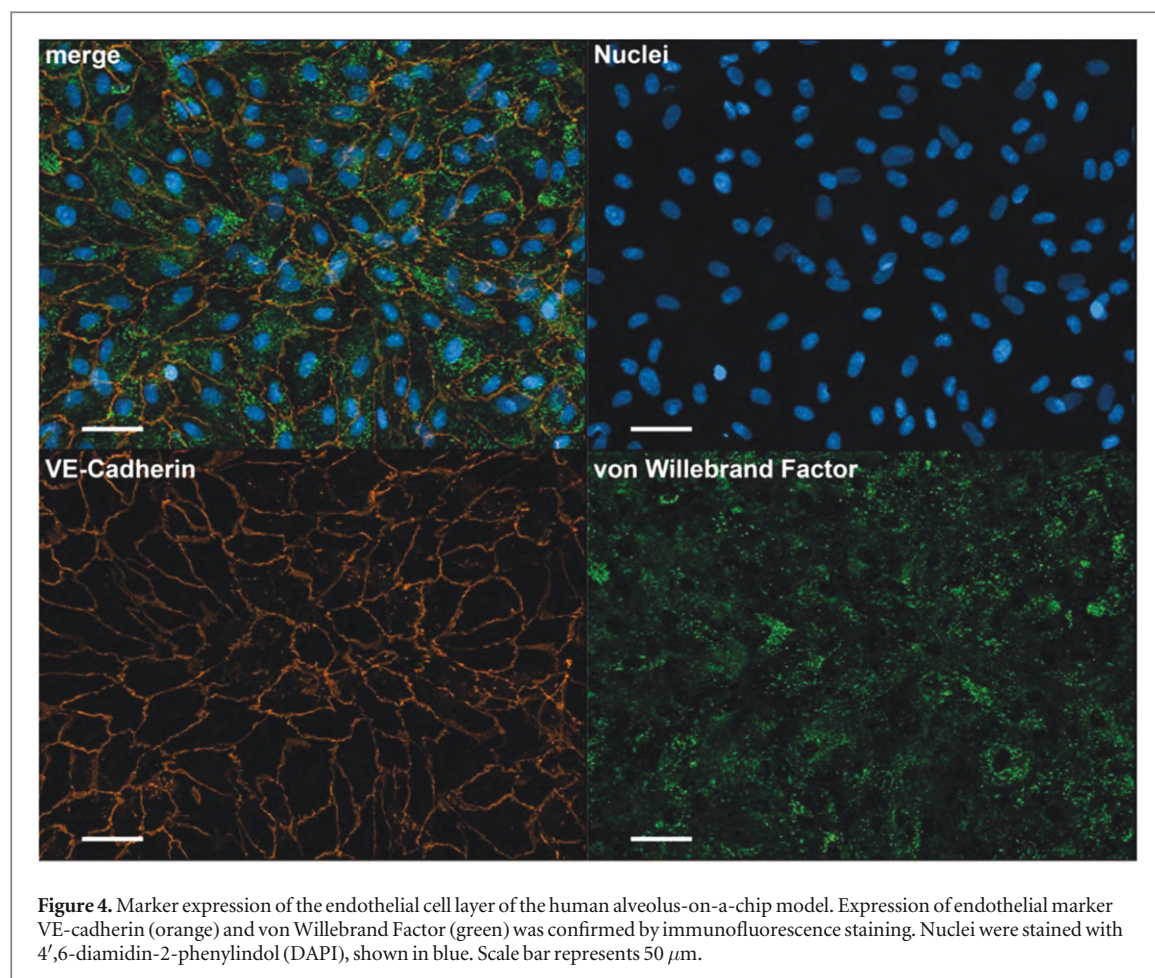


Figure 4. Marker expression of the endothelial cell layer of the human alveolus-on-a-chip model. Expression of endothelial marker VE-cadherin (orange) and von Willebrand Factor (green) was confirmed by immunofluorescence staining. Nuclei were stained with 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI), shown in blue. Scale bar represents 50 μm .

infection was significantly higher compared to the single infection without IV.

The human alveolus-on-a-chip model was tested for its ability of productive viral replication. Based on the detection of viral RNA we were able to confirm infection of the assembled human alveolus-on-a-chip model 3 h and 6.5 h after incubation with a MOI 1 (supplementary figure 6). To investigate the individual ability of the virus to replicate within the epithelial and endothelial cells used in our model we validated the replication of a single cell culture based on the immunofluorescence staining of the viral nucleoprotein (supplementary figure 7).

The inflammatory response of the epithelial and endothelial cell layer differs significantly between single and co-infection (figures 10(A)–(H)). To determine the pro- versus anti-inflammatory responses, we tested for various cytokines and chemokines. Interestingly, co-infection results in higher amounts of IL-1 β , IL-6, MCP-1 (CCL-1, monocyte chemotactic protein 1) and interferon (IFN)- γ than single bacterial and viral infections. In general, viral infection resulted in a lower inflammatory response, whereas bacterial infection and particularly co-infection induced higher cytokine expression. To determine the effect of intracellular pathogens, we measured the production of IFN- γ within the endothelial and epithelial supernatants. Here, the co-infection of the epithelial layer

shows significantly higher IFN γ release compared to the single virus infection.

2.3. Co-infection leads to disruption of the endothelial barrier but does not damage the integrity of the epithelium

The infection of the epithelial layer in the single or co-infection scenarios does not result in significant differences concerning the integrity of the epithelial layer (figures 11(A), 12(A)). This result was also proven for human primary epithelial cells (NHBE) (supplementary figure 8). Further, also a quantitative analysis of adherence and tight-junction proteins E-cadherin (figure 11(B)) and ZO-1 (figure 12(B), supplementary figure 8) showed no significant alteration of protein expression upon infection.

In contrast, significant alterations in the expression of adherence junctional complex proteins within the endothelial layer were observed. We demonstrated that the expression and localization of VE-cadherin was not affected by a single viral or bacterial infection. However, co-infection with both agents results in a significant reduction of VE expression levels of HUVEC cells cultured within the alveolus-on-a-chip-model (figures 13(A)–(C)). Likewise, SEM shown the damage of the endothelium caused by the co-infection (supplementary figure 9).

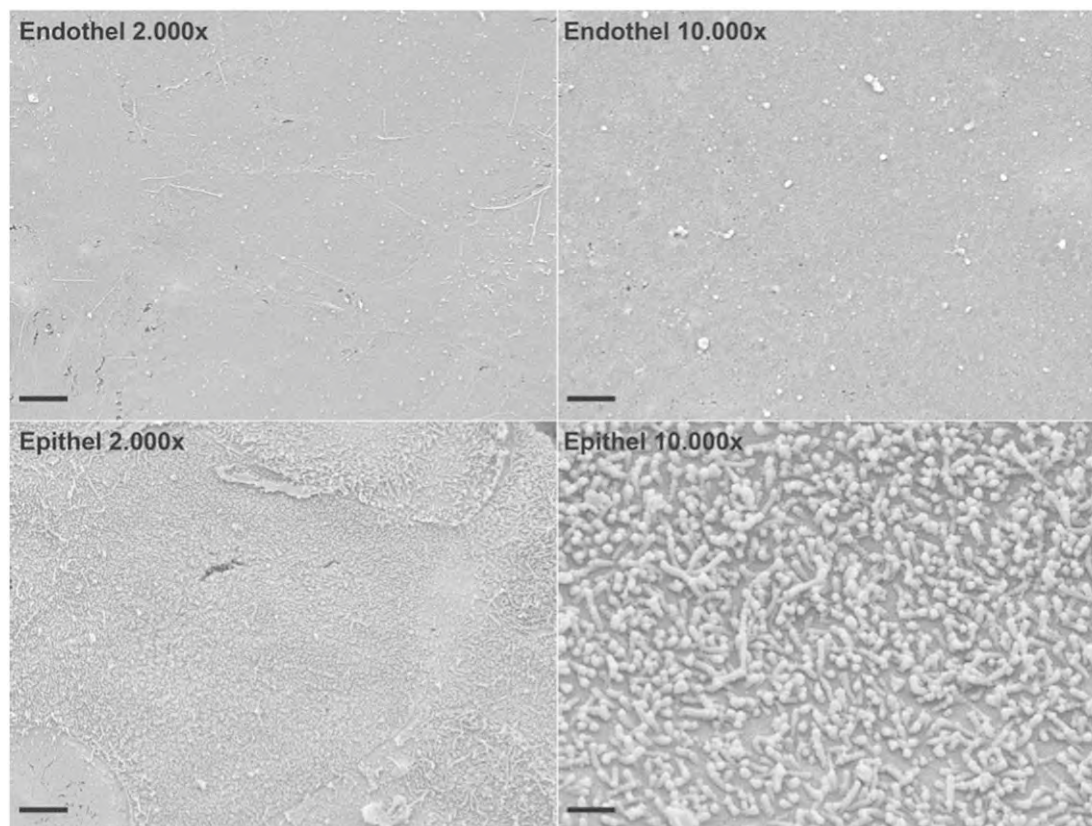


Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) image of the endothelial and the epithelial layer with microvilli. Scale represents $5\ \mu\text{m}$ ($2.000\times$ magnification) and $1\ \mu\text{m}$ ($10.000\times$ magnification).

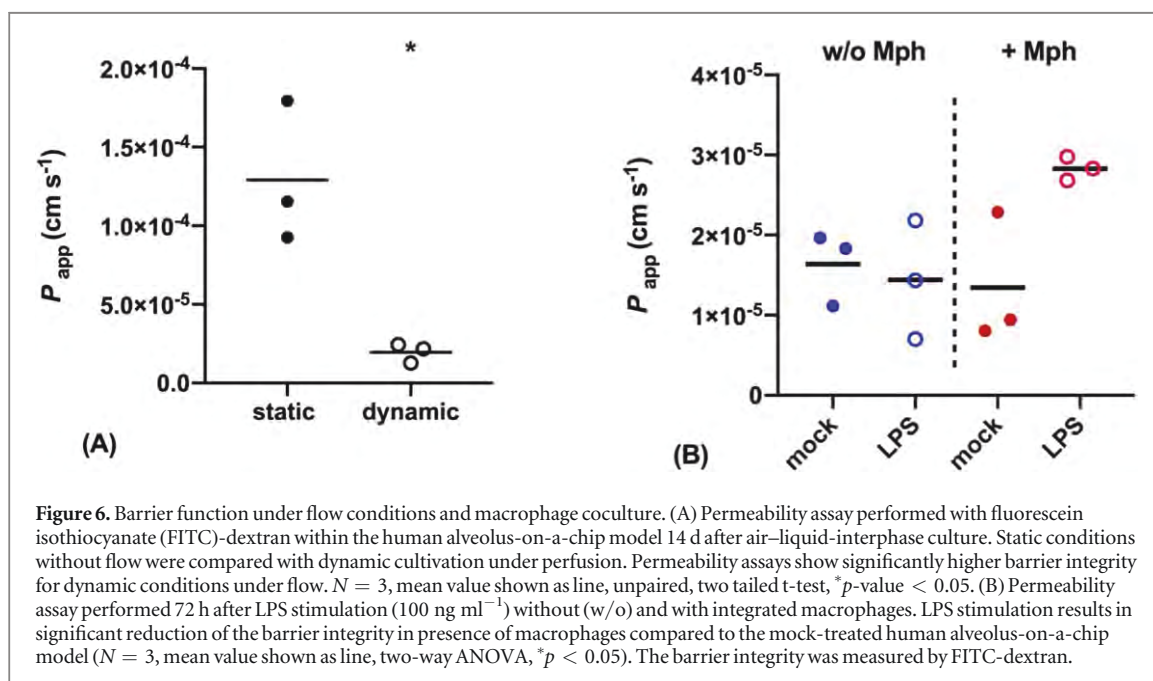
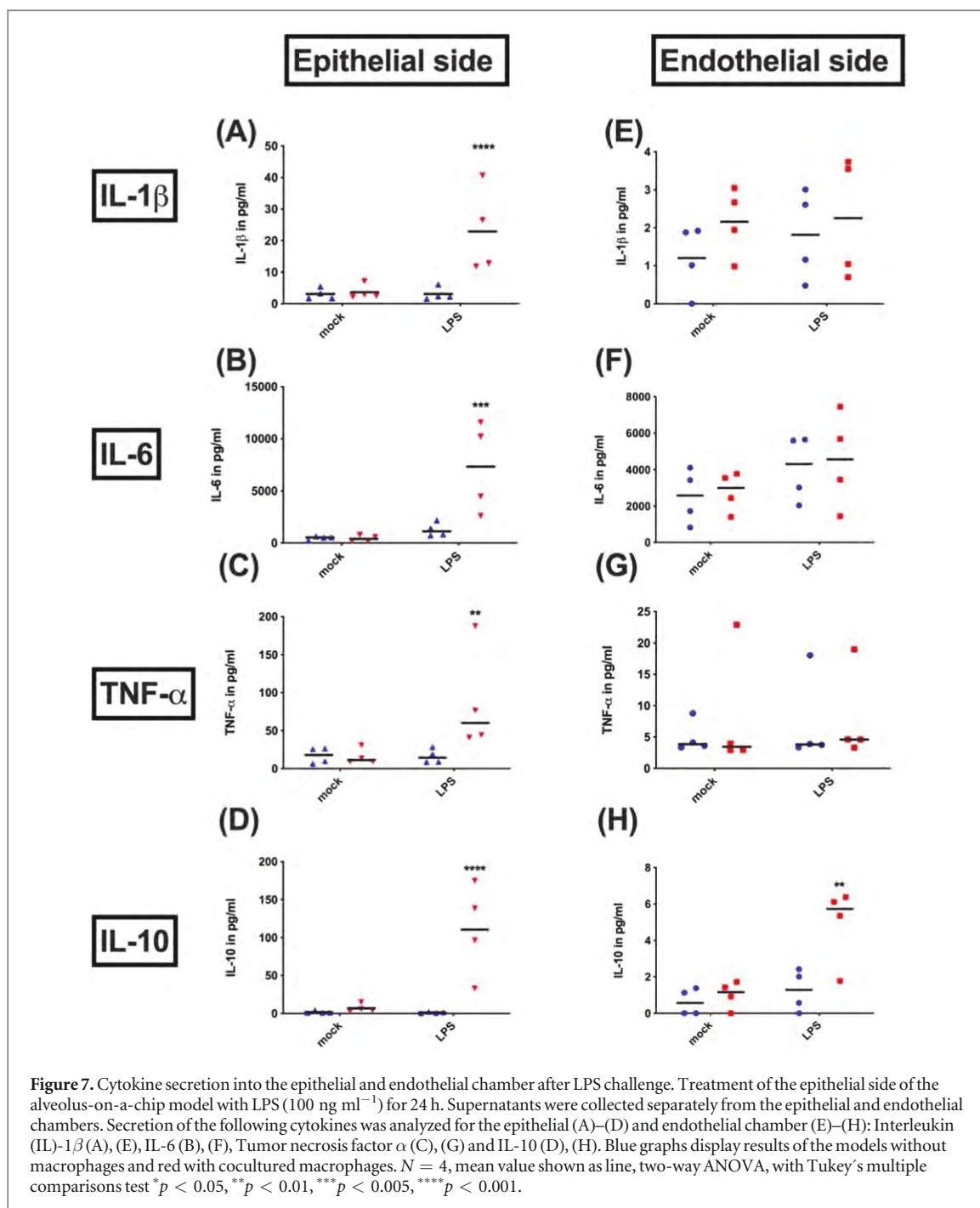


Figure 6. Barrier function under flow conditions and macrophage coculture. (A) Permeability assay performed with fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran within the human alveolus-on-a-chip model 14 d after air-liquid-interphase culture. Static conditions without flow were compared with dynamic cultivation under perfusion. Permeability assays show significantly higher barrier integrity for dynamic conditions under flow. $N = 3$, mean value shown as line, unpaired, two tailed t-test, $*p$ -value < 0.05 . (B) Permeability assay performed 72 h after LPS stimulation ($100\ \text{ng ml}^{-1}$) without (w/o) and with integrated macrophages. LPS stimulation results in significant reduction of the barrier integrity in presence of macrophages compared to the mock-treated human alveolus-on-a-chip model ($N = 3$, mean value shown as line, two-way ANOVA, $*p < 0.05$). The barrier integrity was measured by FITC-dextran.

2.4. Break down of the barrier function during co-infection

To analyze the integrity of the whole biochip system, we performed permeability assays using FITC-dextran to verify the integrity of the endothelial and epithelial

cell layers by detecting fluorescence. We were able to show that co-infection significantly reduced the barrier function compared to the mock-treated chamber (figure 14). Furthermore, bacteria were found to translocate from infected epithelial cells into the

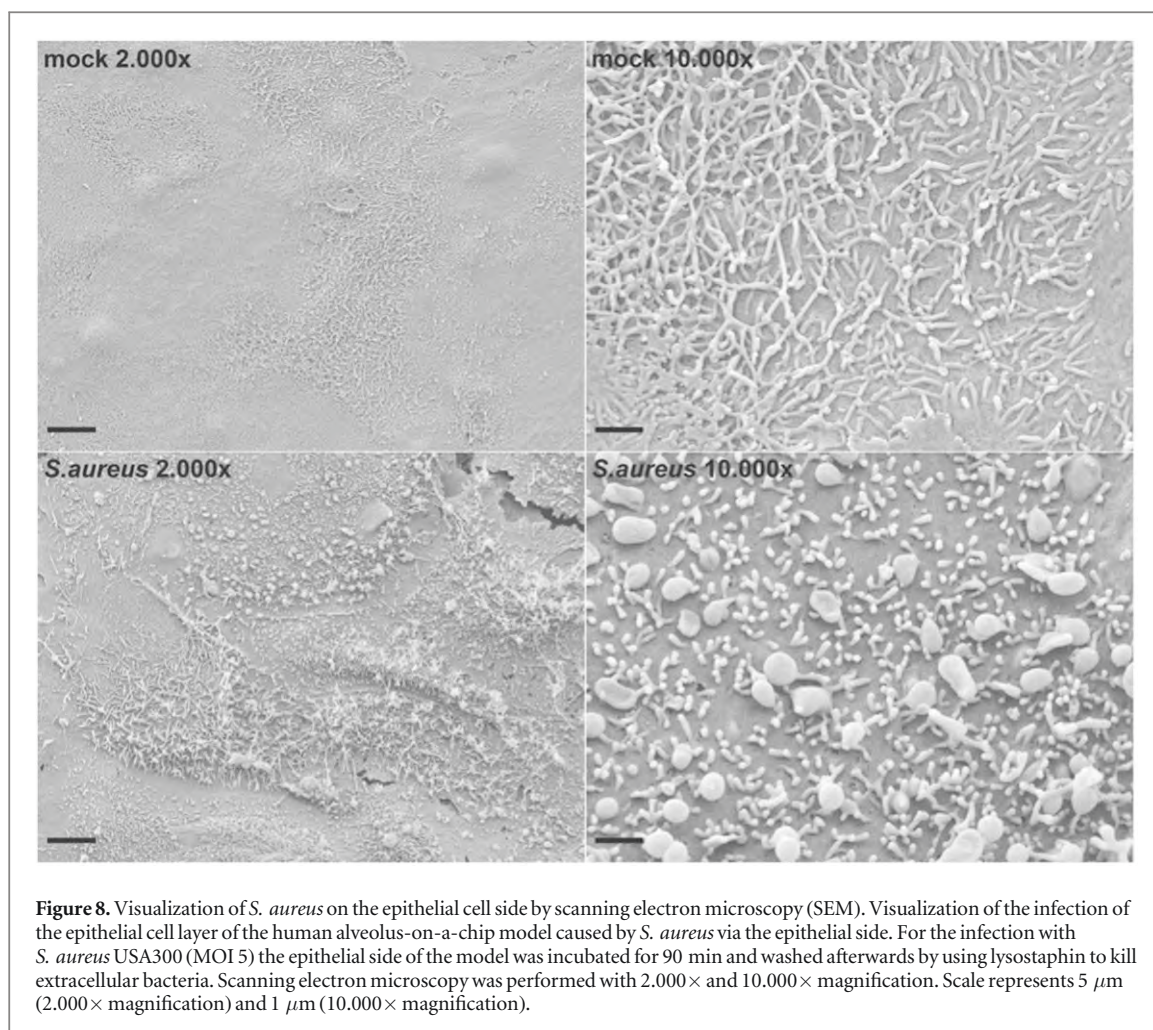


endothelial cell layer (figures 9(A), (B)). An additional washing step with lysostaphin after bacterial infection indicated that intracellular bacteria leave their host cells during the infection process. The number of *S. aureus* particles within the co-infection scenario could be shown as higher than for the single infection (figure 9(C)). Extracellular bacteria were detected 6.5 h p.i within the endothelial chamber after infection of the epithelial cell layer (figures 9(A), (B)). In addition, the loss of integrity of the endothelium is determined by immunofluorescence staining of VE-cadherin (supplementary clip 1). These findings could be confirmed with human primary epithelial cells (NHBE) on the top of the chip-model (supplementary figure 10).

3. Discussion

In this study, we established a human alveolus-on-a-chip model to study cellular alterations associated with bacterial and viral infections of the lung [20]. Epithelial cells are able to produce cytokines and chemokines that influence the endothelial barrier.

The expression and localization of functional cell type- and barrier-specific markers of our model is similar to human lung tissue [21]. The alveolar surface is composed of type I and type II alveolar epithelial cells. Around 95% of the surface is covered with type I cells. Type II alveolar cells are characterized by the production of pulmonary surfactant and apical microvilli [22]. Our results clearly demonstrate that

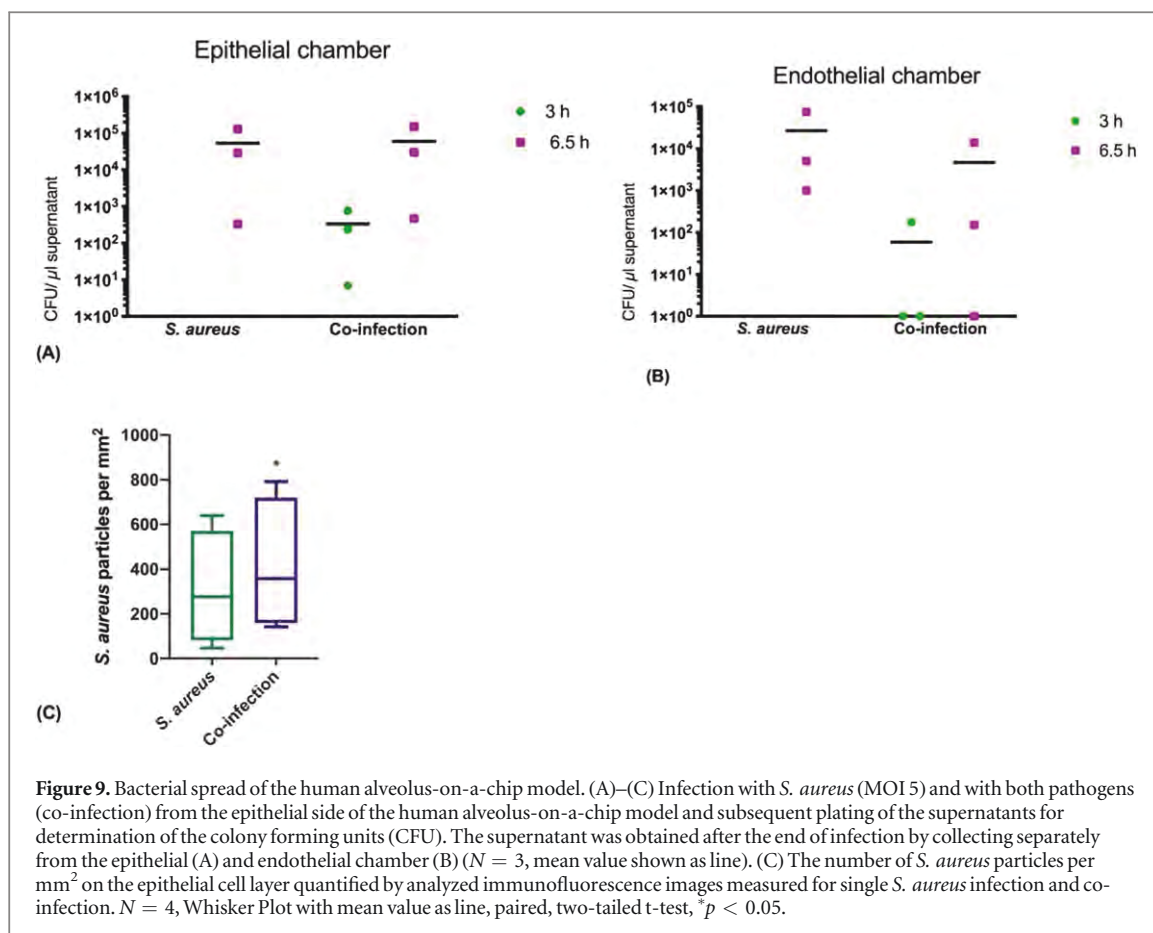


NCI-H441 cells are able to produce the alveolar epithelial type I specific marker AQP-5 [23] as well as SP-A, an alveolar epithelial type II marker.

NCI-H441 cells used in our model are immune responsive and secrete a variety of cytokines and chemokines involved in the activation of immune cells [24]. Furthermore, type II alveolar cells contribute to lung defense by producing surfactant proteins. Our findings show that the human alveolus-on-a-chip is able to secrete pulmonary surfactant that is necessary for the maintenance of the barrier function, as well as of the host defense against microbial infections [25]. To verify the major findings of our model with human primary epithelial cells, we perform co-infection with NHBE cells at the top of the membrane. Our results clearly demonstrate that primary epithelial cells form a stable barrier equally to NCI-H441 cells (supplementary figure 8). Furthermore, we are able to detect a loss of barrier integrity caused by viral-bacterial co-infection (supplementary figure 10). This finding leads us to conclude that NCI-H441 cells represent a low cost and easy to use cell line and in addition a suitable tool to gain detailed insight into the molecular mechanisms of viral and bacterial infection.

Macrophages play a crucial role in host defense against infection in the lung [26]. The presence of

macrophages in an *in vitro* infection model of the lung therefore represents an important feature. We thus aimed to further characterize their contribution to the cytokine production during lung inflammation [27]. We emulated the function of alveolar macrophages by tissue integration of monocyte-derived macrophages. Alveolar macrophages originate from fetal monocytes during embryogenesis and thus differ from macrophages replenished by monocytes upon lung injury in their epigenetic landscape [28, 29]. However, several studies show that the lung microenvironment supplies various cues supporting a functional phenotype in monocyte-derived macrophages that is comparable to alveolar macrophages [30]. Furthermore, recently published data indicate that the self-renewal of macrophages is supplemented by a contribution from blood monocytes [31]. Thus, the monocyte-derived macrophages used in this study represent suitable surrogates to model alveolar macrophage function in the alveolus infection model [32]. Our results clearly indicate that macrophages are essential for the maintenance of barrier integrity in our model. This first relevant aspect of our study demonstrates that dynamic culture conditions improve the barrier function compared to static conditions. In this context, an improved expression of junction complex proteins upon exposure to shear

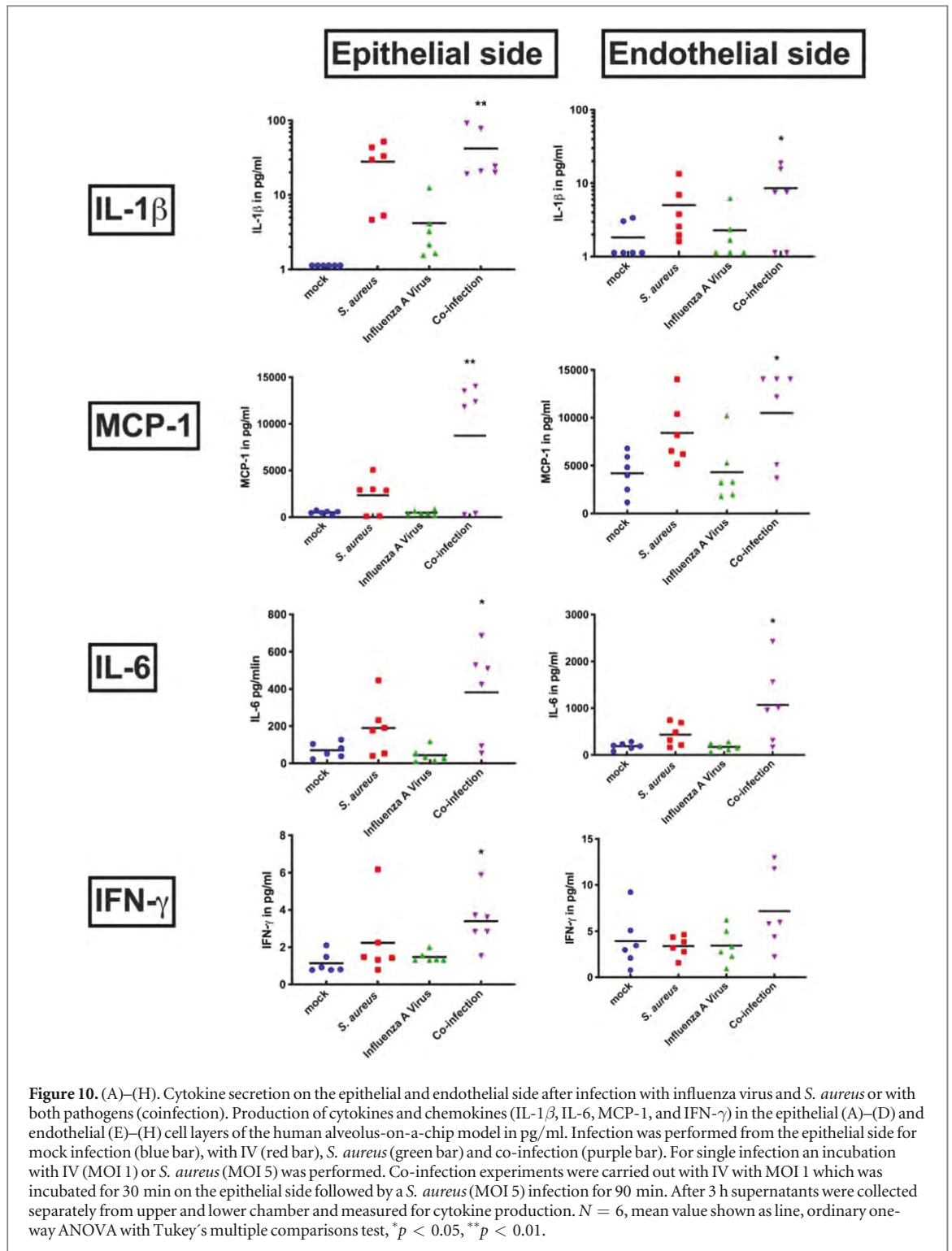


stress has been described [33]. Our findings further demonstrate the key role of macrophages in maintaining the barrier integrity of the alveolus model. The presence of several cell types within the human alveolus results in a solid barrier function [8]. In comparison to this, we are able to show that the TEER-measurement as well as the permeability assays of our *in vitro* model demonstrates a high barrier formation of the human-alveolus-on-a-chip after 14 d of cultivation suggesting a comparable barrier function to the human alveolus.

However, there is still a notable controversy in the literature regarding the role of alveolar macrophages during microbial infections. On the one hand, it is well known that alveolar macrophages comprise the largest population of resident cells in the respiratory tract [34] and that impairment of their function is one of the main risk factors for invasive mycoses [35]. On the other hand, based on experiments with mice, Mircescu *et al* claimed that neutrophils rather than alveolar macrophages play the essential role in the immune response against fungal pathogens [36]. A game-theoretical model revealed that these seemingly contradictory viewpoints can be reconciled by accounting for the impact of the infection-dose on the time course of the infection-inflammation scenario [37]. However, due to the lack of live cell imaging data for infection scenarios in the lung, it remains unclear

what distinguishes between low and high infection doses. The human alveolus-on-a-chip model established in our work represents the most realistic infection model today that allows for tracking cell migration and cell-cell interactions in space and time by live cell imaging [38–40]. Thus, going beyond current state-of-the-art analysis that is often based on endpoint experiments on host-pathogen confrontation assays in a petri dish [41–44], the alveolus model will have an essential bridging function in systems biology approaches by providing quantitative information on as of yet unknown parameter values for virtual models of lung infection [45–47].

The responsiveness of the immunocompetent alveolus model to pathogen-associated molecular patterns was confirmed in a model of endotoxemia by exposure of epithelial cells to LPS. In the model, LPS triggered the release of cytokines that was associated with a reduction in the barrier integrity. Importantly, this effect was observed only in the presence of functional macrophages. The inflammatory response of the immunocompetent alveolus consists of a variety of mechanisms leading to the production of diverse cytokines and chemokines. By using the human alveolus-on-a-chip-model, we were able to analyze the expression of these molecules separately within the upper and lower chambers, indicating air- and blood-side. We have shown that the release of cytokines is mainly

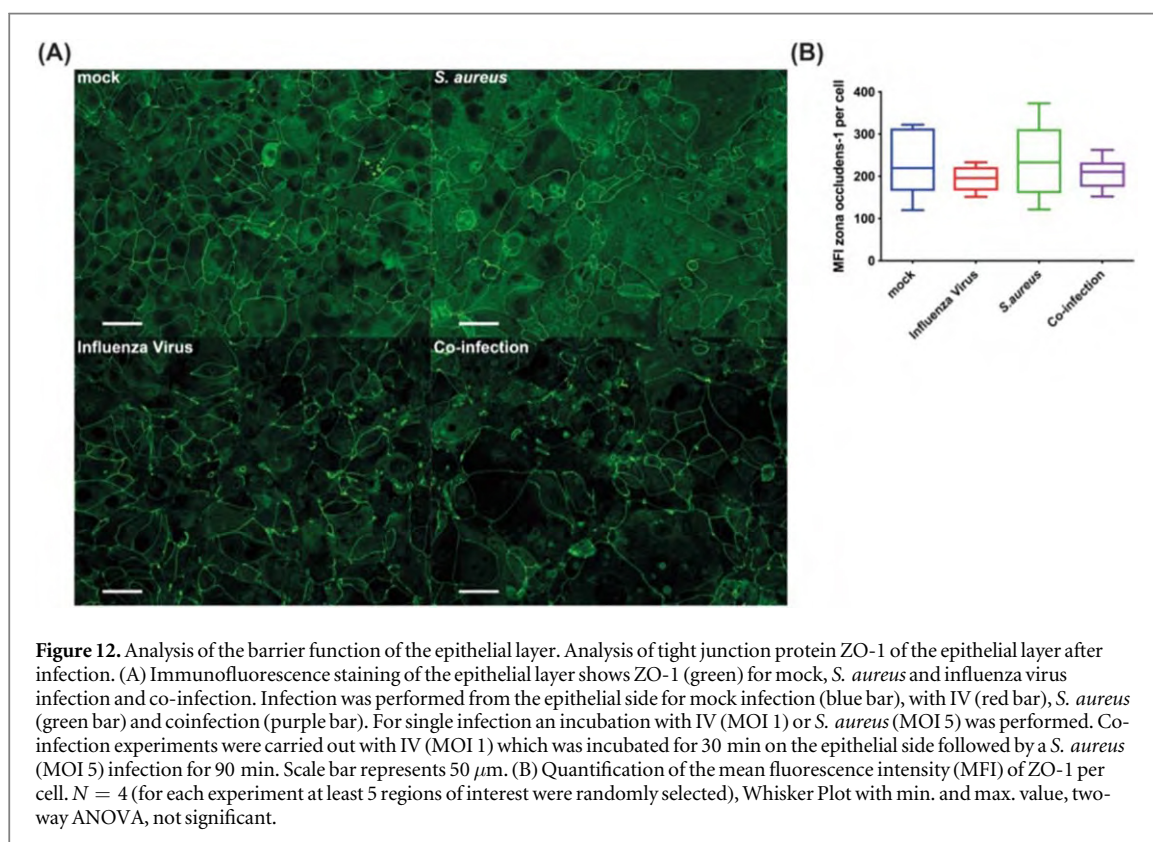
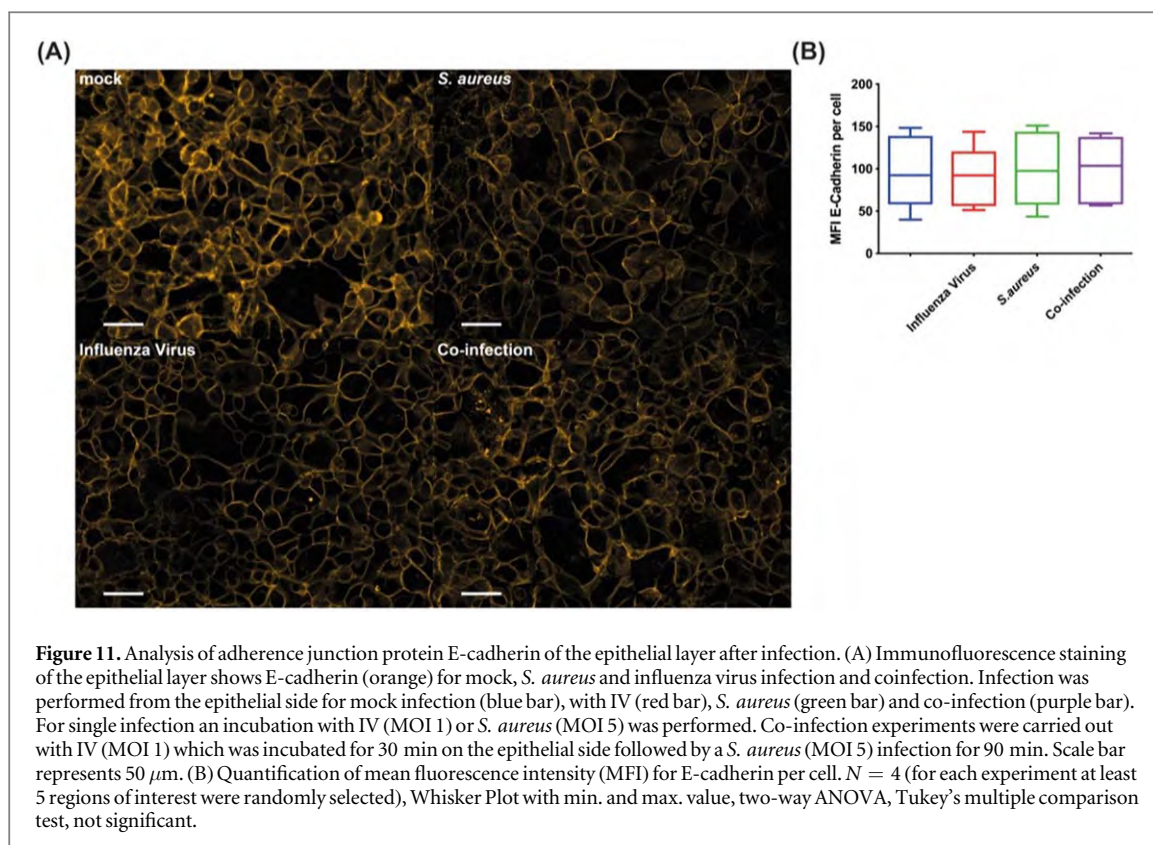


dependent on macrophages. Consequently, integrated immune cells induce a significant stimulation of resident cells. Obviously, epithelial and endothelial cells are able to generate pro- and anti-inflammatory responses.

The human alveolus-on-a-chip model was validated for its ability to enable bacterial and viral replication. Based on the detection of viral RNA we were able to confirm viral infection. However, we were interested in the immune response during early infection phase up to 6.5 h p.i., where an increase of infectious

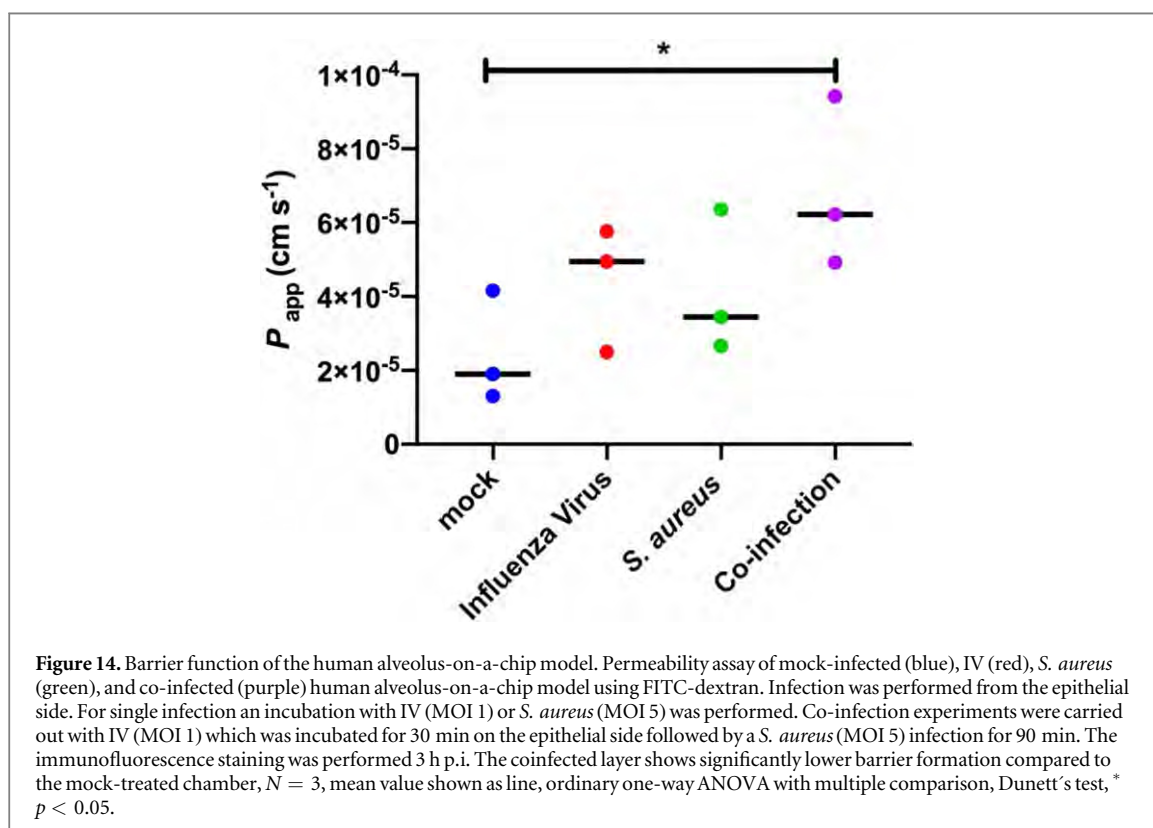
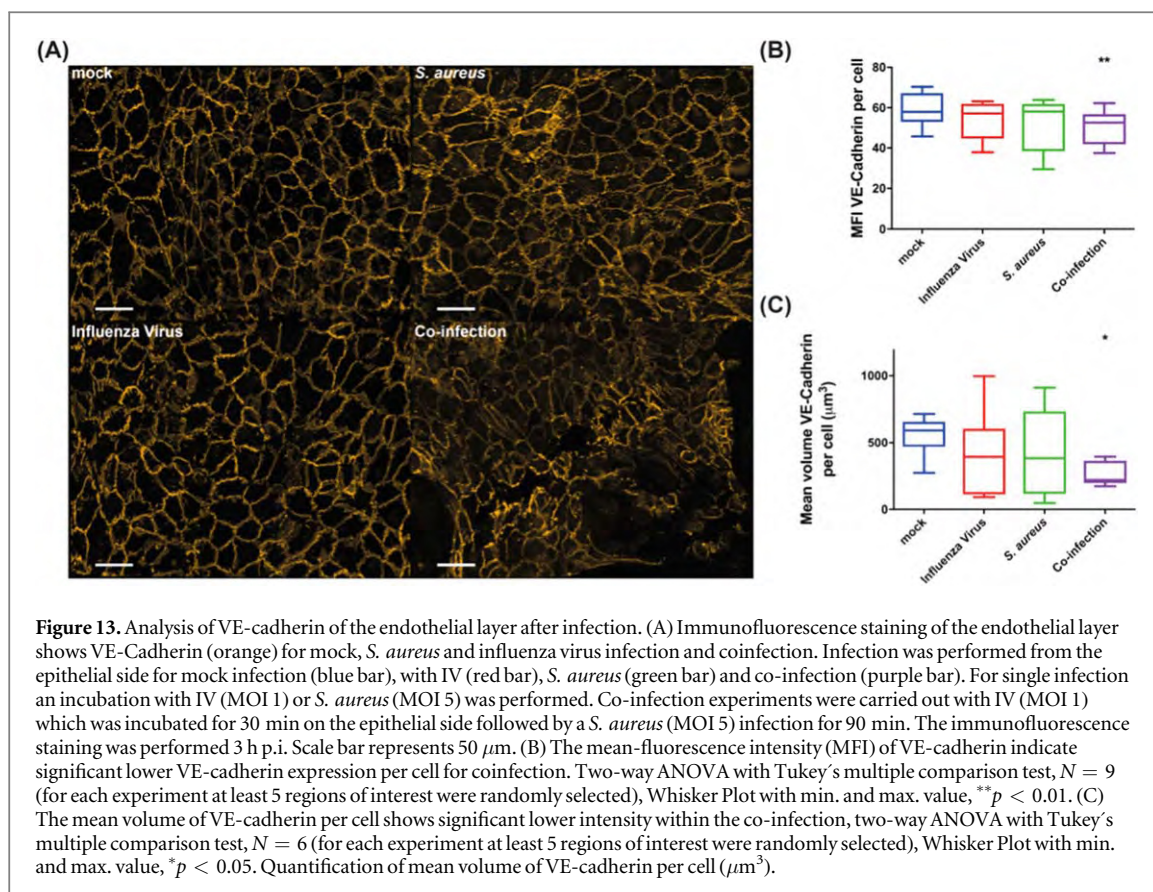
virus particles is not detectable because the complete IV replication and production of matured and fully infectious virus particles requires 6–8 h [48].

Endothelial dysfunction results in vascular leakage, which is considered the main driver of acute lung injury [49]. Our data suggest that a single infection of the epithelium does not affect the integrity of the endothelium within one replication cycle of IV. However, a viral/bacterial co-infection resulted in significantly impaired endothelial barrier integrity, suggesting that infection with IV most likely predisposes the lung endothelium to



leak after superinfection with *S. aureus*. Diffuse alveolar damage and massive infiltration of macrophages lead to inflammation and subsequent damage of the alveoli, which is largely dependent on the cell interaction and cannot be reproduced in single cell cultures. Our

findings indicate that analyzing infection processes within the lung requires the interaction of different cell types. Epithelial cells within the alveolus are important for the first step of infection. In a second step, endothelial cells become also infected via epithelial cells. The



combined cell activation results in a robust inflammatory response of immune cells, which also contributes to lung damage. A bacterial co-infection with bacteria and viruses induced the highest immune response regarding

cytokine expression and barrier function loss compared to the single infections. This can explain the severe clinical outcome observed in patients with superinfection and secondary pneumonia.

By using the human-specific alveolus-on-a-chip system, the investigation of bacterial toxins, e.g. staphylococcal pore-forming toxins, is feasible. For this, the analysis of Panton-Valentine leukocidin (PVL) [50] as a human-specific toxin is possible, and our model is an excellent complement to the next generation of humanized mouse models [51]. For viral-bacterial co-infections neutrophil granulocytes play a crucial role, mainly due to the fact that bacterial toxins like PVL target these immune cells and thereby lead to severe necrotizing pneumonia plays a key part for the infection. PVL acts in a highly human specific manner in targeting human neutrophil granulocytes [52]. These results should be addressed in follow up by integration of circulating neutrophil granulocytes into the alveolus model.

Our findings indicate that complex cell systems are suitable for the human-specific effects of pathogens. Future work will assess the potential of the human alveolus-on-a-chip model with respect to the investigation of pathogenesis and testing of various therapeutic compounds to treat lung infections.

Acknowledgments

We thank the team at the Placenta Laboratory of the Jena University Hospital for supplying umbilical cords for HUVEC isolation and the excellent technical work of Elke Teuscher regarding the preparation. Furthermore, we thank Tobias Voigt for the excellent cell cultivation and laboratory assistance.

Conflict of interest

KR is CEO of Dynamic42 GmbH. KR and ASM are both shareholders of Dynamic42. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Funding

The authors further acknowledge the support of this work by a grant from the German Federal Institute for Risk Assessment (Grant No. FKZ 1328-545). This study was supported by the Center for Sepsis Control and Care (Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ 01EO1502), InfectoGnostics Forschungscampus Jena (Grant No 13GW0096D, ‘Innovative Diagnostik für Pneumonien bei Immunsuppression’) the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO 1618/6-1), the Interdisciplinary Center of Clinical Research (IZKF) Jena University Hospital (ACSP02) and by internal funding from the Jena University Hospital. We also thank the Collaborative Research

Center PolyTarget 1278 ‘Polymer-based nanoparticle libraries for targeted anti-inflammatory strategies’, Project Z01. This work was supported by the Leibniz ScienceCampus InfectoOptics Jena, which is financed by the funding line Strategic Networking of the Leibniz Association. Additionally, this work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through the Cluster of Excellence ‘Balance of the Microverse’ under Germany’s Excellence Strategy—EXC 2051—Project-ID 390713860 to BL and ASM and by the European Commission through Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) Innovative Training Network EUROoC (Grant No. 812954) to ASM.

Contribution of authors

SDE, KR, and CE conceived and designed the experiments. Preparation of HUVECs was performed by the RH and ASM groups. SEM was performed by SN. SC, ZC, and MTF evaluated the light microscopy data and performed image analysis. MS maintained cell cultures. SDE, KR, ES, MW, KFH, and FS performed the infection experiments. SDE and KR and CE analyzed the data. SDE and BL wrote the manuscript. ASM provided tools for the establishment of the alveolus-on-a-chip model. All authors critically read and commented the manuscript.

ORCID iDs

Stefanie Deinhardt-Emmer  <https://orcid.org/0000-0003-4495-4052>

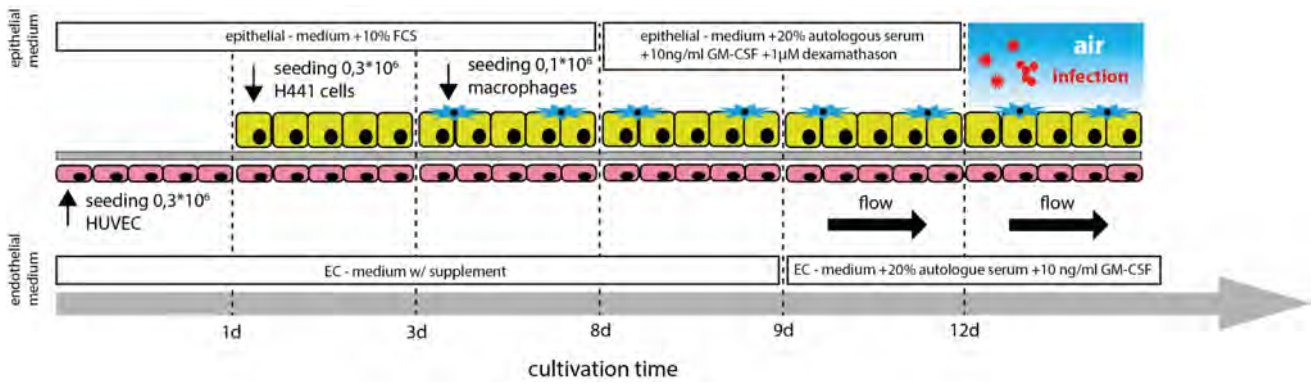
Alexander S Mosig  <https://orcid.org/0000-0002-5687-2444>

References

- [1] Azoulay E *et al* 2019 Acute respiratory failure in immunocompromised adults *Lancet Respiratory Med.* **7** 173–86
- [2] Deinhardt-Emmer S *et al* 2018 Virulence patterns of *Staphylococcus aureus* strains from nasopharyngeal colonization *J. Hosp. Infect.* **100** 309–15
- [3] Lloyd C M and Marsland B J 2017 Lung homeostasis: influence of age, microbes, and the immune system *Immunity* **46** 549–61
- [4] Masopust D, Sivula C P and Jameson S C 2017 Of mice, dirty mice, and men: using mice to understand human immunology *J. Immunol.* **199** 383–8
- [5] Mestas J and Hughes C C W 2004 Of mice and not men: differences between mouse and human immunology *J. Immunol.* **172** 2731–8
- [6] Henneke P and Golenbock D T 2004 Phagocytosis, innate immunity, and host-pathogen specificity *J. Exp. Med.* **199** 1–4
- [7] Oliveira D, Borges A and Simões M 2018 *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases *Toxins* **10** 252
- [8] Wang L *et al* 2013 Human alveolar epithelial cells attenuate pulmonary microvascular endothelial cell permeability under septic conditions *PLoS One* **8** e55311
- [9] Dohle E *et al* 2018 Human Co- and triple-culture model of the alveolar-capillary barrier on a basement membrane mimic *Tissue Eng. C* **24** 495–503

- [10] Schildberger A *et al* 2013 Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide *Mediators Inflamm.* **2013** 697972
- [11] Raasch M *et al* 2015 Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions *Biofabrication* **7** 015013
- [12] Rennert K *et al* 2016 Recruitment of CD16(+) monocytes to endothelial cells in response to LPS-treatment and concomitant TNF release is regulated by CX3CR1 and interfered by soluble fractalkine *Cytokine* **83** 41–52
- [13] Warnking K *et al* 2015 Super-infection with *Staphylococcus aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signalling through impaired STAT1-STAT2 dimerization *Cell Microbiol.* **17** 303–17
- [14] Mosig S *et al* 2009 Different functions of monocyte subsets in familial hypercholesterolemia: potential function of CD14 + CD16 + monocytes in detoxification of oxidized LDL *FASEB J.* **23** 866–74
- [15] Au-Lehmann J S *et al* 2017 Multiplex cytokine profiling of stimulated mouse splenocytes using a cytometric bead-based immunoassay platform *JoVE* **129** e56440
- [16] Hubatsch I, Ragnarsson E G E and Artursson P 2007 Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers *Nat. Protocols* **2** 2111–9
- [17] Raasch M *et al* 2016 An integrative microfluidically supported *in vitro* model of an endothelial barrier combined with cortical spheroids simulates effects of neuroinflammation in neocortex development *Biomicrofluidics* **10** 044102
- [18] Ren H, Birch N P and Suresh V 2016 An optimised human cell culture model for alveolar epithelial transport *PLoS One* **11** e0165225
- [19] Cline T D, Beck D and Bianchini E 2017 Influenza virus replication in macrophages: balancing protection and pathogenesis *J. Gen. Virol.* **98** 2401–12
- [20] Huh D *et al* 2010 Reconstituting organ-level lung functions on a chip *Science* **328** 1662–8
- [21] Herzog E L *et al* 2008 Knowns and unknowns of the alveolus *Proc. Am. Thoracic Soc.* **5** 778–82
- [22] Wang J *et al* 2007 Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype *in vitro* *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36** 661–8
- [23] Flodby P *et al* 2017 Cell-specific expression of aquaporin-5 (Aqp5) in alveolar epithelium is directed by GATA6/Sp1 via histone acetylation *Sci. Rep.* **7** 3473
- [24] Chuquimia O D *et al* 2013 Alveolar epithelial cells are critical in protection of the respiratory tract by secretion of factors able to modulate the activity of pulmonary macrophages and directly control bacterial growth *Infect Immun.* **81** 381–9
- [25] Glasser J R and Mallampalli R K 2012 Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection *Microbes Infection* **14** 17–25
- [26] Cheung D O, Halsey K and Speert D P 2000 Role of pulmonary alveolar macrophages in defense of the lung against *Pseudomonas aeruginosa* *Infection Immunity* **68** 4585–92
- [27] Moldoveanu B *et al* 2009 Inflammatory mechanisms in the lung *J. Inflammation Res.* **2** 1–11
- [28] Lavin Y *et al* 2014 Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment *Cell* **159** 1312–26
- [29] Gautier E L *et al* 2012 Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages *Nat. Immunol.* **13** 1118–28
- [30] Morales-Nebreda L *et al* 2015 The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease *Eur. Respiratory Rev.* **24** 505–9
- [31] Roszer T 2018 Understanding the biology of self-renewing macrophages *Cells* **7** 103
- [32] Allard B, Panariti A and Martin J G 2018 Alveolar macrophages in the resolution of inflammation, tissue repair, and tolerance to infection *Frontiers Immunol.* **9** 1777
- [33] Tarbell J M 2010 Shear stress and the endothelial transport barrier *Cardiovascular Res.* **87** 320–30
- [34] Philippe B *et al* 2003 Killing of *aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates *Infection Immunity* **71** 3034–42
- [35] Roilides E, Katsifa H and Walsh T J 1998 Pulmonary host defences against *aspergillus fumigatus* *Res. Immunol.* **149** 454–65
- [36] Mircescu M M *et al* 2009 Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection *J. Infect Dis.* **200** 647–56
- [37] Pollmacher J *et al* 2016 Deciphering the counterplay of *aspergillus fumigatus* infection and host inflammation by evolutionary games on graphs *Sci. Rep.* **6** 27807
- [38] Brandes S *et al* 2017 Migration and interaction tracking for quantitative analysis of phagocyte-pathogen confrontation assays *Med. Image Anal.* **36** 172–83
- [39] Al-Zaben N *et al* 2019 Automated tracking of label-free cells with enhanced recognition of whole tracks *Sci. Rep.* **9** 3317
- [40] Brandes S *et al* 2015 Automated segmentation and tracking of non-rigid objects in time-lapse microscopy videos of polymorphonuclear neutrophils *Med. Image Anal.* **20** 34–51
- [41] Cseresnyes Z, Kraibooj K and Figge M T 2018 Hessian-based quantitative image analysis of host-pathogen confrontation assays *Cytometry A* **93** 346–56
- [42] Kraibooj K *et al* 2015 Automated quantification of the phagocytosis of *aspergillus fumigatus* conidia by a novel image analysis algorithm *Frontiers Microbiol.* **6** 549
- [43] Kraibooj K *et al* 2014 Virulent strain of *Lichtheimia corymbifera* shows increased phagocytosis by macrophages as revealed by automated microscopy image analysis *Mycoses* **57** 56–66
- [44] Mech F *et al* 2011 Automated image analysis of the host-pathogen interaction between phagocytes and *Aspergillus fumigatus* *PLoS One* **6** e19591
- [45] Blickensdorf M, Timme S and Figge M T 2019 Comparative assessment of aspergillosis by virtual infection modeling in murine and human lung *Frontiers Immunol.* **10** 142
- [46] Pollmächer J and Figge M T 2015 Deciphering chemokine properties by a hybrid agent-based model of *Aspergillus fumigatus* infection in human alveoli *Frontiers Microbiol.* **6** 503
- [47] Pollmacher J and Figge M T 2014 Agent-based model of human alveoli predicts chemotactic signaling by epithelial cells during early *Aspergillus fumigatus* infection *PLoS One* **9** e111630
- [48] Dou D *et al* 2018 Influenza a virus cell entry, replication, virion assembly and movement *Frontiers Immunol.* **9** 1581
- [49] Huertas A *et al* 2018 Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases: highlights from basic research to therapy *Eur. Respir J.* **51** 1700745
- [50] Tromp A T *et al* 2018 Human CD45 is an F-component-specific receptor for the staphylococcal toxin Panton-Valentine leukocidin *Nat. Microbiol.* **3** 708–17
- [51] Parker D 2017 Humanized mouse models of *staphylococcus aureus* infection *Frontiers Immunol.* **8** 512
- [52] Löffler B *et al* 2010 *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils *PLoS Pathog.* **6** e1000715

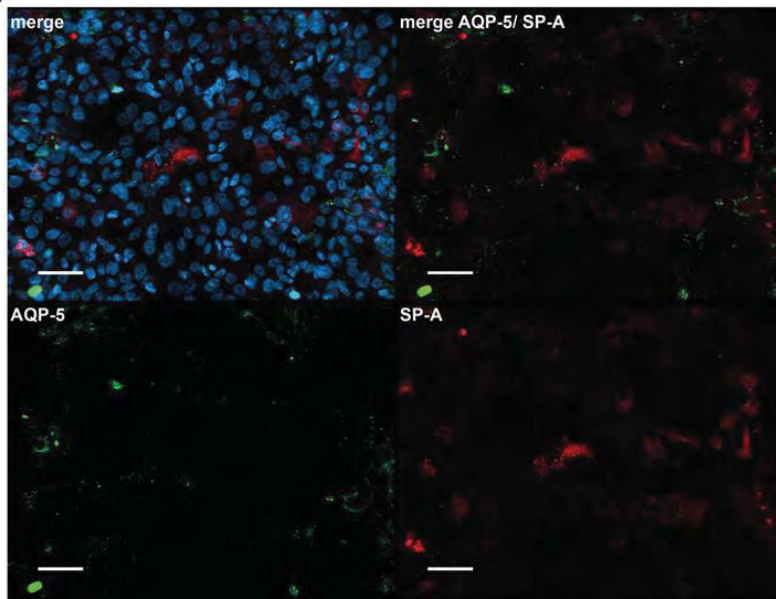
Supplement



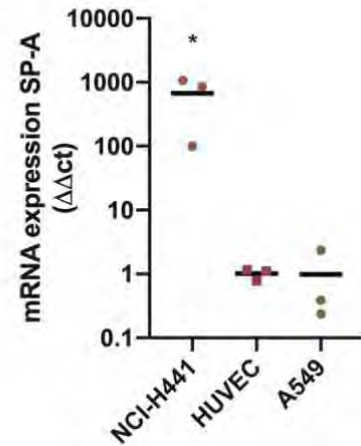
Supplementary Figure 1. Composition and seeding scheme of the human alveolus-on-a-chip model.

Alveolus-on-a-chip

(A)



(B)



15

16 **Supplementary Figure 2.** Marker expression of the epithelial cell layer of the human alveolus-on-a-chip model. (A)
17 Expression of epithelial marker aquaporine-5 (AQP-5) (orange) and surfactant protein A (SP-A) (red) was confirmed
18 by immunofluorescence staining. Nuclei were stained with 4',6-diamidin-2-phenylindol (DAPI), shown in blue. Scale
19 bar represents 50 μm . (B) Proof of SP-A mRNA expression of epithelial and endothelial cells. NCI-H441 cells showed
20 a significant higher mRNA expression after 6.5 h compared to HUVEC and A549 cells. N = 3, mean value shown as
21 line, ordinary one-way ANOVA, * $p < 0.05$.

22

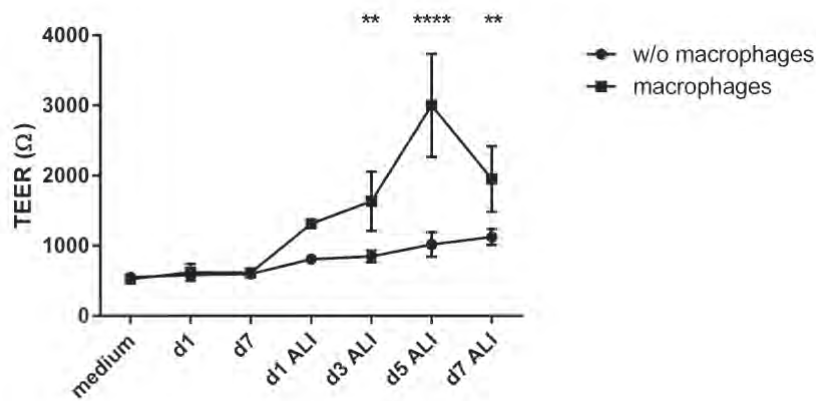
23

24

25

26

Alveolus-on-a-chip



27

28 **Supplementary Figure 3.** Transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) measurement in Ω . Human
29 alveolus-on-a-chip model was established until d 7 with epithelial and endothelial cells and macrophages. After 7 d
30 air-liquid-interphase (ALI) was carried out and TEER-measurement was performed as indicated. After 3 d of
31 cultivation the electrical resistance shows significant higher values for the model with cultivated macrophages. N =
32 3, min. and max. value shown, two-way-ANOVA, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

33

34

35

36

37

38

39

40

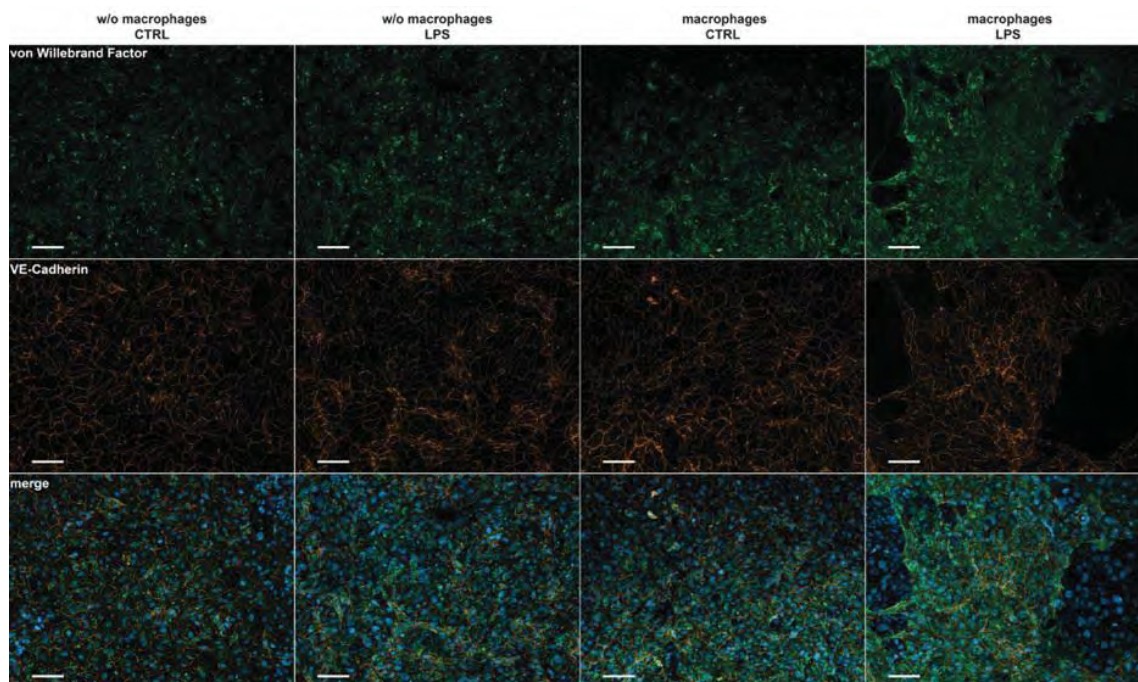
41

42

43

44

Alveolus-on-a-chip



45

46 **Supplementary Figure 4.** Expression of endothelial marker after LPS challenge of the human alveolus-on-a-chip
47 model. Expression of endothelial marker von Willebrand Factor (green) and VE-Cadherin (orange) was confirmed
48 by immunofluorescence staining. Alveolus model with cocultured macrophages lead to loss of endothelial cell layer
49 integrity after LPS challenge. Alveolus model without macrophages show no effect on the integrity of the endothelial
50 cell layer. Scale bar represents 100 μm .

51

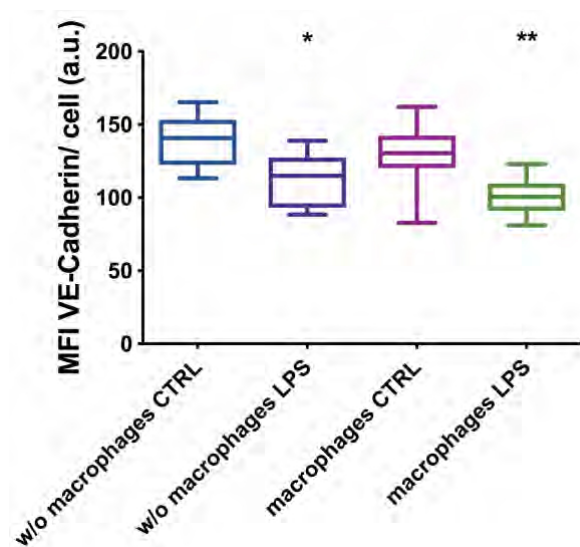
52

53

54

55

Alveolus-on-a-chip



56

57 **Supplementary Figure 5.** Quantification of VE-Cadherin expression. Mean fluorescence intensity (MFI) for VE-
58 cadherin per cell of the endothelial cell layer. Alveolus model without and with macrophages were challenged with
59 LPS or left untreated. N = 4 (for each experiment at least 5 regions of interest were randomly selected), Whisker Plot
60 with min. and max. value, two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test, * $p < 0.05$, * $p < 0.01$.

61

62

63

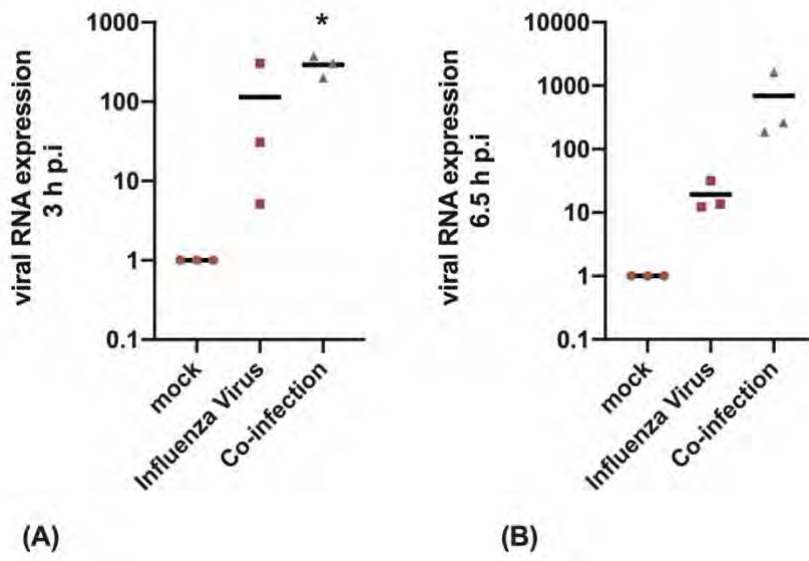
64

65

66

67

Alveolus-on-a-chip



68

69 **Supplementary Figure 6.** Detection of viral RNA from IV infection by using the human alveolus-on-a-chip model.
70 RNA was isolated (A) 3 h p.i and (B) 6.5 h p.i. For infection from the epithelial side, single incubation with IV (MOI
71 1) and *S. aureus* (MOI 5) was performed. Co-infection experiments were carried out with IV (MOI 1) which was
72 incubated for 30 min on epithelial side and subsequently exposed to *S. aureus* (MOI 5). N = 3, mean value shown as
73 line, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, * p < 0.05.

74

75

76

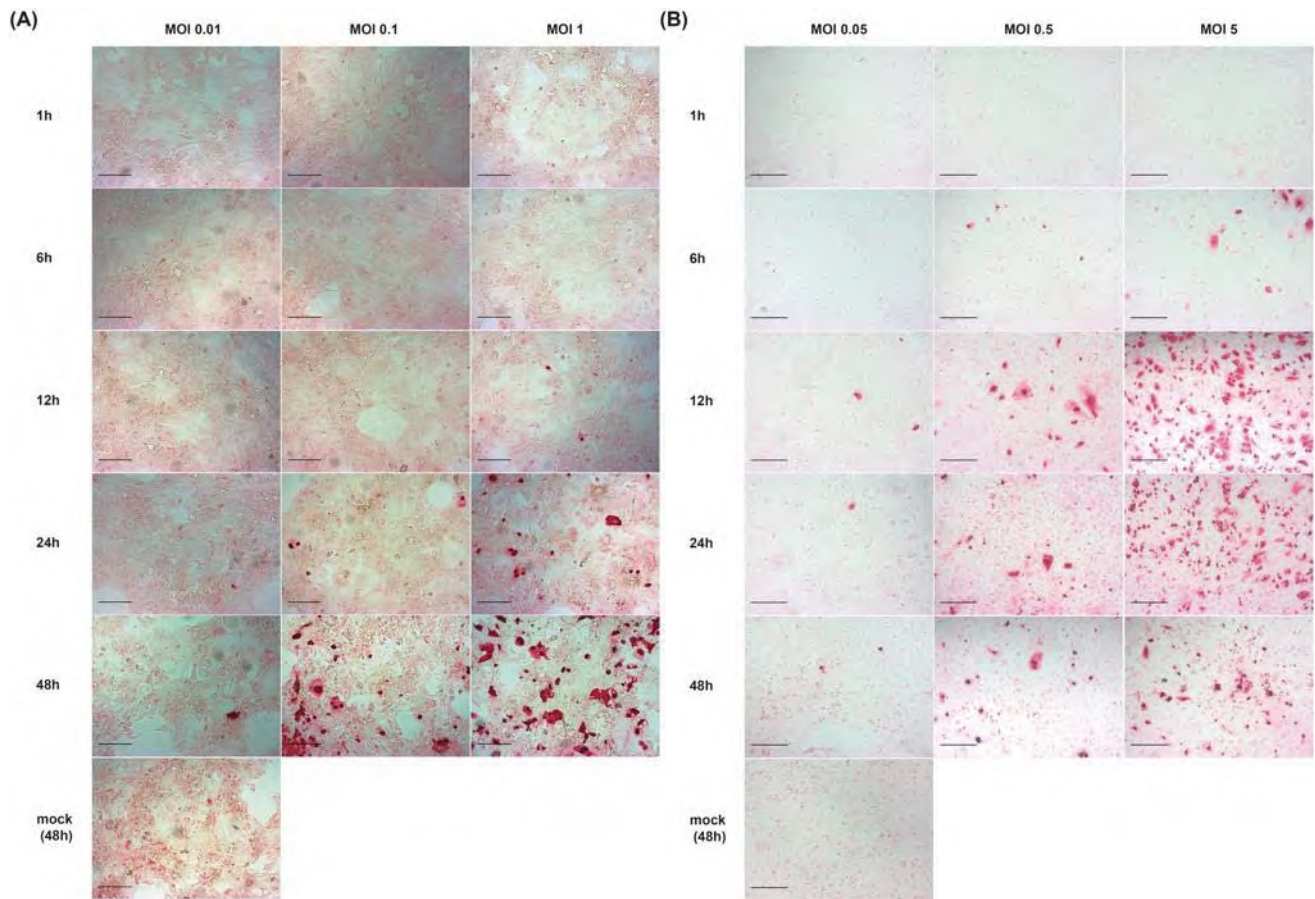
77

78

79

80

Alveolus-on-a-chip

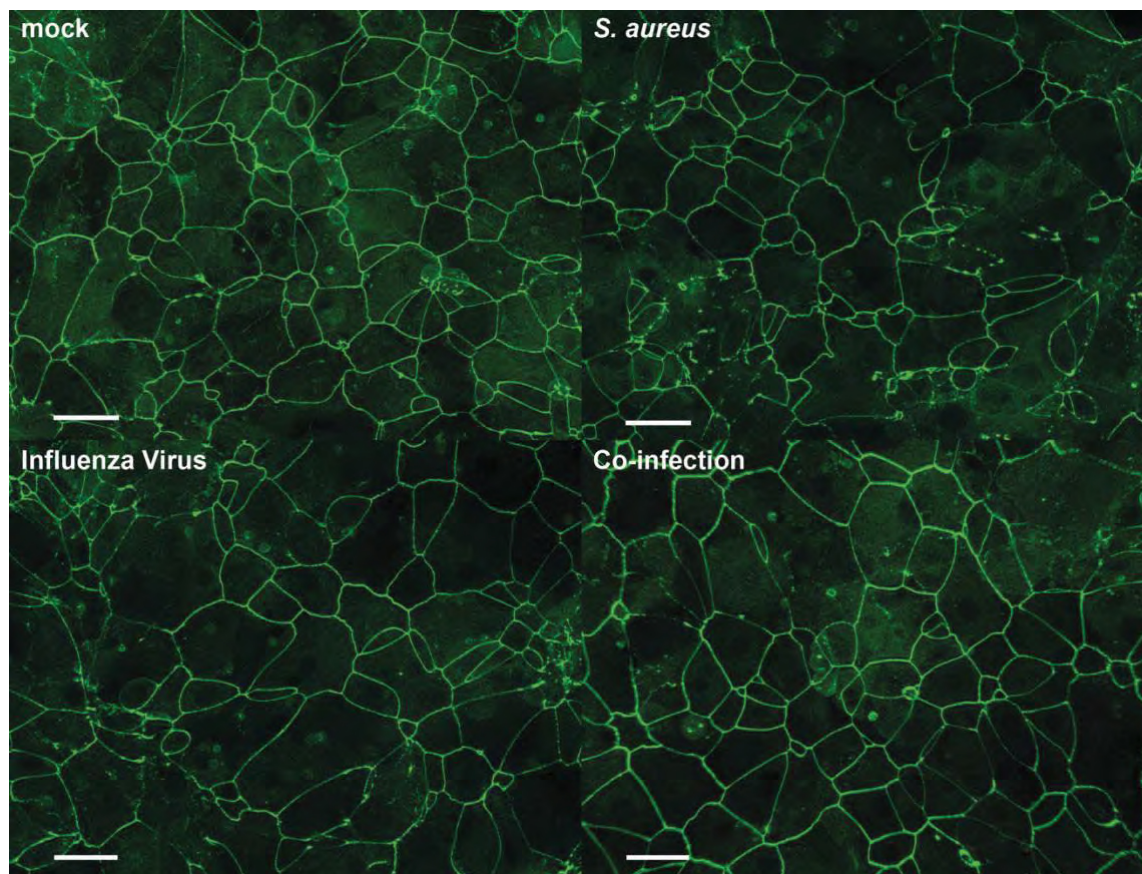


81

82 **Supplementary Figure 7.** Infection kinetics of IV within (A) NCI-H441 cells (MOI 1, 0.1, 0.01) and (B) HUVECs
83 (MOI 5, 0.5, 0.05). Infected cells were fixed after 1 h, 6 h, 24 h and 48 h and the immunocytochemical staining of IV
84 nucleoprotein was performed. The detection of the virus-infected cells was carried out by microscopy (AxioCamERc
85 5s, Carl Zeiss Jena, Germany). N = 3.

86

Alveolus-on-a-chip

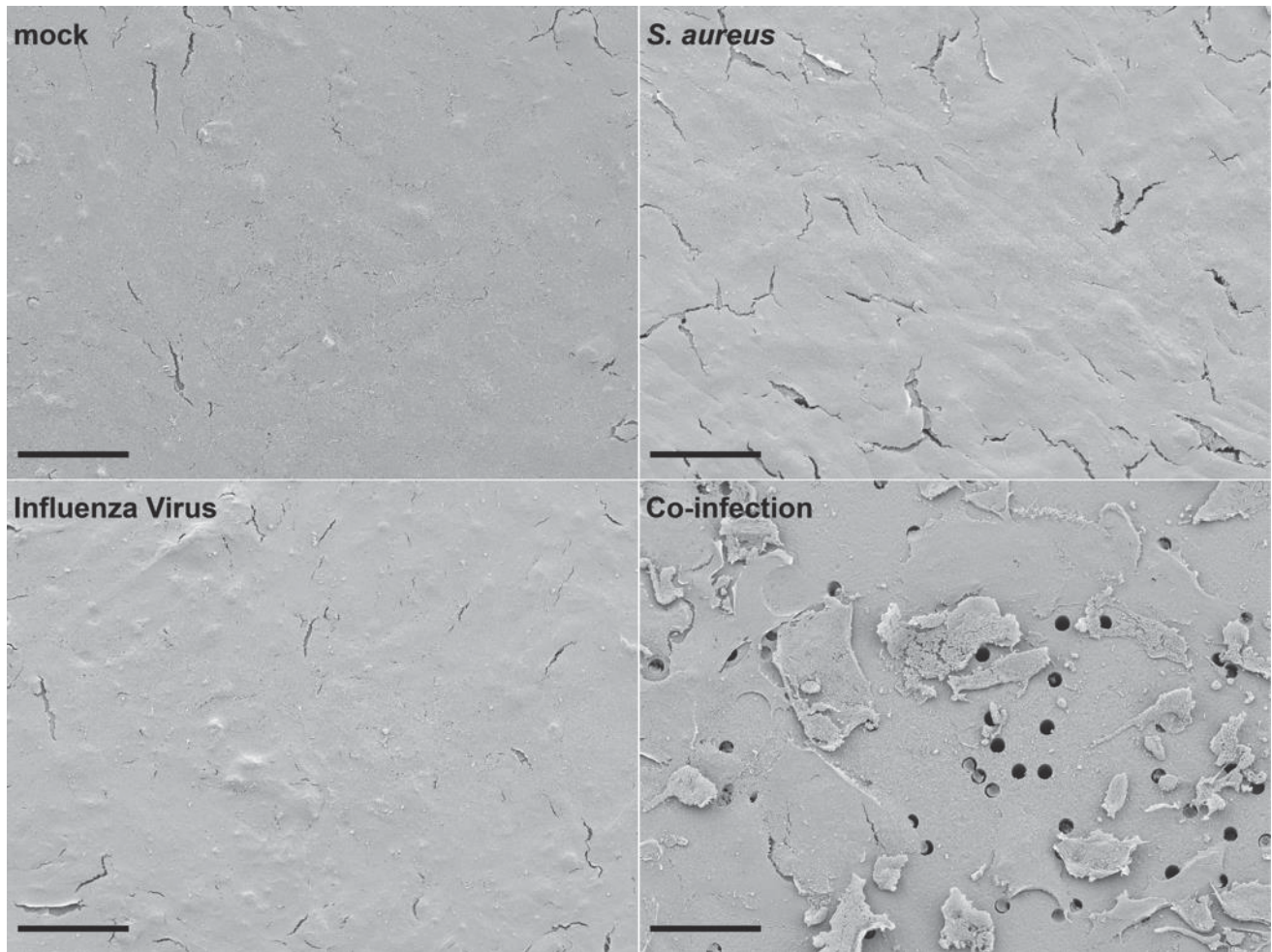


87

88 **Supplementary Figure 8. Analysis of the barrier function of the epithelial layer. Analysis of tight junction**
89 **protein ZO-1 of the epithelial layer after infection.** Immunofluorescence staining of the epithelial layer shows ZO-
90 1 (green) for mock, *S. aureus* and influenza virus infection and co-infection. Infection was performed from the
91 epithelial side for mock infection (blue bar), with IV (red bar), *S. aureus* (green bar) and coinfection (purple bar). For
92 single infection an incubation with IV (MOI 1) or *S. aureus* (MOI 5) was performed. Co-infection experiments were
93 carried out with IV (MOI 1) which was incubated for 30 min on the epithelial side followed by a *S. aureus* (MOI 5)
94 infection for 90 min. Scale bar represents 50 μm.

95

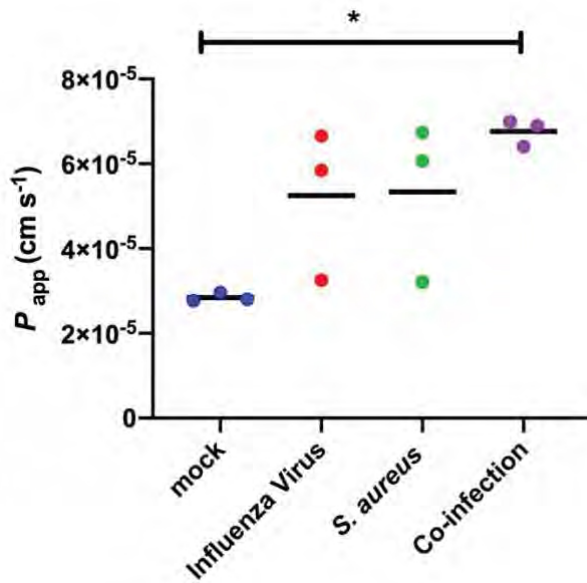
Alveolus-on-a-chip



96

97 **Supplementary Figure 9.** Visualization of the infection of the endothelial cell layer of the human alveolus-on-a-chip
98 model by scanning electron microscopy (SEM). For the infection with *S. aureus* USA300 (MOI 5) the epithelial side
99 of the model was incubated for 90 min and washed afterwards by using lysostaphin to kill extracellular bacteria. Co-
100 infection experiments were carried out with IV (MOI 1) which was incubated for 30 min on the epithelial side
101 followed by a *S. aureus* (MOI 5) infection for 90 min. Scanning electron microscopy was performed with 2.000x and
102 10.000x magnification. Scale represents 5 μ m (2.000x magnification) and 1 μ m (10.000x magnification).

Alveolus-on-a-chip



103

104 **Supplementary Figure 10.** Barrier function of the human alveolus-on-a-chip model with human primary epithelial
105 cells (NHBE). Permeability assay of mock-infected (blue), IV (red), *S. aureus* (green), and co-infected (purple) human
106 alveolus-on-a-chip model using FITC-dextran. Infection was performed from the epithelial side. For single infection
107 an incubation with IV (MOI 1) or *S. aureus* (MOI 5) was performed. Co-infection experiments were carried out with
108 IV (MOI 1) which was incubated for 30 min on the epithelial side followed by a *S. aureus* (MOI 5) infection for 90
109 min. The immunofluorescence staining was performed 3 h p.i. The co-infected layer shows significantly lower barrier
110 formation compared to the mock-treated chamber, N = 3, mean value shown as line, ordinary one-way ANOVA with
111 multiple comparison, Dunett's test, * $p < 0.05$

3.2 *Staphylococcus aureus* Lung Infection Results in down-Regulation of Surfactant Protein-A Mainly caused by Pro-Inflammatory Macrophages

Titel: Staphylococcus aureus Lung Infection Results in Down-Regulation of Surfactant Protein-A Mainly Caused by Pro-Inflammatory Macrophages

Autoren: Elisabeth Schicke*, Zoltán Cseresnyés , Knut Rennert, Vanessa Vau, Karoline Frieda Haupt, Franziska Hornung, Sandor Nietzsche, Fatina Swiczak, Michaela Schmidtke, Brigitte Glück, Mirijam Koch, Michael Schacke, Regine Heller, Alexander S. Mosig, Marc Thilo Figge, Christina Ehrhardt, Bettina Löffler und Stefanie Deinhardt-Emmer

*Erstautor

Zeitschrift: Microorganisms, Volume 8, Number 4, S. 1-18

Jahr: 2020



Article

Staphylococcus aureus Lung Infection Results in Down-Regulation of Surfactant Protein-A Mainly Caused by Pro-Inflammatory Macrophages

Elisabeth Schicke ^{1,2}, Zoltán Cseresnyés ³, Knut Rennert ⁴, Vanessa Vau ²,
Karoline Frieda Haupt ², Franziska Hornung ², Sandor Nietzsche ⁵, Fatina Swiczak ⁶,
Michaela Schmidtke ², Brigitte Glück ², Mirijam Koch ¹, Michael Schacke ², Regine Heller ⁷,
Alexander S. Mosig ⁶ , Marc Thilo Figge ^{3,8} , Christina Ehrhardt ² , Bettina Löffler ¹
and Stefanie Deinhardt-Emmer ^{1,2,*}

¹ Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Am Klinikum1, D-07747 Jena, Germany; elisabeth.schicke@uni-jena.de (E.S.); mirijam.koch@med.uni-jena.de (M.K.); bettina.loeffler@med.uni-jena.de (B.L.)

² Section of Experimental Virology, Institute of Medical Microbiology, Jena University Hospital, Hans-Knöll-Str. 2, D-07745 Jena, Germany; vanessa.vau@med.uni-jena.de (V.V.); Karoline.haupt@med.uni-jena.de (K.F.H.); franziska.hornung@uni-jena.de (F.H.); michaela.schmidtke@med.uni-jena.de (M.S.); glueck.brigitte@t-online.de (B.G.); michael.schacke@med.uni-jena.de (M.S.); christina.ehrhardt@med.uni-jena.de (C.E.)

³ Applied Systems Biology, Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology—Hans Knöll Institute, Adolf-Reichwein-Straße 23, 07745 Jena, Germany; zoltan.cseresnyes@hki-jen.de (Z.C.); Thilo.Figge@hki-jena.de (M.T.F.)

⁴ Dynamic42, GmbH, Winzerlaer Str. 2, D-07745 Jena, Germany; knut.rennert@dynamic42.com

⁵ Center for Electron Microscopy, Jena University Hospital, D-07743 Jena, Germany; sandor.nietzsche@med.uni-jena.de

⁶ Institute of Biochemistry, Jena University Hospital, D-07743 Jena, Germany; Fatina.swiczak@med.uni-jena.de (F.S.); Alexander.Mosig@med.uni-jena.de (A.S.M.)

⁷ Faculty of Biological Sciences, Friedrich Schiller University of Jena, D-07745 Jena, Germany; REGINE.HELLER@med.uni-jena.de

⁸ Institute of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Friedrich Schiller University Jena, 07743 Jena, Germany

* Correspondence: Stefanie.deinhardt-emmer@med.uni-jena.de; Tel.: +49-03641-9393640

Received: 16 March 2020; Accepted: 14 April 2020; Published: 16 April 2020



Abstract: Pneumonia is the leading cause of hospitalization worldwide. Besides viruses, bacterial co-infections dramatically exacerbate infection. In general, surfactant protein-A (SP-A) represents a first line of immune defense. In this study, we analyzed whether influenza A virus (IAV) and/or *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) infections affect SP-A expression. To closely reflect the situation in the lung, we used a human alveolus-on-a-chip model and a murine pneumonia model. Our results show that *S. aureus* can reduce extracellular levels of SP-A, most likely attributed to bacterial proteases. Mono-epithelial cell culture experiments reveal that the expression of SP-A is not directly affected by IAV or *S. aureus*. Yet, the mRNA expression of SP-A is strongly down-regulated by TNF- α , which is highly produced by professional phagocytes in response to bacterial infection. By using the human alveolus-on-a-chip model, we show that the down-regulation of SP-A is strongly dependent on macrophages. In a murine model of pneumonia, we can confirm that *S. aureus* decreases SP-A levels in vivo. These findings indicate that (I) complex interactions of epithelial and immune cells induce down-regulation of SP-A expression and (II) bacterial mono- and super-infections reduce SP-A expression in the lung, which might contribute to a severe outcome of bacterial pneumonia.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; pneumonia; surfactant protein-A; influenza A virus; human alveolus-on-a-chip

1. Introduction

Pneumonia is the most severe inflammatory disease of the lower respiratory tract and also the most common infectious disease worldwide. A wide variety of microorganisms can induce pneumonia, including viruses and bacteria. Among these, influenza A and B viruses (IAV, IBV) are primary causative agents [1]. The high mortality rates during the large influenza virus (IV) epidemics and pandemic outbreaks are associated with bacterial super-infections, and here *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), a facultative-pathogenic bacterium, is of major importance. *S. aureus* colonizes epithelial surfaces, but can also cause a broad spectrum of infections ranging from superficial skin infections to life-threatening diseases, such as bacterial pneumonia [2].

The first line of defense during infections, apart from physical barriers, is regulated by an innate host immune response in which white blood cells and chemical components play a crucial role [3]. Granulocytes and phagocytes are the key cells of the innate immune system [4]. Besides, the non-specific cellular response, including mucous and also surfactant proteins, are principal targets to fight pathogens [5]. Pulmonary surfactant has long been known to be essential to lower the surface tension at the air-liquid interface of the lung and to prevent its collapse at end-expiration. However, surfactant proteins have also immunomodulatory and antimicrobial activity and thereby are important agents in primary host immune defense [6–8].

Surfactant proteins interact with several pathogens, among others, with IAV [9] and *S. aureus* [10]. During the IAV invasion into the lung, the viral hemagglutinin binds to sialic acid residues on the surface of epithelial cells to initiate viral internalization [11]. Surfactant protein-A (SP-A) also presents sialic acid residues to bind IAV [12]. The agglutination of SP-A reduces the infectivity and dissemination of the virus and supports its clearance by immune cells [9]. Furthermore, SP-A promotes aggregation and phagocytosis of *S. aureus* by neutrophils and macrophages and inhibits bacterial adherence to the epithelial layer, thus preventing the bacterial penetration into the host cells [13].

Several inflammatory cytokines alter SP-A expression. Among these, TNF- α is known as a strong suppressor of SP-A [14–17]. Immune cells especially, such as macrophages, are known to release large amounts of TNF- α during bacterial infections [18–21].

Yet, bacteria can also directly affect pulmonary surfactant proteins [22], as *S. aureus* expresses a cysteine protease staphopain A (ScpA, sspA) that cleaves SP-A and inactivates the antibacterial activity of the protein, promoting the colonization of the lung by *S. aureus* and other pathogens [23].

Taken together, many parameters during an infection affect the SP-A expression. In this study, we aimed to elucidate whether IAV, *S. aureus* or the combined infection of both pathogens has an impact on the SP-A expression in the lung, which could represent a mechanism to weaken the host defense system and worsen the outcome of a lung infection.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

For the single cell-culture, we use alveolar epithelial cells. The human adenocarcinoma cell line NCI-H441 (ATCC, Manassas, VA, USA) was cultivated in RPMI-medium (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Sigma Life Science, Merck, Darmstadt, Germany). The cell line was sub-cultured in the laboratory and tested for contamination with mycoplasma. NCI-H441 cells were grown up to 80% confluence before being sub-cultured and used until the 18th passage.

Besides this, primary monocytes were isolated from whole peripheral blood of healthy donors. The blood was diluted in an equal volume with phosphate buffer saline (PBS, 2 mM EDTA, 0.1% FBS (Sigma Life Science, Merck, Darmstadt, Germany) and then gently transferred to the surface of Biocoll separation solution (Biochrome GmbH, Berlin, Germany). The monocytes were separated from blood cells by centrifugation without bakes. Cells were washed with PBS three times with centrifugation steps in-between. For cell culture experiments, 6×10^6 monocytes/well were cultured in 24-well dishes in RPMI-medium supplemented with 10% autologous human serum, 10 ng/mL human granulocyte-macrophage colony-stimulation factor (GM-CSF, PeproTech, Hamburg, Germany), 10 ng/mL macrophage colony-stimulation factor (M-CSF, PeproTech, Hamburg, Germany), and penicillin/streptomycin. The cells were incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO₂ and then washed twice with RPMI. Cells were cultured for 6 days. A medium exchange was performed every second day. RPMI-medium was supplemented with 10% autologous human serum, 10 ng/mL GM-CSF, to induce macrophage differentiation, and penicillin/streptomycin.

Macrophage differentiation from monocytes was routinely checked by staining for macrophage cell type markers CD68, and CD163 in random-wise selected control samples. No significant donor-related variation of differentiation efficiency or cell numbers was observed.

2.2. Human Alveolus-on-a-Chip Model

For the establishment of the human alveolus-on-a-chip model, we used MOTiF biochips, manufactured and purchased by microfluid ChipShop GmbH (Jena, Germany). The chip consists of two chambers that are separated by an 11 µm thick polyethylene-terephthalate (PET) membrane with a pore diameter of 8 µm and pore density of 2×10^5 pores/cm². The capacity of the endothelial is 220 µL (including afferent and efferent channels), and the volume of the epithelial chamber is 120 µL (also including the channels). Peristaltic pumps were used for the perfusion of the biochip, as explained previously [24].

For the cell cultivation, we use NCI-H441 cells, endothelial cells (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) and human monocyte-derived macrophages (hMdm) as described above cm² [25].

NCI-H441 cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were seeded on the opposite side of the membrane (epithelial chamber) with a density of 2.7×10^5 NCI-H441/cm². Cells were cultured for 3 d until confluency with a daily media exchange. The NCI-H441 medium was supplemented with 1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich, Munich, Germany).

After 1 week of culture, hMdm cells were seeded on top of the NCI-H441 cell layer with a density of 0.9×10^5 macrophages/cm² (Supplementary Figure S1). The random-wise analysis of the macrophage density observed a typical monocyte differentiation rate of 90% without donor-specific variations. These data were obtained during the establishment of the human alveolus-on-a-chip model and were not determined for each chip.

HUVECs were kindly provided by Regine Heller (Faculty of Biological Sciences, Friedrich Schiller University of Jena) and were isolated from human umbilical cord veins as described previously and seeded into the biochip (vascular cavity) at a density of 2.7×10^5 HUVECs/cm² in endothelial cell growth medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) [26] for 48 h with a daily medium exchange [25].

2.3. Pathogens

For the propagation of IV, we used Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. MDCKs were cultured in EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC, Wesel, Germany), supplemented with 10% fetal calve serum (FCS). For the virus propagation, the IV strain A/Puerto Rico/8 was passaged on MDCK in EMEM supplemented with 25 mM MgCl, 1.3% bicarbonate, and 0.333% trypsin. The infected cells were incubated at 37 °C and 5% CO₂. After freezing and a centrifugation step, the virus was stored at −80 °C.

For the murine model, the A/H1N1/pdm09 influenza virus variant HA-D222-mpJena/5258, expressing an aspartate in position 222 of the viral hemagglutinin, was passaged on MDCK.

HA-D222-mpJena/5258 was obtained after three plaque-purification steps [27] from the lung of BALB/c mice infected with the A/H1N1/pdm09 influenza virus isolate A/Jena/5258/09 (kindly provided by Andi Krumbholz [28]).

The bacterial infection was performed with a methicillin-resistant *S. aureus*/USA300/wild type (WT), kindly provided by Lorena Tuchscher [29]. The bacterial strain *S. aureus* USA300 was grown overnight in brain heart infusion (BHI)-medium at 37 °C with shaking. All bacteria were stored in the BHI medium at −80 °C. Colony-forming units (CFU) of *S. aureus* were determined weekly to calculate the number of infectious particles in the cryopreserved bacterial working solution and to exclude changes in the number of living bacteria by freezing.

The determination of the *S. aureus* load after the infection was performed by using the supernatants. For this, the supernatants were serial-diluted in PBS and plated on blood agar plates (Columbia blood agar, Oxoid, Germany). After overnight incubation at 37 °C, colonies were counted to detect the number of bacteria.

2.4. In Vitro Infection

For the viral infection of the NCI-H441 mono-cell culture as well as the infection on the human alveolus-on-a-chip model, cells were washed with PBS once (Supplementary Figure S2). The IV strain A/Puerto Rico/8 was added to the cells in RPMI (0.2% autologous human serum, 1 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂) and incubated for 30 min at 37 °C without centrifugation. For the specification of the pathogen concentration, we have used the multiplicity of infection (MOI). This information describes the ratio of pathogens to infected cells. For the viral infection of the NCI-H441 cells we use MOI 1.

The bacterial infection on NCI-H441 cells was performed with RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 1% human serum albumin (HSA) and 1mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). The epithelial side of the human alveolus-on-a-chip model was infected with RPMI/BA (10% autologous human serum, 1 mM HEPES, 10 ng/mL GM-CSF) with bacteria (MOI 5). After the bacterial infection was performed, cells were incubated with bacteria for 90 min at 37 °C and 5% CO₂. Afterwards, the cells were washed. To eliminate the non-internalized bacteria, cells were treated for 20 min with RPMI-medium containing lysostaphin at a concentration of 6 µg/mL for the NCI-H441 mono-cell culture and 20 µg/mL for the human alveolus-on-a-chip model. Subsequently, cells were washed with PBS and then incubated with RPMI for indicated time points at 37 °C with 5% CO₂.

For the co-infection scenarios, both pathogens were added to the cells. For this, first, the infection with IV strain A/Puerto Rico/8 (MOI 1) was performed, followed by the bacterial infection with *S. aureus*/USA300/WT (MOI 5).

For the infection of the single cell-culture of hMdm, cells were isolated as described above and used after 6 days of cultivation. After a washing step with RPMI, the IV strain A/Puerto Rico/8 (MOI 1) was added to the cells in RPMI (0.2% autologous human serum, 1 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂) and incubated for 30 min at 37 °C without centrifugation until the indicated time points. For the single bacterial infection as well as the co-infection, we use *S. aureus*/USA300/WT (MOI 1).

The experimental setup always contained a cell control (designated as mock), a single infection with the virus, a single infection with bacteria, and a co-infection. All cells were treated with the same medium. This medium contained the according pathogen for the single- or co-infection or no pathogens for the mock-treated cells of the cell control.

2.5. In Vivo Infection

For the murine pneumonia model the mice were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). The animal application was proven by the local ethics committee of the Thuringian State Office for Consumer Protection (Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Reg.-Nr.: UKJ-018-028, 10/10/2018). The mice were maintained according to institutional guidelines in individually ventilated cages, and food and water were given ad libitum. For the in vivo model, we use specific-pathogen-free

(SPF) C57Bl/6 mice from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France), providing us with an excellent health status for the animals. The animal facility of the Jena University Hospital also provides an excellent unit for performing animal experiments. Under S2 conditions, the animals are housed in separate units, which are monitored frequently.

Eight-week-old female C57bl/6 mice were infected with the IV strain HA-D222-mpJena/5258, *S. aureus* USA300 or with both pathogens in a co-infection. Therefore, the mice were anesthetized by isoflurane inhalation and intranasally inoculated with HA-D222-mpJena/5258 (5×10^4 plaque-forming units (PFU)) in 20 μ L NaCl or only 20 μ L NaCl (mock-treated). The same method was used for *S. aureus* infection (1×10^7 CFUs) two days later. During the infection period, the state of the animal health was monitored up to two times per day by controlling the weight, temperature and the scoring of the general behavior condition. Four days after HA-D222-mpJena/5258-infection, animals were sacrificed, and samples of blood and lung were subjected to further analysis. The viral titer and the bacterial counts of infected mice were determined in the right inferior lung lobe.

Moreover, the right superior lung lobe was used to determine the mRNA expression of TNF- α and SP-A by quantitative real-time PCR. For histopathology, the left lung lobe of each mouse was fixed in 10% formalin for at least 24 h, dehydrated in a graded series of alcohol and xylene, and mounted in paraffin. For each lung sample, about ten 5 μ m thick sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) to study the degree of cellular infiltration. Sections of each lung were examined microscopically (Zeiss microscope Axio Vert.A1), and representative photographs were obtained (Axio Cam ERc5S).

2.6. Quantitative Real-Time PCR

For quantitative real-time PCR, cell infection was conducted as described above. Isolation of total RNA from macrophages, NCI-H441 and homogenized lungs was done by using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Cells of the biochip model were first homogenized using the QIAshredder homogenizers (Qiagen) and total RNA was isolated with RNeasy Micro Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions. Equal amounts of RNA were transcribed into cDNA using QuantiNova Reverse Transcription Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Gene expression of several genes was determined by qRT-PCR on a Thermo Scientific™ PikoReal™ Real-Time PCR System using QuantiTect SYBR Green (Qiagen) and gene-specific primers (Table 1). Relative gene expression levels were referred to the housekeeping gene GAPDH for NCI-H441 and RPL37A for macrophages and calculated with the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [30].

To analyze the mRNA expression of SP-A, we have compared the data from the infection with the pathogens and the data of the stimulation with recombinant TNF- α . For this, we used 10 nM of TNF- α (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) added to RPMI. After 30 min of incubation on NCI-H441 cells, they were washed with PBS and incubated for 4 h. Afterward, the mRNA expression was performed as described above.

Table 1. For the qRT-PCR we used gene-specific primers for human GAPDH, TNF- α , SP-A, CD80, CD206, murine GAPDH and SP-A with forward and reverse sequence.

Gene Name	Sequence Forward	Sequence Reverse
human GAPDH	5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'	5'-CAATACGACCAAAATCCGTTGAC-3'
human TNF- α	5'-GGAGAAGGGTGACCGACTCA-3'	5'-CTGCCAGACTCGGCAA-3'
human SP-A	5'-GATGGGCAGTGAATGACAGG-3'	5'-GGGAATGAAGTGGCTAAGGGTG-3'
RPL37A	5'-ATTGAAATCAGCCAGCACGC-3'	5'-AGGAACCACAGTGCCAGATCC-3'
CD80	5'-TGGTGCTGGCTG GTCCTTC-3'	5'-CGTTGCCACTTCTTCTACTTCC-3'
CD206	5'-TCGGGTTTATGGAGCAGGTG-3'	5'-TGAACGGGAATGCACAGGTT-3'
murine GAPDH	5'-CAACAGCAACTCCCACTCTTC-3'	5'-GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT-3'
murine SP-A	5'-GCAGAGATGGGAGAGATGGTATCAA-3'	5'-ATGGACCTCCATTAGCATGTGGGA-3'

2.7. Protein Analysis

For the detection of extracellular TNF- α we performed the infection of the cells with virus, bacteria and both pathogens as described above (compare with the chapter on in vitro infection) and determined the concentration of TNF- α within the supernatants.

Supernatants were collected at 30 min and 4 h p.i. and transferred to an antibody-coated 96-well plate in duplicates (Human TNF- α ELISA Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and subsequently analyzed according to the manufacturer's instructions. For the identification of SP-A, we used NCI-H441-cells and performed the infection as previously described [25]. Next, 4 h and 18 h p.i. cells were lysed with radioimmunoprecipitation assay lysis buffer (RIPA (20 mM Tris-HCL (pH 7.4), 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X 100, 2 mM EDTA, 50 mM Na β -Glycerophosphate, 20mM Sodium-Pyrophosphate, 0.2 mM Pefablock, 5 μ g/mL leupeptin, 5 μ g/mL aprotinin, 1mM sodium vanadate and 5mM benzamidine) for 30min at 4 °C. Centrifugation at 4 °C was utilized for clearing the cell lysate from debris. Afterwards, the protein concentration was determined using the Bradford method. For this, the concentration was adjusted to the lowest concentration with RIPA buffer and treated with Laemmli-buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, USA). The samples obtained this way were transferred in duplicates to a coated 96-well plate (Human SFTPA1/Surfactant Protein A ELISA Kit, Sandwich ELISA, LifeSpan BioSciences, Inc., Seattle, WA, USA) and the procedure was performed following manufacturer's instructions. The optical density (OD)₄₅₀ was determined by the microplate reader SPECTROstar Omega (BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland). The protein concentration was calculated by comparison to a standard curve.

For the measurement of pro-inflammatory cytokines, a LEGENDplex™ Human Inflammation Panel (13-plex) (BioLegend, San Diego, CA, USA) was used. Alveolar biochips were infected as previously described and 4 h p.i. supernatants were collected. 25 μ L of each sample was transferred in duplicates into the 96-well filter plate and the LEGENDplex panel was performed following the manufacturer's instructions. Samples were measured the same day on a flow cytometer (BD, Accuri, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), and the cytokine amount was calculated by comparison to a standard curve.

2.8. Immunofluorescence Microscopy

For the immunofluorescence staining of the cells of the human alveolus-on-a-chip model, the membranes with the NCI-H441 cells were fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature. For the staining of the endothelial sides, cells were fixed for 15 min with ice-cold methanol at -20 °C. Afterwards, intracellular staining of SP-A was performed. For this, membranes were incubated overnight at 4 °C in PBS containing 0.1% Saponin, 3% donkey serum and anti-SP-A antibodies (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA). Thereafter, fluorescent labeled secondary antibodies (donkey-anti-goat- AlexaFlour647, life technologies, Carlsbad, CA, USA) were used and incubated for 30 min. The stained samples were embedded into a mounting medium (S3023, Dako, Hamburg, Germany). Imaging was performed with an Axio Observer Z1 fluorescence microscope with ApoTome.2 extension (Carl Zeiss AG, Jena, Germany), and images were analyzed with ImageJ2 software (Fiji distribution).

2.9. Scanning Electron Microscopy

The fixation of the cells was performed inside the human alveolus-on-a-chip model by using a fixative solution (2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer) for 90 min. Afterwards, a fresh cacodylate buffer was used for 30 min to wash out the fixative. The membranes were dehydrated in ascending ethanol concentrations (30%, 50%, 70%, 90%, and 100%) for 15 min each. The samples were critical point dried using liquid CO₂ and sputter coated with gold (thickness approx. 2 nm) using an SCD005 sputter coater (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein) to avoid surface charging. Finally, the specimens were investigated with a field emission (FE) SEM LEO-1530 Gemini (Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen, Germany).

2.10. Image Analysis and Quantification

For the analysis, images were used as Z stacks in the Zeiss native image format “CZI”. After deconvolution with Huygens Software (Scientific Volume Imaging b.v.Hilversum, The Netherlands), the images were segmented in Imaris 9.2.1 (Bitplane, Zürich, Switzerland). The complete process was published before [25].

2.11. Statistical Analysis

All experiments were performed in technical duplicate and at least three were independent experiments. After an examination of quality criteria, non-parametrical methods were used for analysis. Statistical significances were evaluated by one-way-ANOVA (Kruskal–Wallis test) followed by Mann–Whitney U test or by using one-way-ANOVA Tukey’s multiple comparison test. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 25 software (IBM, Armonk, NY, USA) and Prism software (v.8; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Neither IAV Nor *S. aureus* Directly Affects SP-A Expression in Epithelial Cells, But TNF- α is a Strong Inhibitor of SP-A Expression

To determine the effect of the mono- and co-infections on the SP-A production we used single cell cultures of alveolar epithelial cells type II (NCI-H441 cells). To verify an efficient infection, viral titers (Figure 1A), as well as viable bacteria, were measured in a time-dependent manner (Figure 1B).

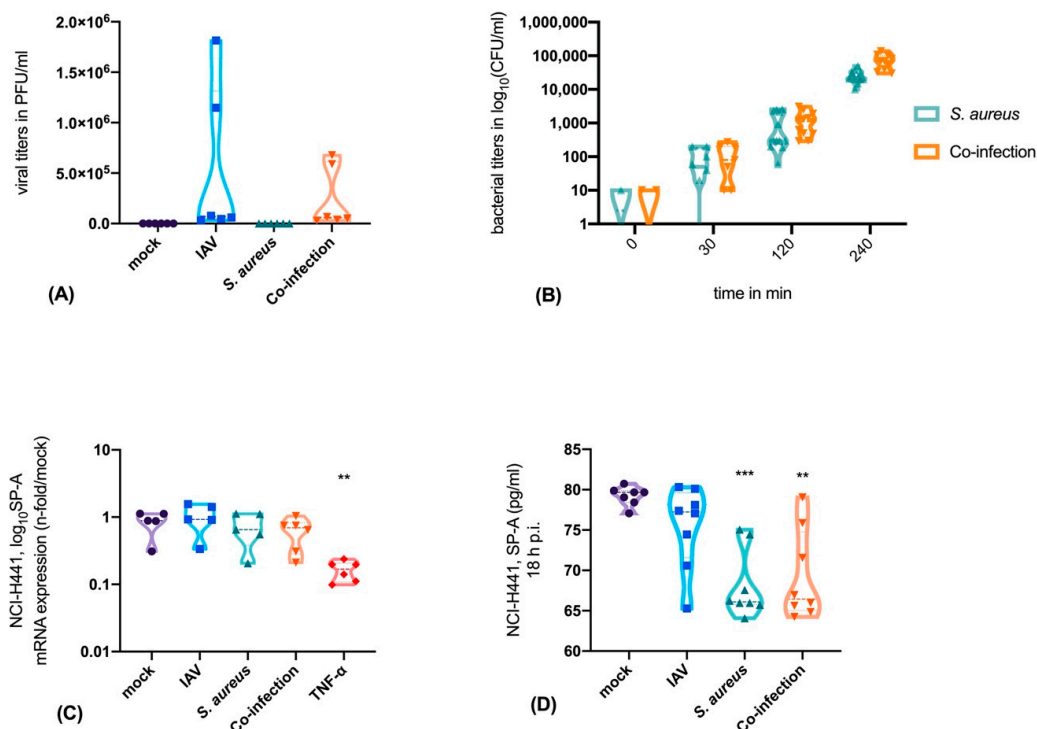


Figure 1. NCI-H441 cells were productively infected with influenza A virus (IAV) upon mono- and co-infection with *S. aureus* USA300 (A). The bacterial load increases over time upon mono- and viral co-infection (B). The infection of epithelial cells does not affect the mRNA expression of SP-A, whereas TNF- α reduces the SP-A expression (C). Extracellular SP-A levels are decreased in the supernatants of the epithelial cell culture system after *S. aureus* infection, as well as co-infection of *S. aureus* and IAV (D). Mock-treated cells obtained the same medium and treatment as infected cells without the pathogen. Ordinary one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

After mono-infection with IAV or *S. aureus* and after co-infection, SP-A mRNA-expression was not changed. By contrast, treatment with TNF- α , a well-known suppressor of SP-A, resulted in significantly decreased SP-A mRNA expression (Figure 1C). Next, we evaluated the protein levels of SP-A in epithelial supernatants. Here we were able to show that SP-A is significantly decreased after 18 h of bacterial mono- or co-infection (Figure 1D). This finding can be attributed to the cysteine protease staphopain A (ScpA, ssPA) that cleaves SP-A. We have verified the presence of ssPA in the bacterial strain *S. aureus* USA300 by using the PanStaph Alere Genotyping Kit (Figure 2). Here, we were able to demonstrate that *S. aureus* USA300 disposes of a large number of virulence factors. For instance, *S. aureus* strain USA300 expresses leucocidins (lukS, lukF), phenol-soluble modulins (PSM) [22], and superantigens (ssl) that are mainly directed against immune cells and induce strong proinflammatory and cytotoxic effects [31].

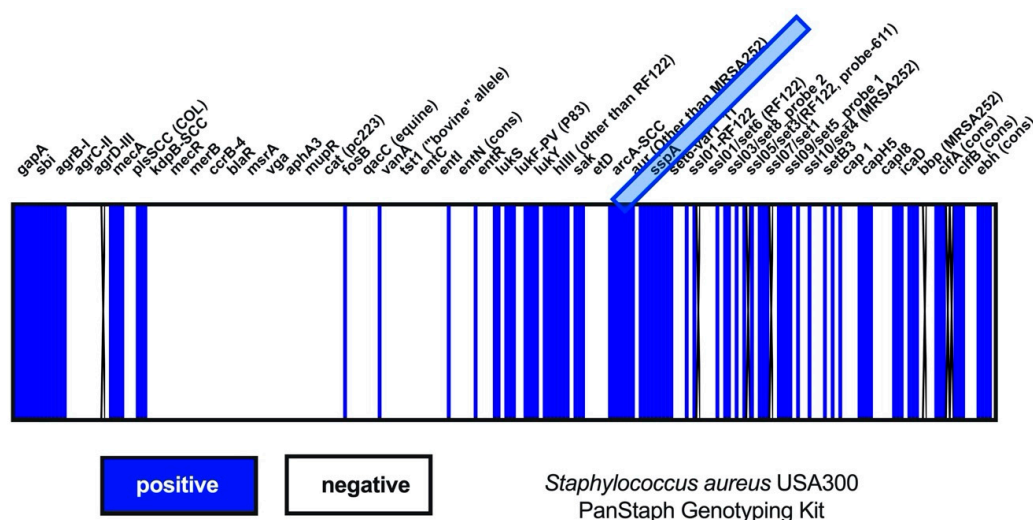


Figure 2. Three hundred and thirty genes of *S. aureus* USA300 were monitored by use of PanStaph Genotyping Kit (Alere, Germany). Blue graphs show the detectable genes as positive and the white bars as negative. The virulence factor ssPA was positively detectable within the *S. aureus* strains USA300. Every fifth gene was named within the heat map.

During viral and/or bacterial infection, the cytokine profile, including the expression of TNF- α , of infected cells is altered depending on the host cell type and on the pathogens. In an epithelial mono-cell culture (NCI-H441 cells) bacterial infection caused a much lower increase in TNF- α mRNA-expression compared to the infection of immune cells (hMdm) (Figure 3). Here, we measured up to a 6-log increase of the TNF- α mRNA-expression after bacterial infections.

Macrophage differentiation from monocytes was proven by performing single-cell experiments with hMdm. Here we can demonstrate that macrophages react on their mRNA expression level after challenging with pathogens. All cells infected with virus, bacteria or both, had a significantly higher level of CD80 (mRNA) than the mock-treated cells (Supplementary Figure S3). By contrast, a significant reduction of the M2 marker CD206 was observed after co-infection, indicating that this scenario represents the strongest challenge for the immune cells.

In summary, our results show that TNF- α expression after *S. aureus* infection was much higher in macrophages than in epithelial cells, whereas IAV-infection did not significantly increase the TNF- α expression in either cell types (Figure 3).

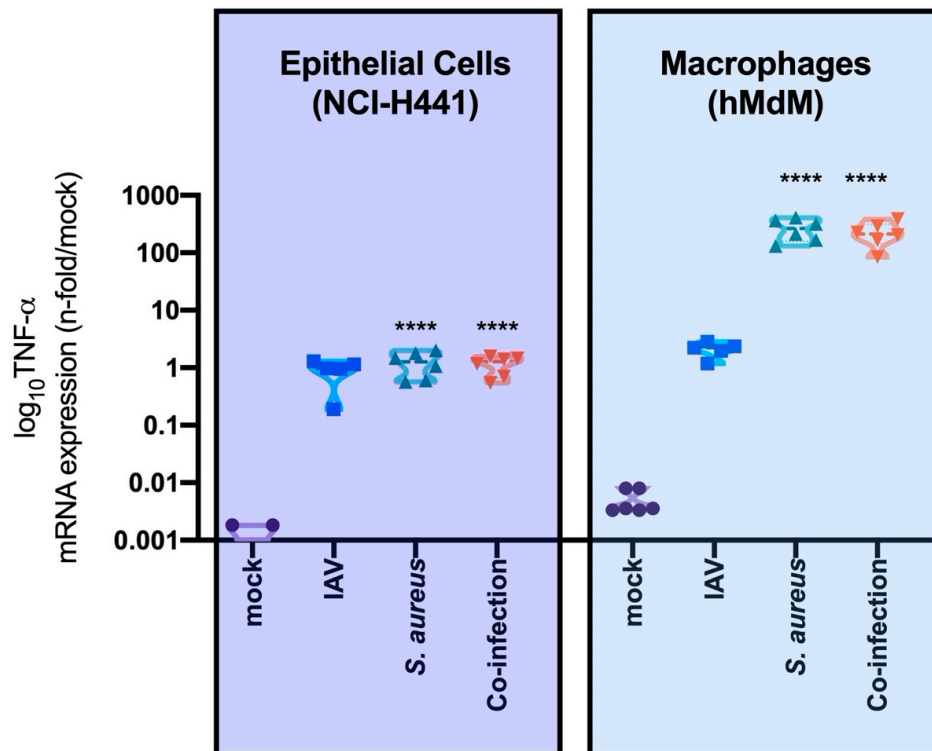
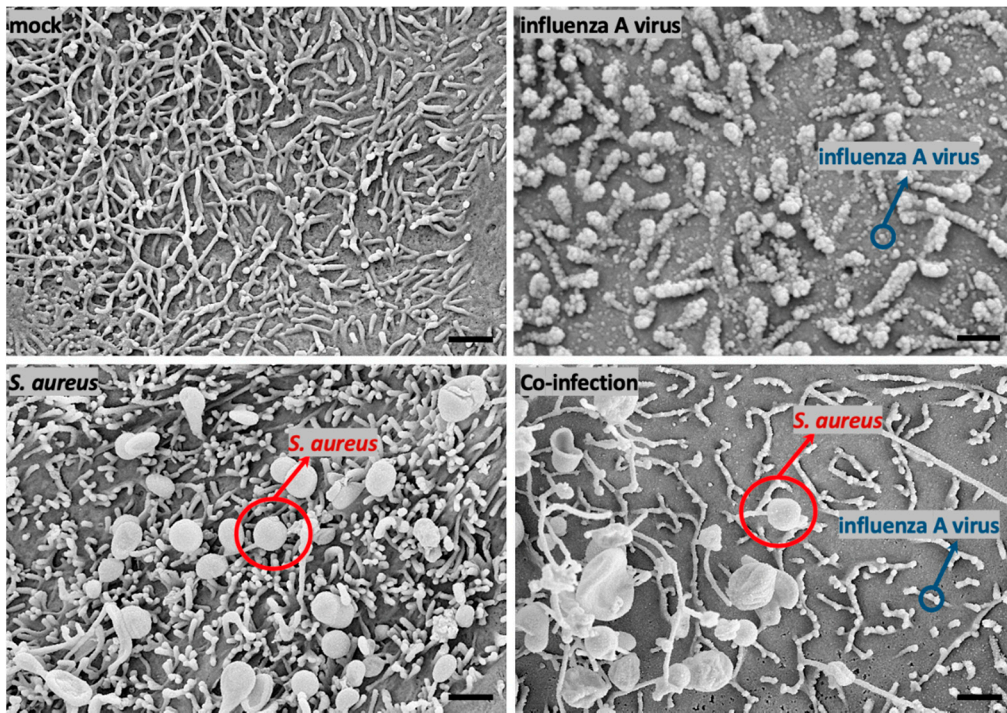


Figure 3. TNF- α expression is significantly higher in immune cells (hMdm) than in epithelial cells (NCI-H441) after bacterial mono- or co-infection. Mock-treated cells obtained the same medium and treatment as infected cells without the pathogen. Two-way ANOVA, multiple comparisons, **** $p < 0.0001$.

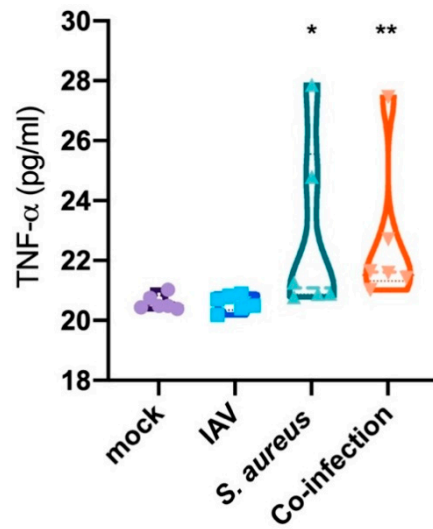
3.2. Interaction of Epithelial, Endothelial and Macrophages Causes SP-A Downregulation Mainly Triggered by Bacteria

Within the human alveolus-on-a-chip model, epithelial cells (NCI-H441), endothelial cells (HUVECs) and macrophages (hMdm) were co-cultured under perfusion of the endothelial side and infected via the epithelial side with the pathogens as indicated. The successful viral infection was proven by the budding process of IAV, as visible in the SEM-pictures (Figure 4A). Furthermore, we could visualize the adherence of *S. aureus* on the epithelial surface within the alveolus-on-a-chip model (Figure 4A). In this model system, composed of the different cell types, we measured elevated levels of TNF- α caused by *S. aureus* mono- or IAV-coinfection, whereas IAV did not enhance TNF- α release (Figure 4B).

To evaluate the impact of the infection and subsequent TNF- α expression on the production of SP-A, we measured the SP-A protein content by immunofluorescence staining in the human alveolus-on-a-chip model following infection with IAV, *S. aureus* or co-infection (Figure 4C). By using quantitative analysis of the mean fluorescence intensity (MFI) we detected decreased levels of SP-A following infection by *S. aureus* and in the co-infection scenario (Figure 4D).

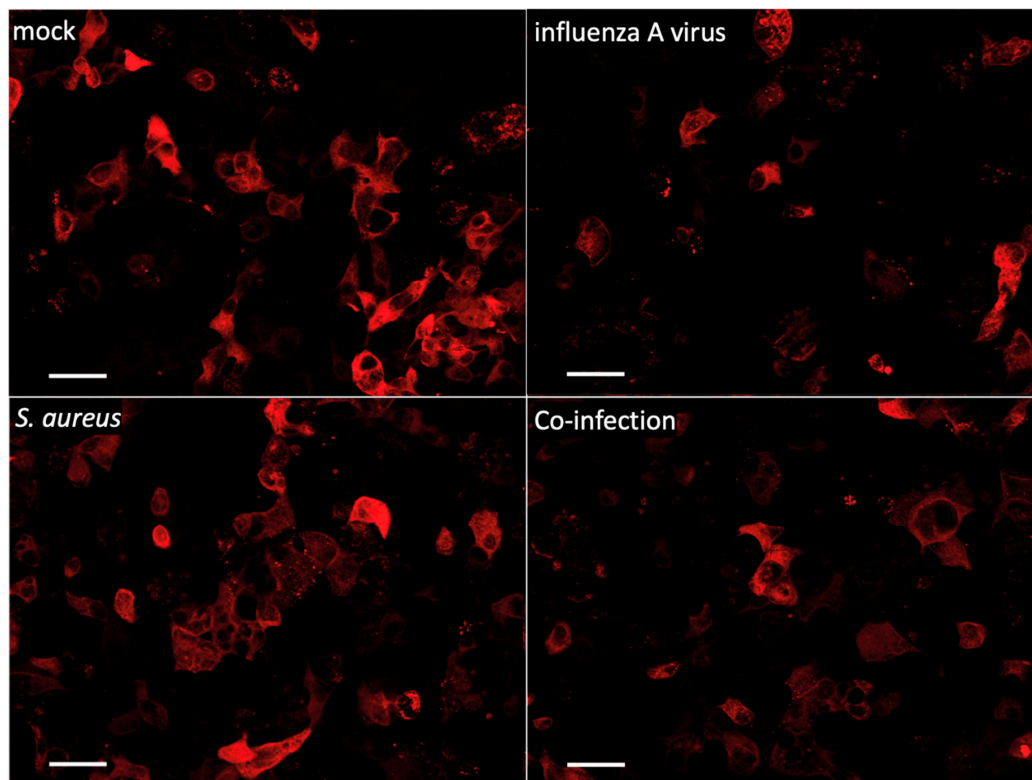


(A)

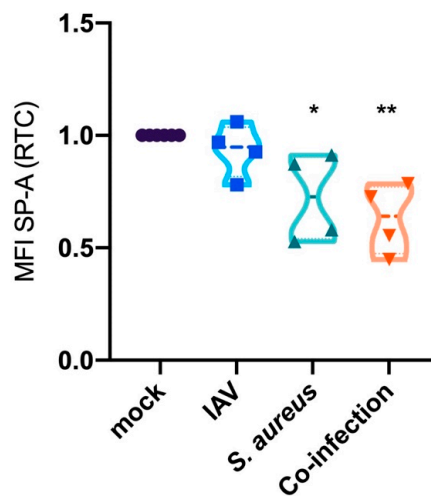


(B)

Figure 4. Cont.



(C)



(D)

Figure 4. The human alveolus-on-a-chip model was infected with *S. aureus* and/or IAV. (A) By using an SEM, it was possible to visualize *S. aureus* (red arrow) and IAV during the budding process (blue arrow), magnification $\times 10,000$, scale bar represents $1 \mu\text{m}$. (B) $\text{TNF-}\alpha$ (pg/mL) is upregulated and released into the supernatant during *S. aureus* mono- and co-infection measured in pg/mL. (C) Immunofluorescence staining of the epithelial cell side of the human alveolus-on-a-chip model shows SP-A staining (red) of mock infected, influenza virus, *S. aureus* and co-infected scenarios. Scale bar represents $50 \mu\text{m}$. The quantification of the SP-A staining (measured as mean-fluorescence intensity, MFI) reveals decreased intracellular protein levels for *S. aureus* mono- and co-infection (D). Mock-treated cells obtained the same medium and treatment as infected cells without the pathogen. Ordinary one-way ANOVA, Tukey's multiple comparison, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

3.3. *S. aureus* Downregulates SP-A Expression in a Murine Model of Pneumonia

Finally, to reproduce the results obtained in the cell-culture systems in an *in vivo* murine lung infection model, we established a pneumonia model and infected the mice with IAV, *S. aureus* or with both pathogens. After day 4 mice were sacrificed and the bacterial counts in the lung tissue were determined. Furthermore, the mRNA-expression of SP-A was quantified.

Our results show a high viral load (PFU/mL) 4 days p.i. (Figure 5A). Similarly, bacterial infection resulted in detectable CFUs within the lung tissue of the mouse (Figure 5B). Comparable to our *in vitro* results, we could clearly show that the SP-A expression within the bacterial mono- and co-infection was down-regulated four days after infection, whereas IAV did not cause a down-regulation in SP-A expression (Figure 5C). To further analyze the effect of viral and/or bacterial infection in the murine model system, we performed histopathological staining of the lung tissue. In mock-treated mice we recognized a fine and healthy alveolar structure. In infected animals, we detected an inflammatory infiltration of the alveolar structures that was caused by a bacterial, viral or co-infection (Figure 5D). These results indicate that infections can trigger lung inflammation by different mechanisms that can be dependent (*S. aureus* infection) or independent (IAV infection) on SP-A expression.

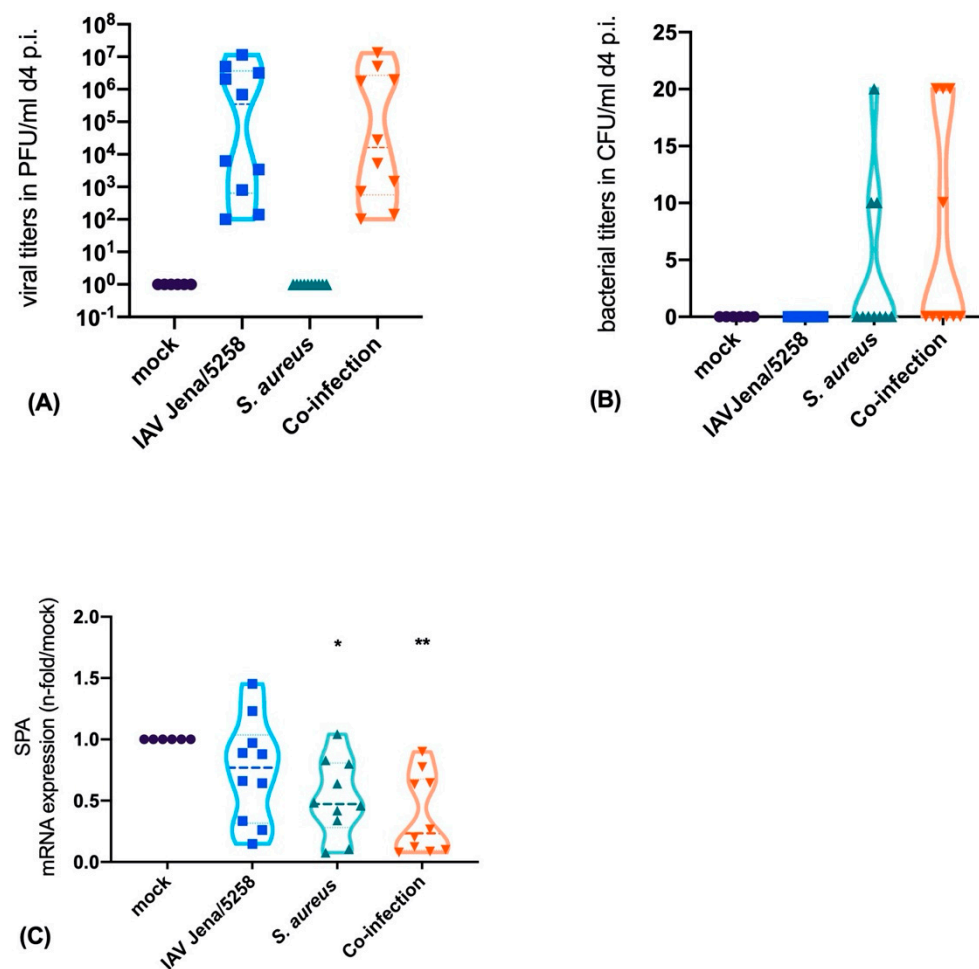


Figure 5. Cont.

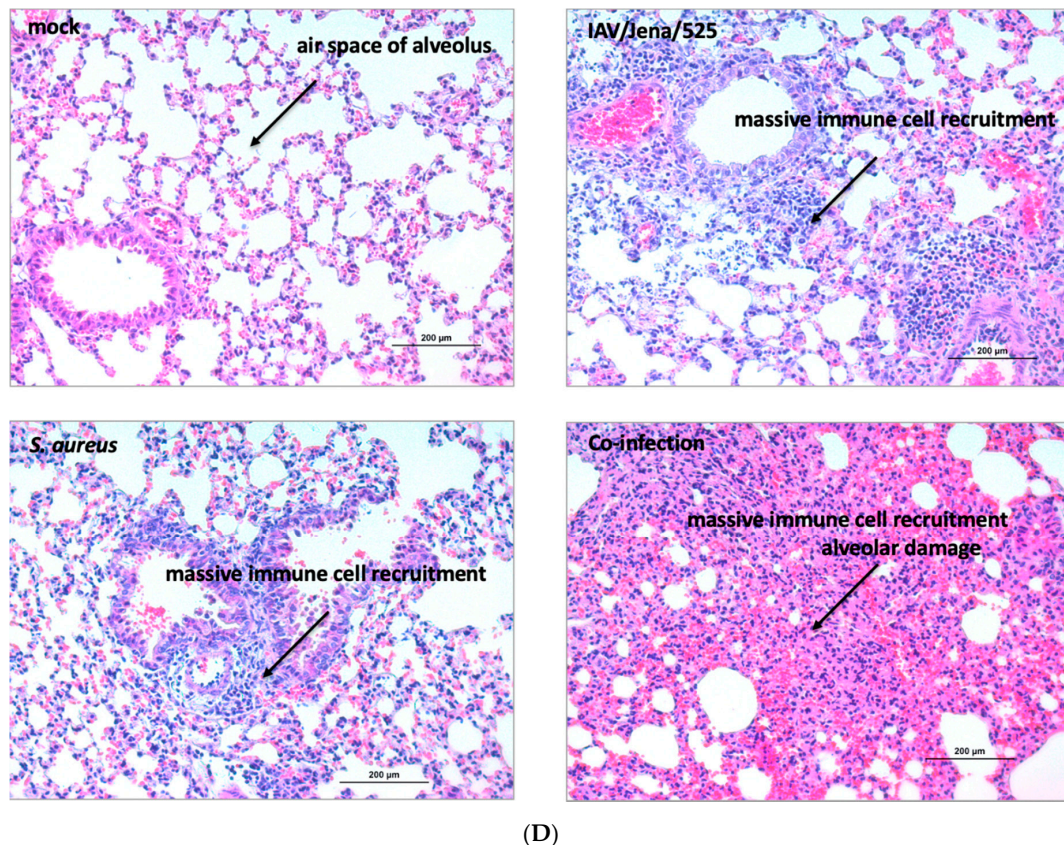


Figure 5. Murine model of *S. aureus* pneumonia showing viral titers (A) as well as *S. aureus* colony-forming units (CFUs) (B) caused by HA-D222-mpJena/5258, *S. aureus*, and co-infection. Downregulation of SP-A mRNA expression is mainly caused by bacterial mono- and co-infection (C). 100x magnification of the lung of C57bl/6 mice, HE-staining, mock-treated without any inflammatory infiltrates, and IAV, *S. aureus* and co-infection of the lung with pro-inflammatory infiltrates (D). Mock-treated mice obtained the same medium and treatment as infected mice without the pathogen. Ordinary one-way ANOVA, Tukey’s multiple comparison, * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

4. Discussion

Secondary bacterial pneumonia is one of the main reasons for increased morbidity and death rates after IAV infections. Apart from the pathogen load caused by the super-infection, the dysregulated immune response is also involved in the severe outcome of concomitant bacterial and viral infections. The pulmonary surfactant plays an important role as the first line of defense. The aim of our study was to elucidate whether a viral/bacterial co-infection has an impact on SP-A expression, the major surfactant protein.

SP-A fulfils many functions in the innate immune host defense. It regulates the inflammatory chemotaxis via the collagen-like region which induces an increased macrophage migration. Furthermore, SP-A is able to enhance phagocytosis as well as killing by macrophages and neutrophils via agglutination and opsonization of pathogens [14].

The deficiency of surfactant proteins can lead to various diseases. First of all, in premature infants, the insufficient surfactant production causes neonatal respiratory distress syndrome (RDS) [32]. A decreased SP-A level in amniotic fluid of the mother seems to be associated with an increased risk for the infant to be born with RDS [33]. Furthermore, infants with RDS have decreased SP-A level in tracheal aspirates [34]. There are two therapeutic approaches in imminent premature birth. The prenatal administration of corticosteroids, particularly Betamethasone, accelerates lung maturation [35] and increases the amount of surfactant [36,37] and especially SP-A and SP-B [38] in the fetal lung. The

second therapy strategy is the postnatal administration of surfactant [39]. Early administration of surfactant reduces the risk of pneumothorax and decreases mortality rates in preterm children [40]. Particularly the combined use of corticosteroids and surfactant therapy improves the outcome of infants with RDS [41].

Furthermore, the adult acute respiratory distress syndrome (ARDS) is also associated with a decreased amount of SP-A and surfactant phospholipids [42]. In agreement with this result patients with respiratory failure aggravated by sepsis also had a decreased surfactant level [43] indicating that infections can worsen the already low surfactant amount in patients with ARDS. Additionally, decreased SP-A levels were found in the bronchoalveolar lavage (BAL) of patients with pneumonia and without ARDS [44,45].

These examples demonstrate the great importance of a sufficient surfactant level in the lung and also the possibility to improve the lung function by external surfactant administration during a state of deficiency.

S. aureus disposes of extracellular proteases with a wide variety of virulence-associated functions. Here, metallo-, cysteine and serine protease lead to tissue degradation and interference of the host immune response. The protease sspA was described as the most efficient in degrading SP-A, even in a nanomolar concentration [23]. The direct effect of extracellular *S. aureus* proteases impairs the bacterial clearance and results in enhanced adherence and invasion of *S. aureus* to epithelial cells [21]. Additionally, surfactant proteins affect IAV infection [12]. However, an interfering effect of IAV infection on SP-A has not been described.

The regulation of SP-A is dependent on cytokines, in particular on TNF- α . TNF- α is capable of altering the mRNA level of SP-A via the phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinases [46,47]. As a consequence, an increased TNF- α level during an *S. aureus* infection hampers the function of SP-A. It is well known that *S. aureus* infections lead to a high release of TNF- α , in particular originating from immune cells, such as macrophages. Yet, TNF- α expression was not increased upon IAV infection in immune cells within the present experimental setting.

Although SP-A is mainly produced by alveolar-epithelial type II cells, other cell types, such as endothelial and immune cells, are in close contact with each other within the alveolus. The different cell types interact via cytokines and influence each other, which cannot be reproduced in vitro in a mono-cell culture system. Consequently, the response to infection in the lung is highly complex and requires appropriate model systems where different cell types interact with each other. Frequently used models to study infections are mice. Here, the infection can be analyzed in the complete organ, including damages in the alveolar structures. Yet, the mice models have some disadvantages. (i) The cells are of murine origin and in particular immune functions can largely differ from human cells. For example, the action of defined bacterial toxins (e.g., superantigens and leucocidins) can be very species-specific and largely restricted to human cells [48–50]. (ii) In the murine model it is difficult to attribute the host response to a defined cell type. To counter these disadvantages, we recently published a human-alveolus-on-a-chip model that is composed of defined cell types (epithelial, endothelial and immune cells) of human origin [25].

By combining the different model systems in our present study, we demonstrate that *S. aureus* reduces SP-A protein levels, as *S. aureus* expresses the cysteine protease sspA which is able to cleave SP-A [21]. However, neither IAV nor *S. aureus* directly affects the mRNA expression of SP-A in NCI-H441 mono-cell culture, indicating that bacterial and viral pathogens do not affect the SP-A expression within the epithelial cells. Furthermore, our results demonstrate that TNF- α is a strong inhibitor of SP-A mRNA-expression. Bacterial mono- or co-infection strongly induce the expression of TNF- α , in particular in hMdm cells. By contrast, IAV infection has only a minor effect on TNF- α synthesis, which can be explained by the fact that IAV is inhibited by TNF- α and therefore TNF- α is disadvantageous for the survival of the virus particles [51]. The interaction of epithelial, endothelial and immune cells within the human alveolus-on-a-chip model demonstrates high amounts of TNF- α in

response to bacterial infection. Finally, through MFI quantification we could demonstrate that bacterial infection significantly decreased intracellular SP-A protein levels.

Additionally, we have performed in vivo studies. Mice were infected with IAV, *S. aureus* or both pathogens in the lung that caused inflammation in all cases. In line with our in vitro results, we could clearly demonstrate that the SP-A mRNA expression was down-regulated, particularly in the lung tissue of the bacterial-infected mice.

Our results show that beside the direct effect of *S. aureus* leading to the cleavage of extracellular SP-A, there is an indirect effect based on infection via the cytokine production, notably by TNF- α . During infection, macrophages are one of the main sources for elevated TNF- α levels that have already been described to lower mRNA levels of SP-A.

Therefore, we concluded that an interaction of macrophages and alveolar epithelial cells decrease SP-A mRNA levels. These data demonstrate that the analysis of infection processes requires the use of sophisticated model systems that are based on various human cells and mimic the organ system.

5. Conclusions

Pneumonia is the leading cause of morbidity and mortality worldwide and viral/bacterial co-infection worsens the severity of the disease. The innate immune response is a crucial part of the defense against these pathogens. Surfactant proteins are a part of this mechanism and have a major effect on the alveolar homeostasis.

Our study investigated the impact of IV and/or *S. aureus* infection on the SP-A expression in vitro and in vivo. We can show that complex interactions of epithelial cells and immune cells result in the down-regulation of SP-A mRNA expression. Furthermore, bacterial mono- and super-infections reduce the SP-A expression in a murine model which might contribute to the severe outcome of bacterial pneumonia.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/8/4/577/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, S.D.-E. and B.L.; methodology, S.D.-E., F.H.; software, E.S., S.D.-E.; validation, E.S. and S.D.-E., B.L., M.S. (Michaela Schmidtke) and C.E.; formal analysis, S.D.-E. and E.S., F.H.; investigation, E.S., Z.C., K.R., V.V., K.F.H., S.N., F.S., B.G., M.K., M.S. (Michael Schacke), A.S.M. and M.T.F.; resources, B.L. and C.E., R.H.; data curation, S.D.-E.; writing—original draft preparation, E.S. and S.D.-E.; writing—review and editing, E.S., S.D.-E., A.S.M. and B.L.; visualization, S.N., E.S., K.R. and S.D.-E.; supervision, S.D.-E., C.E. and B.L.; project administration, S.D.-E.; funding acquisition, S.D.-E. and B.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors further acknowledge the support of this work by a grant from the IZKF (ACSP01) (S.D.E), the German Federal Institute for Risk Assessment (grant no. FKZ 1328-545), the Center for Sepsis Control and Care (Federal Ministry of Education and Research (BMBF), Germany, FKZ 01EO1502), InfectoGnostics Forschungscampus Jena (grant no 13GW0096D, 'Innovative Diagnostik für Pneumonien bei Immunsuppression') the Deutsche Forschungsgemeinschaft (LO 1618/6-1) and by internal funding from the Jena University Hospital. This work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft through the Cluster of Excellence "Balance of the Microverse" under Germany's Excellence Strategy – EXC 2051 – Project-ID 390713860 and by the European Commission through Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA) Innovative Training Network EUROoC (grant no. 812954) to A.S.M. the Collaborative Research Center PolyTarget 1278 from DFG project number 316213987 "Polymer-based nanoparticle libraries for targeted anti-inflammatory strategies" Project Z01 to M.T.F. Additionally, this work was supported by the Leibniz ScienceCampus InfectoOptics Jena, financed by the funding line Strategic Networking of the Leibniz Association (M.T.F.).

Acknowledgments: We thank Elke Teuscher for supplying umbilical cords for HUVEC isolation and the excellent technical work regarding the preparation. Furthermore, we thank Martina Müller for the excellent histopathological preparation and laboratory assistance.

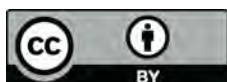
Conflicts of Interest: KR is CEO of Dynamic42 GmbH. KR and ASM are both shareholders of Dynamic42. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships considered as a potential conflict of interest.

References

1. Taubenberger, J.K.; Morens, D.M. The pathology of influenza virus infections. *Annu. Rev. Pathol.* **2008**, *3*, 499–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lowy, F.D. Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 520–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Strieter, R.M.; Belperio, J.A.; Keane, M.P. Cytokines in innate host defense in the lung. *J. Clin. Investig.* **2002**, *109*, 699–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Strieter, R.M.; Belperio, J.A.; Keane, M.P. Host innate defenses in the lung: The role of cytokines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2003**, *16*, 193–198. [[CrossRef](#)]
5. Wright, J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 58–68. [[CrossRef](#)]
6. Wright, J.R. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 931–962. [[CrossRef](#)]
7. Kishore, U.; Greenhough, T.J.; Waters, P.; Shrive, A.K.; Ghai, R.; Kamran, M.F.; Bernal, A.L.; Reid, K.B.; Madan, T.; Chakraborty, T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: Structure, function and receptors. *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 1293–1315. [[CrossRef](#)]
8. Han, S.; Mallampalli, R.K. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **2015**, *12*, 765–774. [[CrossRef](#)]
9. Benne, C.A.; Kraaijeveld, C.A.; van Strijp, J.A.; Brouwer, E.; Harmsen, M.; Verhoef, J.; van Golde, L.M.; van Iwaarden, J.F. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: Binding and neutralization. *J. Infect. Dis.* **1995**, *171*, 335–341. [[CrossRef](#)]
10. Geertsma, M.F.; Nibbering, P.H.; Haagsman, H.P.; Daha, M.R.; van Furth, R. Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of Staphylococcus aureus by monocytes. *Am. J. Physiol.* **1994**, *267*, L578–L584. [[CrossRef](#)]
11. Bouvier, N.M.; Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **2008**, *26* (Suppl. S4), D49–D53. [[CrossRef](#)]
12. Hsieh, I.N.; De Luna, X.; White, M.R.; Hartshorn, K.L. The role and molecular mechanism of action of surfactant protein D in innate host defense against influenza A virus. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sever-Chroneos, Z.; Krupa, A.; Davis, J.; Hasan, M.; Yang, C.H.; Szeliga, J.; Herrmann, M.; Hussain, M.; Geisbrecht, B.V.; Kobzik, L.; et al. Surfactant protein A (SP-A)-mediated clearance of Staphylococcus aureus involves binding of SP-A to the staphylococcal adhesin eap and the macrophage receptors SP-A receptor 210 and scavenger receptor class A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 4854–4870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wispe, J.R.; Clark, J.C.; Warner, B.B.; Fajardo, D.; Hull, W.E.; Holtzman, R.B.; Whitsett, J.A. Tumor necrosis factor- α inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J. Clin. Investig.* **1990**, *86*, 1954–1960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Islam, K.N.; Mendelson, C.R. Potential role of nuclear factor κ b and reactive oxygen species in camp and cytokine regulation of surfactant protein-a gene expression in lung type II cells. *Mol. Endocrinol.* **2002**, *16*, 1428–1440. [[PubMed](#)]
16. Ito, Y.; Mason, R.J. The effect of interleukin-13 (IL-13) and interferon- γ (IFN- γ) on expression of surfactant proteins in adult human alveolar type II cells in vitro. *Respir. Res.* **2010**, *11*, 157. [[CrossRef](#)]
17. Väyrynen, O.; Glumoff, V.; Hallman, M. Regulation of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2002**, *282*, L803–L810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, L.; Wang, C.C. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.* **2014**, *13*, 138–152. [[CrossRef](#)]
19. Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **2004**, *25*, 677–686. [[CrossRef](#)]
20. Gong, J.H.; Sprenger, H.; Hinder, F.; Bender, A.; Schmidt, A.; Horch, S.; Nain, M.; Gemsa, D. Influenza A virus infection of macrophages. Enhanced tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene expression and lipopolysaccharide-triggered TNF- α release. *J. Immunol.* **1991**, *147*, 3507.
21. Cui, W.; Morrison, D.C.; Silverstein, R. Differential tumor necrosis factor α expression and release from peritoneal mouse macrophages in vitro in response to proliferating gram-positive versus gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 4422–4429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Oliveira, D.; Borges, A.; Simões, M. Staphylococcus aureus toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins* **2018**, *10*, 252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Kantyka, T.; Pyrc, K.; Gruca, M.; Smagur, J.; Plaza, K.; Guzik, K.; Zeglen, S.; Ochman, M.; Potempa, J. Staphylococcus aureus proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung. *J. Innate Immun.* **2013**, *5*, 251–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Raasch, M.; Rennert, K.; Jahn, T.; Peters, S.; Henkel, T.; Huber, O.; Schulz, I.; Becker, H.; Lorkowski, S.; Funke, H.; et al. Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions. *Biofabrication* **2015**, *7*, 015013. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Deinhardt-Emmer, S.; Rennert, K.; Schicke, E.; Cseresnyes, Z.; Windolph, M.; Nietzsche, S.; Heller, R.; Siwczak, F.; Haupt, K.F.; Carlstedt, S.; et al. Co-infection with Staphylococcus aureus after primary influenza virus infection leads to damage of the endothelium in a human alveolus-on-a-chip model. *Biofabrication* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rennert, K.; Heisig, K.; Groeger, M.; Wallert, M.; Funke, H.; Lorkowski, S.; Huber, O.; Mosig, A.S. Recruitment of CD16(+) monocytes to endothelial cells in response to LPS-treatment and concomitant TNF release is regulated by CX3CR1 and interfered by soluble fractalkine. *Cytokine* **2016**, *83*, 41–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Seidel, N.; Sauerbrei, A.; Wutzler, P.; Schmidtke, M. Hemagglutinin 222D/G polymorphism facilitates fast intra-host evolution of pandemic (H1N1) 2009 influenza A viruses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e104233. [[CrossRef](#)]
28. Manchanda, H.; Seidel, N.; Krumbholz, A.; Sauerbrei, A.; Schmidtke, M.; Guthke, R. Within-host influenza dynamics: A small-scale mathematical modeling approach. *Bio Syst.* **2014**, *118*, 51–59. [[CrossRef](#)]
29. Tuchscher, L.; Medina, E.; Hussain, M.; Volker, W.; Heitmann, V.; Niemann, S.; Holzinger, D.; Roth, J.; Proctor, R.A.; Becker, K.; et al. Staphylococcus aureus phenotype switching: An effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol. Med.* **2011**, *3*, 129–141. [[CrossRef](#)]
30. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e45. [[CrossRef](#)]
31. Bloes, D.A.; Haasbach, E.; Hartmayer, C.; Hertlein, T.; Klingel, K.; Kretschmer, D.; Planz, O.; Peschel, A. Phenol-soluble modulins contribute to influenza A virus-associated staphylococcus aureus pneumonia. *Infect. Immun.* **2017**, *85*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Joshi, S.; Kotecha, S. Lung growth and development. *Early Hum. Dev.* **2007**, *83*, 789–794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Katyal, S.; Amenta, J.; Singh, G.; Silverman, J. Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1984**, *148*, 48–53. [[CrossRef](#)]
34. Chida, S.; Phelps, D.S.; Cordle, C.; Soll, R.; Floros, J.; Taeusch, H.W. Surfactant-associated proteins in tracheal aspirates of infants with respiratory distress syndrome after surfactant therapy. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1988**, *137*, 943–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liggins, G.C.; Howie, R.N. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* **1972**, *50*, 515–525. [[PubMed](#)]
36. deLemos, R.A.; Shermeta, D.W.; Knelson, J.H.; Kotas, R.; Avery, M.E. Acceleration of appearance of pulmonary surfactant in the fetal lamb by administration of corticosteroids. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1970**, *102*, 459–461. [[PubMed](#)]
37. Kotas, R.V.; Avery, M.E. Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. *J. Appl. Physiol.* **1971**, *30*, 358–361. [[CrossRef](#)]
38. Guarino, N.; Oue, T.; Shima, H.; Puri, P. Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *J. Pediatr. Surg.* **2000**, *35*, 1468–1473. [[CrossRef](#)]
39. Konishi, M.; Fujiwara, T.; Naito, T.; Takeuchi, Y.; Ogawa, Y.; Inukai, K.; Fujimura, M.; Nakamura, H.; Hashimoto, T. Surfactant replacement therapy in neonatal respiratory distress syndrome. A multi-centre, randomized clinical trial: Comparison of high- versus low-dose of surfactant TA. *Eur. J. Pediatr.* **1988**, *147*, 20–25. [[CrossRef](#)]
40. Rojas-Reyes, M.X.; Morley, C.J.; Soll, R. Prophylactic versus selective use of surfactant in preventing morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**. [[CrossRef](#)]
41. Jobe, A.H.; Mitchell, B.R.; Gunkel, J.H. Beneficial effects of the combined use of prenatal corticosteroids and postnatal surfactant on preterm infants. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1993**, *168*, 508–513. [[CrossRef](#)]
42. Gregory, T.; Longmore, W.; Moxley, M.; Whitsett, J.; Reed, C.; Fowler, A.R.; Hudson, L.; Maunder, R.; Crim, C.; Hyers, T. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Investig.* **1991**, *88*, 1976–1981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Pison, U.; Obertacke, U.; Brand, M.; Seeger, W.; Joka, T.; Bruch, J.; Schmit-Neuerburg, K. Altered pulmonary surfactant in uncomplicated and septicemia-complicated courses of acute respiratory failure. *J. Trauma* **1990**, *30*, 19–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Baughman, R.P.; Sternberg, R.I.; Hull, W.; Buchsbaum, J.A.; Whitsett, J. Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1993**, *147*, 653–657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. LeVine, A.M.; Lotze, A.; Stanley, S.; Stroud, C.; O'Donnell, R.; Whitsett, J.; Pollack, M.M. Surfactant content in children with inflammatory lung disease. *Crit. Care Med.* **1996**, *24*, 1062–1067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Miakotina, O.L.; Snyder, J.M. TNF- α inhibits SP-A gene expression in lung epithelial cells via p38 MAPK. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **2002**, *283*, L418–L427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Whitsett, J.A.; Glasser, S.W. Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **1998**, *1408*, 303–311. [[CrossRef](#)]
48. Holzinger, D.; Geldon, L.; Mysore, V.; Nippe, N.; Taxman, D.J.; Duncan, J.A.; Broglie, P.M.; Marketon, K.; Austermann, J.; Vogl, T.; et al. Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin induces an inflammatory response in human phagocytes via the NLRP3 inflammasome. *J. Leukoc. Biol.* **2012**, *92*, 1069–1081. [[CrossRef](#)]
49. Loffler, B.; Niemann, S.; Ehrhardt, C.; Horn, D.; Lanckohr, C.; Lina, G.; Ludwig, S.; Peters, G. Pathogenesis of Staphylococcus aureus necrotizing pneumonia: The role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2013**, *11*, 1041–1051. [[CrossRef](#)]
50. Niemann, S.; Ehrhardt, C.; Medina, E.; Warnking, K.; Tuchscher, L.; Heitmann, V.; Ludwig, S.; Peters, G.; Loffler, B. Combined action of influenza virus and Staphylococcus aureus panton-valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. *J. Infect. Dis.* **2012**, *206*, 1138–1148. [[CrossRef](#)]
51. Seo, S.H.; Webster, R.G. Tumor necrosis factor alpha exerts powerful anti-influenza virus effects in lung epithelial cells. *J. Virol.* **2002**, *76*, 1071–1076. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

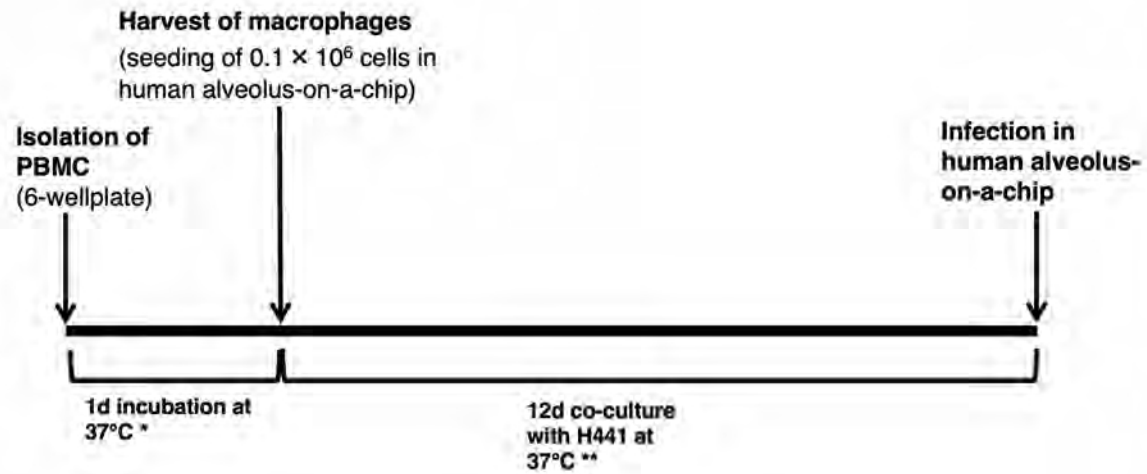


Figure S1. After the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and the cultivation on 6-wellplates for one day with * RPMI (containing 10% autologous serum, 10 ng/ml M-CSF, 10 ng/ml GM-CSF and penicillin/streptomycin) the macrophages were harvested and seeded on the epithelial chamber with 0.1×10^6 cells in the human alveolus-on-a-chip model. After 12 days of co-culture with ** RPMI (containing 20% autologous serum, 10 ng/ml GM-CSF and dexamethason) the infection of the human alveolus-on-a-chip was performed.

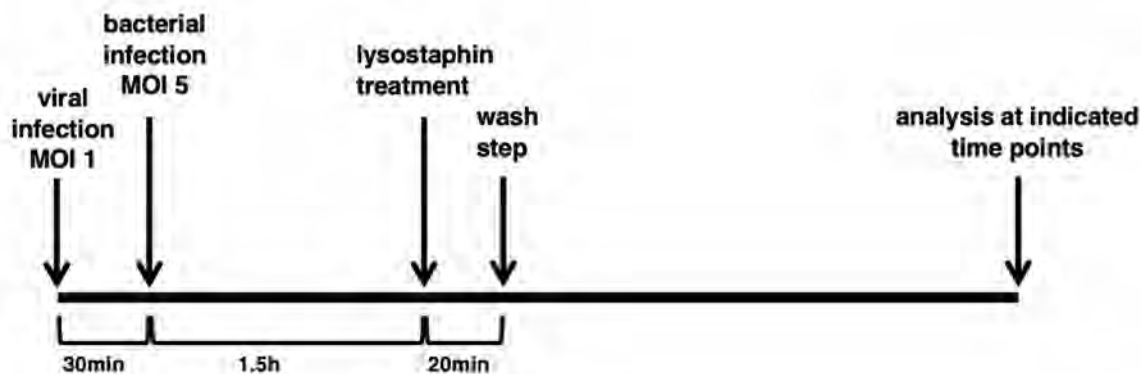


Figure S2. Overview of the infection procedure. The experiment begins with the viral infection of the cells by using the IV strain A/Puerto Rico/8 (MOI 1). Viral infection was conducted in RPMI (0.2% autologous human serum, 1 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $CaCl_2$) and incubated for 30 min at 37 °C without centrifugation. The bacterial infection was performed with RPMI/BA (1% human serum albumin (HSA), 1mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)). After the bacterial infection, cells were incubated with bacteria for 90 min at 37 °C and 5% CO_2 . Afterward, the cells were washed. To eliminate the non-internalized bacteria, cells were treated for 20 min with RPMI-medium containing lysostaphin at a concentration of 6 $\mu g/mL$ for the NCI-H441 mono-cell culture and 20 $\mu g/mL$ for the human alveolus-on-a-chip model. Subsequently, cells were washed with PBS and then incubated with RPMI for indicated time points at 37 °C with 5% CO_2 . For the co-infection scenarios, both pathogens were added to the cells. For this, first, the infection with IV strain A/Puerto Rico/8 (MOI 1) was performed, followed by the bacterial infection with *S. aureus*/USA300/WT (MOI 5).

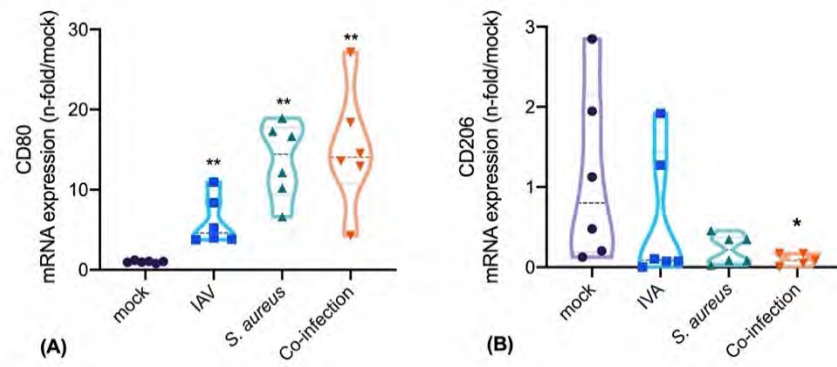


Figure S3. Human monocyte-derived macrophages (hMdm) were infected with IV A/Puerto Rico/8 (MOI 1), *S. aureus*/USA300/WT (MOI 5) or with both pathogens (co-infection). The mRNA expression of CD80 (A) was significantly higher after infection and the mRNA expression of CD206 (B) has been shown to be significantly lower within the co-infected cells. Mock-treated cells obtained the same medium and treatment as infected cells without the pathogen. Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

4 Diskussion

Pneumonien gehören zu den häufigsten zum Tode führenden Infektionserkrankungen in den Industrieländern (Ruuskanen et al., 2011). Eine besondere Stellung hat dabei die bakterielle Koinfektion einer vorrangegangenen Influenzainfektion (Iverson et al., 2011). Ein weitreichendes Verständnis der Mechanismen einer solchen Koinfektion ist unerlässlich. Da die Immunantwort zu großen Teilen spezies-spezifisch ist (Mestas and Hughes, 2004) und auch die Interaktion von Immunzellen und Nicht-Immunzellen eine wichtige Rolle spielt (Mairpady Shambat et al., 2015, Nguyen Hoang et al., 2012), ist die Entwicklung eines human-spezifischen Modells entscheidend. Die Dissertation beschreibt 1) ein in Jena entwickeltes dreidimensionales Modell, das genutzt wurde, um 2) in einem *in vitro* System die Wirkung der Koinfektion auf die Barrierefunktion humaner Zellen im Verbund zu untersuchen und 3) den möglichen Einfluss einer solchen Koinfektion auf das Surfactant Protein A zu ermitteln.

4.1 Etablierung eines human-spezifischen *in vitro* Modells

Um eine detaillierte Untersuchung der Pathomechanismen einer Koinfektion zu ermöglichen, sollte ein Modell mit alveolus-spezifischen Eigenschaften und Funktionen etabliert werden. Es sollte in der Lage sein, die Interaktionen verschiedener Zelltypen untereinander abzubilden und die komplexe Wechselwirkung zwischen Pathogen und Wirt widerzuspiegeln. Für die Kokultivierung der Zellen wurde der MOTiF Biochip verwendet, der zwei Kammern enthält, die durch eine durchlässige Membran getrennt sind (Raasch et al., 2015).

4.1.1 Zelllinien des hAC-Modells

I. Pneumozyten

Im hAC Modell wurde die Adenokarzinomzelllinie NCI-H441 verwendet, die zu den Typ-II-Pneumozyten gehört. Obwohl Typ-I-Pneumozyten 95% der Alveolarfläche ausmachen (Herzog et al., 2008), sind Typ-II-Pneumozyten vielseitiger. Sie bilden Mikrovilli aus (Wang et al., 2007), produzieren Surfactant (Herzog et al., 2008) und exprimieren Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, die die endotheliale Barriere verändern (Raasch et al., 2015) und die Einfluss auf Immunzellen wie Makrophagen und deren Migration haben (O'Brien et al., 1998, Chuquimia et al., 2013).

Die NCI-H441 exprimieren im hAC-Modell verschiedene Zytokine, unter anderen IL-1 β , IL-6 und IFN- γ , weiterhin Surfactant Protein A, barrierespezifische Marker wie E-Cadherin,

und sie bilden Mikrovilli unter Perfusionsbedingungen aus. Dadurch können die Zellen Funktionen der Pathogenabwehr und Immunzellaktivierung übernehmen. Die Zelllinie ist hervorragend etabliert für Infektionsmodelle und hat sich bisher als stabiles Werkzeug erwiesen, um Einsichten in die molekularen Mechanismen der viralen und bakteriellen Koinfektion zu gewinnen.

II. Endothelzellen

Endothelzellen kleiden das innere Lumen von Blutgefäßen aus und sind in der Lunge für eine intakte Barrierefunktion verantwortlich (Stevens et al., 2000). Die Endothelzellschicht des Modells wurde durch Nabelschnurendothelzellen (HUVECs) gebildet. Für eine bessere Vergleichbarkeit mit dem *in vivo* Zustand wurden die HUVECs des Modells unter Perfusionsbedingungen kultiviert. Durch Scherstress passen sich Endothelzellen morphologisch an (Flaherty et al., 1972) und weisen eine geringere Permeabilität auf (Kwei et al., 2004). Es kommt zur Reorganisation des Zytoskeletts (Tzima et al., 2005), einer erhöhten Expression von CAMs und somit zu einer verstärkten Monozytenadhäsion an das Gefäßendothel (Nagel et al., 1994). Untersuchungen von Raasch et al. der HUVECs im MOTiF Biochip zeigten die Gültigkeit dieser Ergebnisse auch für das hAC Modell (Raasch et al., 2015).

III. Makrophagen

Makrophagen sind für die pulmonale Immunantwort und Pathogenabwehr unerlässlich (Moldoveanu et al., 2009) und damit ein wichtiger Bestandteil in einem immunreaktiven *in vitro* Modell der Lunge. Die Alveolarmakrophagen (AM) wurden im Modell durch aus PBMCs gereiften Makrophagen nachgeahmt, die auf der Seite der Epithelzellen in das Modell eingebracht wurden.

AM sind angeborene Immunzellen und stammen von primitiven Vorläuferzellen ab, die während der Embryonalperiode im Dottersack zu finden sind. Bereits wenige Wochen nach der Geburt sind sie im Gewebe angesiedelt und zu AM ausdifferenziert (Allard et al., 2018). Die Gewebemakrophagen können den Makrophagenpool im Gewebe selbstständig aufrechterhalten und sind unabhängig von Blutmonozyten. Während einer Infektion oder massiven Löschung der AM, kann der Bestand jedoch auch durch Blutmonozyten aufgefüllt werden (Epelman et al., 2014, Gautier et al., 2012, Röszer, 2015). Da die Differenzierung der Makrophagen maßgeblich von ihrer Mikroumgebung abhängig ist, können sogar bereits vollständig ausdifferenzierte Makrophagen ihr Expressionsmuster neuen Umgebungsstimuli anpassen (Lavin et al., 2014). Ein essentieller Faktor für die Differenzierung zu AM ist GM-CSF (Epelman et al., 2014, Allard et al., 2018), das in den verwendeten Nähmedien stets

vorhanden war. Jedoch ist dieser Prozess noch nicht vollständig verstanden (Morales-Nebreda et al., 2015).

Zusätzlich zeigen viele Studien, dass sich die während einer Infektion rekrutierten und aus Blutmonozyten differenzierten AM von den gewebeständigen AM unterscheiden. Dieser Unterschied bezieht sich sowohl auf ihre Funktion (Allard et al., 2018), als auch auf ihr genetisches Expressionsmuster (Gautier et al., 2012). Es wurde bereits häufig berichtet, dass gewebeständige AM eine antiinflammatorische Wirkung haben, um eingedrungene Pathogene oder Partikel zu beseitigen, ohne eine Schädigung des Lungengewebes durch eine Inflammationsantwort hervorzurufen (Allard et al., 2018, Morales-Nebreda et al., 2015). Sie binden vermehrt mit SIRP- α an SP-A und D, was die Makrophagenaktivierung und die Phagozytose hemmt. Die während einer Infektion aus dem Blut rekrutierten Monozyten rufen eine starke Immunantwort mit einer erhöhten Produktion von Zytokinen und Chemokinen hervor (Morales-Nebreda et al., 2015). Diese Monozyten können somit als Vorläuferzellen von inflammatorischen Lungenmakrophagen gesehen werden (Gautier et al., 2012). Die verwendeten aus Monozyten abgeleiteten Makrophagen haben ein inflammatorisches Expressionsprofil und stellen somit geeignete Surrogate dar, um die Makrophagenfunktion in einem Lungeninfektionsmodell zu simulieren.

Eine Weiterentwicklung des Modells könnte daraus bestehen, dass, ähnlich wie am Beispiel von Gröger et al. dargestellt, die Makrophagen über den angelegten Medienfluss in das System eingebracht werden und somit die Rekrutierung dieser Zellen simuliert wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellen in der Lage sind, trotz des dynamischen Flusses in das System einzuwandern (Groger et al., 2016). Außerdem bilden die HUVECs im hAC Modell MCP-1, ein wichtiges Chemoattraktantprotein für Makrophagen (Epelman et al., 2014, Allard et al., 2018). Somit scheint dies eine gute Möglichkeit zu sein, sich weiter den physiologischen Bedingungen der Lunge anzupassen.

4.1.2 Der dynamische Fluss und die Kokultur mit Makrophagen erhöhen die Barriereintegrität

Eine intakte und stabile alveolär-endotheliale Barriere ist eine Grundvoraussetzung für die physiologische Lungenfunktion und eine effektive Pathogenabwehr (Dohle et al., 2018). Für die Entwicklung einer selektiven biologischen Barriere ist eine konfluente Zellschicht nötig, die apikal Zellverbindungen bildet. Mit zu den wichtigsten Zellverbindungsproteinen gehören die Cadherine und die Zonula occludens. Die Cadherine gewährleisten kalziumabhängig Zellkontakte in verschiedenen Geweben. Von Epithzellen wie Pneumozyten Typ II werden E-Cadherine exprimiert (Man et al., 2000). VE-Cadherine

dagegen sind typische vaskuläre Adhäsionsproteine. Bei einer Beschädigung der alveolär-endotheliale Barriere kann es zu einem kapillären Leck mit Einstrom von proteinreicher Flüssigkeit in die Alveolen kommen, was den Gasaustausch behindert (Iverson et al., 2011, Huertas et al., 2018), die Ausbreitung von pulmonalen Pathogenen begünstigt und die Stabilität des Epithels einschränkt (Man et al., 2000).

Es war von besonderer Bedeutung die Barrierebildung im hAC-Modell nachzuweisen, da durch die Poren der Membran ein ungehinderter Austausch von Stoffen und Molekülen möglich ist. Die Barriere wurde durch eine lückenlose Zellschicht nachgewiesen, welche Zellverbindungsproteine exprimiert. Sowohl VE-Cadherine als auch E-Cadherine waren in den entsprechenden Zellschichten zu finden. Außerdem exprimierten die NCI-H441 weiterhin das wichtige Zellverbindungsprotein Zonula occludens-1 (ZO-1). Gesteigert wurde die Barrierefunktion im hAC-Modell durch das Hinzufügen eines dynamischen Flusses und die Kokultivierung mit Makrophagen. Dies zeigte sich bei der Durchführung von Permeabilitätsassays und der Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER-Messungen).

Die Expression und Lokalisation von funktionellen barrierespezifischen Markern im hAC Modell sind mit denen des menschlichen Lungengewebes vergleichbar, wodurch das Modell eine deutliche Verbesserung zu den klassischen Monozellkulturen ist.

4.1.4 Stärken und Grenzen des hAC-Modells

Die für das hAC-Modell verwendeten HUVECs und PBMC sind primäre Zelllinien. Dies gilt jedoch nicht für die NCI-H441 Zelllinie. Aus den oben genannten Gründen, sind diese Zellen dennoch geeignet, um die Barriereintegrität, die Reaktion auf Pathogene und deren Einfluss auf SP-A, sowie die Zellinteraktion zu untersuchen. Es wird dennoch ein Ziel sein, primäre Alveolarepithelzellen für die Weiterentwicklung des Modells zu nutzen.

Weiterhin wurden bisher nur Makrophagen und ihre Interaktion mit anderen Zellen und Pathogenen im hAC Modell untersucht. Weitere wichtige Zellen im Alveolus sind die neutrophilen Granulozyten (Martin and Frevert, 2005, Moldoveanu et al., 2009). Gerade für die untersuchten Pathogen sind diese interessant, da der verwendete *S. aureus* Stamm PVL bildet. PVL ist in der Lage, Poren in den Zellwänden der neutrophilen Granulozyten zu bilden und kann dadurch nekrotisierende Pneumonien auslösen (Niemann et al., 2012). PVL wirkt spezie-spezifischen (Loffler et al., 2010), wodurch das Modell hervorragend geeignet wäre, um weitere Studien über den Einfluss von PVL auf das menschliche Lungengewebe zu untersuchen.

Ein Vorteil gegenüber Tierversuchen und Monozellkulturen ist die Möglichkeit, die Reaktion auf Pathogene einzeln im Alveolarraum oder auf Endothelseite durch die Überstände oder Immunfluoreszenz zu untersuchen. Die dadurch mögliche Beobachtung der Sekretion und Permeabilität der Zellen, sowie der Ausbreitung der Pathogene und der zellulären Interaktion zwischen Epithel, Endothel und Makrophagen bietet außergewöhnliche Versuchsbedingungen für Grundsatzstudien.

Das Modell ist weniger kostenintensiv und zeitaufwendig als Tierstudien und hat einen recht geringen Verbrauch an Reagenzien und biologischen Proben (Raasch et al., 2015). Es ist sehr flexibel, da verschiedene Parameter, wie beispielsweise die verwendeten Zellen oder die Flussrate, je nach Fragestellung angepasst werden können. Das Modell wurde ausschließlich mit menschlichen Zellen entworfen. Dadurch ist es möglich, anders als in den meisten Tierversuchen, die humanspezifischen Reaktionen zu untersuchen. Für Publikationen werden häufig Tiermodelle gefordert, da diese als proof-of-concept gelten. Es wurden Tierversuche für die vorliegende Arbeit genutzt, um die Gültigkeit der Ergebnisse des hAC Modells zu zeigen. Auch in Zukunft kann nicht vollständig auf Tierversuche verzichtet werden. Jedoch wird ihre Anzahl durch die Verwendung des hAC Modells deutlich reduziert werden.

Im hAC Modell können Infektionen sehr realistisch dargestellt werden. Durch die Verwendung von humanen Zellen ist außerdem ein besseres Verständnis der Physiologie und Pathologie der menschlichen Lunge möglich. Das Modell ist perspektivisch auch für Entwicklung von Therapiestrategien und für Toxizitätsstudien verwendbar.

4.2 Untersuchung der viral-bakteriellen Koinfektion am hAC-Modell

Immunreaktivität des Modells durch Interaktion der verschiedenen Zelltypen

Die Immunkompetenz des Modells wurde mittels LPS und lebenden Pathogenen überprüft. Durch LPS konnten sowohl für antiinflammatorische als auch proinflammatorische Zytokine erhöhte Spiegel gemessen werden, deren Expression jedoch maßgeblich von der Anwesenheit funktioneller Makrophagen abhängig war, die die residenten Zellen stimulierten. Eine weitere Reaktion auf LPS war die Erhöhung der Permeabilität der Zellbarriere in Abhängigkeit von der Kokultivierung mit Makrophagen. Dies liegt an den ausgeschütteten Zytokinen. Wie Raasch et al. schon zeigte, kommt es zu einer verminderten Integrität der endothelialen Barriere u.a. durch Stimulation mit TNF- α (Raasch et al., 2015), das durch LPS bei Kokultivierung mit Makrophagen signifikant erhöht war. Die von den

Zellen ausgeschütteten Zytokine haben somit Einfluss auf die Barriereintegrität. Vor allem Immunzellen können durch ihre Reaktion auf PAMPs eine signifikante Stimulation der residenten Zellen bewirken.

Zur Untersuchung der Zellreaktion und -interaktion auf lebende Pathogene wurden das Influenza Virus A/Puerto Rico/8 (H1N1) und der *S. aureus*/USA300/wild type (WT) verwendet. Dies ist ein MRSA Stamm, der vor allem in den USA zunehmend Probleme verursacht und PVL exprimiert (Kollef and Micek, 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass sich sowohl NCI-H441 Zellen als auch HUVECs durch das Virus infizieren lassen und dass das Virus in ihnen auch replizieren kann. Dazu wurde in einer Zellkultur eine Infektionskinetik durchgeführt und die virale mRNA durch qRT-PCR im hAC Modell gemessen. Auch *S. aureus* war in der Lage die NCI-H441 Zellen und die HUVECs zu infizieren. Dies war einerseits aus dem Internalisierungsassay ersichtlich und andererseits aus den CFUs, die ca. 2 h nach einer Antibiotikabehandlung gemessen werden konnten. Das lässt darauf schließen, dass sich die Bakterien während der Einwirkzeit der Antibiotika innerhalb der Zellen befunden haben. Als Vergleichsparameter zwischen der Einzel- und der Koinfektion wurden die Pathogenlast, die Zytokinausschüttung und die Barrierefunktion im Modell untersucht, da diese auch gleichzeitig Parameter für schwerwiegende Infektionen sind (Klemm et al., 2017, Gao et al., 2013, Lee et al., 2011, Yu et al., 2011, Loffler et al., 2013).

Die Pathogenlast von *S. aureus* ist während der Koinfektion erhöht

Es konnte sowohl über die Messung der CFUs als auch über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, dass die bakterielle Last während einer Koinfektion signifikant höher ist, als während einer Einzelninfektion. Dieses Ergebnis deckt sich mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen aus Zellkultur- und Tierversuchen (Warnking et al., 2015, Iverson et al., 2011). Eine Erhöhung des viralen Titers oder der viralen mRNA wurde nicht nachgewiesen, wie es u.a. bei Warnking et al. beschrieben wurde (Warnking et al., 2015). Dies liegt wahrscheinlich am experimentellen Setting. Da die Immunantwort während der ersten 6,5 h der Virusinfektion untersucht wurde, reichte die Zeit für eine vollständige virale Replikation wahrscheinlich nicht aus. Diese beträgt zwischen 6 h und 8 h (Dou et al., 2018).

Durch die Koinfektion kommt es zu einer verstärkten Inflammation

Eine im Vergleich zur Einzelninfektion verstärkte Zytokin- und Chemokinausschüttung ist typisch nach einer bakteriellen Superinfektion (Klemm et al., 2017, Jia et al., 2018). Auch im hAC Modell zeigten sich eindeutige Unterschiede in der Expression von Inflammationsmarkern sowohl auf der epithelialen wie auch auf der endothelialen Seite. So waren typische Zytokine und Chemokine wie IL-1 β , IL-6, IFN- γ oder MCP-1 durch die

Koinfektion deutlich erhöht. Durch eine vermehrte Zytokin- und Chemokinausschüttung werden Makrophagen vermehrt in das entzündete Gewebe rekrutiert und steigern die Inflamationsantwort (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Nourshargh and Alon, 2014). Eine überschießende Immunantwort kann zu einer verstärkten Schädigung der Lunge führen. Dazu gehören unter anderem Zellnekrosen und eine Beeinträchtigung der alveolär-endothelialen Barriere (Iverson et al., 2011).

Die Koinfektion reduziert die Endothelbarriere

Die Ergebnisse im hAC Modell zeigen deutlich, dass die Barriereintegrität des Endothels während einer Einzelinfektion stabil bleibt, jedoch durch die Koinfektion stark eingeschränkt ist. Darauf wiesen die verminderte Expression von VE-Cadherin, die Anzahl der *S. aureus* Partikel auf endothelialer Seite sowie die Messung der Barriereintegrität durch einen Permeabilitätsassay hin. Eine endotheliale Dysfunktion führt zu einem vaskulären Leck, was zu Inflamationsinfiltraten in der Lunge führt (Iverson et al., 2011, Jia et al., 2018). Dies wird als eine der Hauptursachen eines akuten Lungenversagen beziehungsweise eines ARDS gesehen (Huertas et al., 2018).

Weder die Infektion mit einem einzelnen noch mit beiden Pathogenen führte zu einer Veränderung der epithelialen Zellintegrität. Obwohl häufig beschrieben wurde, dass die Virusinfektion das Epithel beschädigt und somit Bindungsstellen für die Bakterien schafft (Morens et al., 2008, Siemens et al., 2017), konnte dies nicht im Modell bestätigt werden. Es wurde keine Abnahme der E-Cadherine oder ZO-1 festgestellt. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass das Virus keinen vollständigen Replikationszyklus durchläuft. Ein weiterer Grund ist womöglich ein größerer zeitlicher Versatz zwischen der Virusinfektion und der Koinfektion *in vivo* (Louria et al., 1959). Viele Mechanismen, zu denen u.a. auch die Schädigung des respiratorischen Epithels gehört, setzten erst nach 5 bis 7 Tagen ein oder verschlimmern sich nach dieser Zeit massiv (Rynda-Apple et al., 2015).

Die Resultate verdeutlichen den fatalen Einfluss der Koinfektion auf das Lungengewebe. Die Koinfektion von Bakterien und Viren führen im Vergleich zu der Einzelinfektion zu einer stärkeren Immunantwort. Dies betrifft die Zytokinexpression und den Verlust der endothelialen Barrierefunktion. Gemeinsam mit der erhöhten Pathogenlast durch *S. aureus* deuten diese Resultate darauf hin, dass der Wirt bei einer Koinfektion weniger gut in der Lage ist, die Infektion und die Immunantwort auf diese zu regulieren und zu kontrollieren. Das könnte ein Grund für das schlechte klinische Outcome bei Patienten mit sekundären Pneumonien sein. Die Zell-Zellinteraktionen und vor allem die verringerte Barriereintegrität während einer Infektion konnten erstmals im hAC Modell gezeigt werden und können nicht in Monozellkulturen reproduziert werden.

4.3 Untersuchung des Einflusses der Koinfektion auf Surfactant Protein A

SP-A gehört zu den Verteidigungsmechanismen der Lunge gegen eindringende Pathogene. Es verstärkt u.a. die Phagozytose und Abtötung durch Makrophagen über Agglutination und das Opsonieren der Pathogene (Wright, 2005, Geertsma et al., 1994). Eine Reduktion des SP-A hat somit schwerwiegende Folgen für die Lunge. Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer viral-bakteriellen Koinfektion auf die Expression von SP-A zu untersuchen. Ein Mangel an Surfactant kann bei verschiedenen Krankheiten eine Rolle spielen. Bei Frühgeborenen z.B. führt eine unzureichende Surfactant-Produktion zum Respiratory Distress Syndrom (RDS) (Joshi and Kotecha, 2007). Das Adult Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) ist ebenfalls mit verminderten Mengen an SP-A und Phospholipiden assoziiert (Gregory et al., 1991). Ein Einfluss von Infektionen auf SP-A konnten v.a. für bakterielle Pneumonien gezeigt werden. Dabei schienen gram-positive Pathogene eine stärkere Reduktion hervorzurufen als gram-negative Bakterien (Baughman et al., 1993, LeVine et al., 1996). In Tiermodellen konnte eine exogene Surfactantgabe die Infektion abschwächen und das Überleben der Tiere verbessern (So et al., 1991, LeVine et al., 2002). Diese Beispiele zeigen den hohen Stellenwert, den ein ausreichendes Surfactant-Level in der Lunge hat und auch die Möglichkeit einer Verbesserung der Lungenfunktion durch externe Surfactant-Administration während eines Mangelzustandes.

Einen Einfluss auf SP-A wurde u.a. für *S. aureus* (Kantyka et al., 2013) und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (Mariencheck et al., 2003). *S. aureus* besitzt eine Vielzahl an extrazellulären Proteasen, die zu seiner Virulenz beitragen. Dazu gehören Metall-, Cystein- und Serinproteasen, die zu Gewebezerstörungen führen und die Immunantwort des Wirts hemmen (Coates et al., 2014). Die Cysteinprotease ssPA ist sogar in nanomolaren Konzentrationen in der Lage SP-A zu spalten und zu inaktivieren. Durch die gehemmte antimikrobielle Aktivität des Proteins ist die Phagozytose durch Makrophagen herabgesetzt und die Kolonisation des Respirationstraktes erleichtert (Kantyka et al., 2013). Obwohl SP-A IAV hemmt (Hsieh et al., 2018), wurde bisher nicht beschrieben, dass IAV Einfluss auf die SP-A Konzentration hat. SP-A wird weiterhin durch verschiedene Zytokine beeinflusst. Insbesondere TNF- α spielt dabei eine wichtige Rolle. TNF- α senkt die SP-A mRNA über die Phosphorylierung von p38MAPK (Miakotina and Snyder, 2002, Whitsett and Glasser, 1998). Während einer Infektion sind besonders Makrophagen verantwortlich für die Ausschüttung von TNF- α (Sica et al., 2015, Zhang and Wang, 2014).

Studien zu SP-A wurden bisher häufig an Typ-II-Pneumozyten in Zellkulturen oder an Mäusen durchgeführt. Obwohl SP-A hauptsächlich von Typ-II-Pneumozyten gebildet wird, stehen diese in engem Kontakt mit Endothelzellen und Immunzellen und interagieren mit diesen z.B. über Zytokine. Weiterhin wurde berichtet, dass Mausserum im Gegensatz zu humanem Serum in der Lage ist, ssPA zu spalten (Kantyka et al., 2013). Es wird außerdem vermutet, dass sich Bildung und Prozessierung von Surfactant zwischen Menschen und Nagetieren unterscheiden (Herzog et al., 2008). Daher ist die Verwendung von menschlichen Zellen in der Interaktion mit Immunzellen für die Untersuchung des Einflusses der Koinfektion auf SP-A von großer Bedeutung. Um die Gültigkeit der durch das hAC-Modell gewonnenen Ergebnisse für SP-A zu prüfen, wurden dennoch Versuche in Monozellkulturen und auch Tierversuche durch ein Tierversuchsteam durchgeführt.

***S. aureus* senkt die Proteinkonzentration von SP-A während TNF- α die mRNA-Expression reduziert.**

In den Versuchen zeigte sich, dass *S. aureus* 18 h p.i. die SP-A Proteinkonzentration in der Monozellkultur senkt. Der Grund dafür war die Serinprotease ssPA, die von dem verwendeten Bakterienstamm exprimiert wird. In einer Studie von Kantyka et al. beeinträchtigte ssPA das Surfactant Protein A bereits nach 45 min (Kantyka et al., 2013). Die Diskrepanz zu dieser Studie liegt womöglich am experimentellen Aufbau. Die Zeitangabe der Studie bezog sich auf das Hinzufügen von aktiviertem ssPA zu isoliertem SP-A, während die durchgeführten Versuche die tatsächliche Interaktion zwischen den lebenden Pathogenen und den Zellen untersuchen. Weder *S. aureus* noch IAV haben einen direkten Einfluss auf die mRNA-Expression von SP-A in der Monozellkultur. Jedoch wurde durch Stimulation mit TNF- α eine signifikante Reduktion des mRNA-Levels erreicht.

Im komplexen Zellmodell kommt es zu einem kombinierten Effekt der *S. aureus* Protease ssPA und dem durch Makrophagen ausgeschütteten TNF- α .

TNF- α wird während einer Infektion von verschiedenen Zelltypen ausgeschüttet, u.a. von proinflammatorischen M1 Makrophagen (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Martinez and Gordon, 2014). Die im hAC-Modell verwendeten Makrophagen exprimierten nach der Infektion ein erhöhtes mRNA-Level des M1-Marker CD80. Weiterhin war die mRNA-Expression des M2 Markers CD206 durch die Koinfektion signifikant verringert. Die bakteriellen Infektionen führten im Gegensatz zur viralen Infektion zu einer massiven TNF- α Ausschüttung. Diese Resultate legen nahe, dass die Koinfektion der stärkste inflammatorische Stimulus für die Makrophagen ist, aber einen Polarisierungstyp lässt sich daraus nicht ableiten. Dies war auch nicht Ziel der Bestimmung der M1/M2 Marker. Makrophagen besitzen eine außerordentliche Plastizität, mit der sie sich ihren

Umgebungsbedingungen anpassen. Daher sind *in vivo* häufig nur Übergangsstadien zu finden (Mantovani et al., 2004, Zhang and Wang, 2014, Sica et al., 2015). Außerdem ist die Makrophagenpolarisation mit nur wenigen Markern nicht zu bestimmen (Mosser and Edwards, 2008). Die ermittelten Marker dienen daher eher einer Orientierung als Bestimmung des Polarisierungstyps.

Im hAC-Modell führt die bakterielle Mono- oder Koinfektion zu einer starken TNF- α Ausschüttung. Die virale Infektion hatte einen geringeren Effekt auf TNF- α . Die NCI-H441 wiesen in der Monozellkultur keine signifikant erhöhten TNF- α Werte durch die Infektionen auf. Das erhöhte TNF- α im hAC-Modell kann somit auf die Makrophagen zurückzuführen werden, die auch Einfluss auf die Epithelzellen des Modells nehmen. Durch eine Mean Fluorescence Intensity (MFI-) Quantifikation konnte eine Verringerung des intrazellulären SP-A Proteinlevels durch die bakteriellen Infektionen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse des hAC-Modell konnten in *in vivo* Versuchen mit Mäusen repliziert werden. V.a. Tiere, die bakteriell mono- oder koinfiziert waren, wiesen eine signifikant verringerte SP-A mRNA auf. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass *S. aureus* einen direkten Effekt auf SP-A hat, bei dem es durch ssPA zur extrazellulären Spaltung von SP-A kommt. Zusätzlich dazu, hat *S. aureus* auch eine indirekte Wirkung, die auf den durch die Inflammation ausgeschütteten Zytokinen beruht. Dabei spielt besonders TNF- α eine wichtige Rolle, für dessen Produktion während einer Infektion maßgeblich Makrophagen verantwortlich sind. TNF- α wurde bereits vielfach als Verursacher von einer erniedrigten SP-A mRNA-Expression beschrieben (Wispe et al., 1990, Miakotina and Snyder, 2002).

Auf andere Zytokine, die die SP-A mRNA beeinflussen, wurde im Rahmen der Dissertation nicht eingegangen. So ist z.B. ein synergistischer Effekt von TNF- α und IL-6, von dem ebenfalls eine hemmende Wirkung auf die SP-A mRNA beschrieben wurde (Doumanov et al., 2012), denkbar und könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Aus den gewonnenen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die Interaktion von Makrophagen und Epithelzellen zu erniedrigten SP-A mRNA-Leveln während einer Infektion führt. Für die Analyse der Prozesse, die während einer solchen Infektion ablaufen, wird ein komplexes Modellsystem benötigt, das auf den verschiedenen humanen Zellen basiert und das Organsystem nachstellt.

5 Schlussfolgerung

Pneumonien gehören zu den häufigsten infektiösen Erkrankungen weltweit (Ruuskanen et al., 2011). Vor allem die durch saisonale Influenzainfektionen hervorgerufenen Bronchopneumonien sind durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet. Ein Hauptgrund dafür sind bakterielle Superinfektionen u.a. durch *S. aureus* oder *S. pneumoniae* (Siemens et al., 2017). Die Pathomechanismen von *S. aureus* beruhen auf spezies-spezifischen Virulenzfaktoren (Loffler et al., 2010), weshalb verlässliche *in vitro* Modelle nötig sind, die die menschliche Physiologie spiegeln, um die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt zu identifizieren.

Das im Rahmen der Arbeit verwendete humane Alveolus-on-a-Chip-Modell, ist stark an der Anatomie und Physiologie der menschlichen Lunge orientiert. Die kultivierten Zellen bilden gewebetypische Eigenschaften und Proteine aus, die für die Lunge von großer Bedeutung sind. Dazu gehören u.a. Mikrovilli, Zellverbindungsproteine und eine stabile Barrierefunktion.

Das Modell erwies sich weiterhin als immunreaktiv. Auf die Stimulation mit IAV und *S. aureus* hin kam es zur Zytokinausschüttung und Einschränkung der Barriereintegrität. Durch seinen komplexen Aufbau ist das Modell sehr gut geeignet, die Interaktion der verschiedenen Zelltypen miteinander zu untersuchen und die Ausbreitung der Pathogene zu beobachten. Es bietet geeignete Voraussetzungen für Grundsatzstudien und weist Vorteile gegenüber Tierversuchsmodellen und Monozellkulturen auf. Anders als Tiermodellversuche und Versuche in Zellkulturen kann das Modell die humanspezifische Reaktion der Zellen abbilden und dennoch die Interaktion der Zellen und den Einfluss der Infektion auf die Barriereintegrität verdeutlichen. Durch seinen besonderen Aufbau kann die Reaktion der Alveolarepithelzellen und der Endothelzellen getrennt untersucht werden. Eine Weiterentwicklung des Modells ist denkbar und bezieht sich insbesondere auf das Integrieren von neutrophilen Granulozyten und primären Alveolarepithelzellen. In Zukunft könnte die Identifikation von molekularen und zellulären Zielen für neue Therapiestrategien der Pneumonie möglich sein.

Die Interaktion von Epithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen ist von entscheidender Bedeutung für die Untersuchung der viral/bakteriellen Koinfektion und deren Einfluss auf SP-A. Besonders Makrophagen und die von ihnen ausgeschütteten Zytokine sind dafür unerlässlich.

Die Untersuchung der Koinfektion im hAC-Modell zeigt, dass diese im Vergleich zur Monoinfektion zu einer höheren bakteriellen Last, einer stärkeren Zytokinausschüttung und

einem Verlust der Barrierefunktion und Zellintegrität der Endothelzellen führt. In Abwesenheit der Makrophagen kommt es weder zu einem ausgeprägtem Inflammationsgeschehen noch zu einem Verlust der Barriereintegrität.

Eine Reduktion der SP-A Konzentration, wie sie u.a. bei Patienten mit bakteriellen Pneumonien auftritt, kann zu schweren Krankheitsverläufen führen. Unsere Untersuchungen zeigten, dass *S. aureus* den SP-A Gehalt sowohl direkt als auch indirekt reduziert. Durch die von ihm exprimierte Cysteinprotease ssPA spaltet er extrazelluläres SP-A. Im hAC Modell induziert *S. aureus* eine massive TNF- α Ausschüttung durch Makrophagen, welches in der Lage ist, die SP-A mRNA-Expression zu senken. So kommt es im komplexen Zellmodell sowohl zu extrazellulären als auch zur intrazellulären Reduktion von SP-A. Dabei hatte die Koinfektion im Vergleich zur Monoinfektion die stärkere Wirkung. Der Einfluss weiterer Zytokine wie z.B. IL-6 wurde nicht untersucht. Ein möglicher synergistischer Effekt mit TNF- α ist denkbar und wurde hier nicht berücksichtigt.

Um die Auswirkung einer Koinfektion auf das Lungengewebe zu untersuchen, ist ein komplexes Zellmodell nötig, das die Interaktion verschiedener Zelltypen und v.a. die der Immunzellen mit Nicht-Immunzellen abbildet. Im hAC Modell führte die Koinfektion zu einer erhöhten Zytokinantwort, einer gestörten Barriereintegrität und einer Verringerung von SP-A. Diese Ergebnisse könnten einen Beitrag dazu leisten, die Ursachen für die schweren klinischen Verläufe, die bei sekundären Pneumonien beobachtet werden, zu verstehen.

- ACARREGUI, M. J., SNYDER, J. M., MITCHELL, M. D. & MENDELSON, C. R. 1990. Prostaglandins regulate surfactant protein A (SP-A) gene expression in human fetal lung in vitro. *Endocrinology*, 127, 1105-1113.
- ALLARD, B., PANARITI, A. & MARTIN, J. G. 2018. Alveolar macrophages in the resolution of inflammation, tissue repair, and tolerance to infection. *Frontiers in immunology*, 9.
- ARCHER, N. K., ADAPPA, N. D., PALMER, J. N., COHEN, N. A., HARRO, J. M., LEE, S. K., MILLER, L. S. & SHIRTLIFF, M. E. 2016. Interleukin-17A (IL-17A) and IL-17F Are Critical for Antimicrobial Peptide Production and Clearance of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Infect Immun*, 84, 3575-3583.
- ARCHER, N. K., HARRO, J. M. & SHIRTLIFF, M. E. 2013. Clearance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage is T cell dependent and mediated through interleukin-17A expression and neutrophil influx. *Infect Immun*, 81, 2070-5.
- BALLARD, P. L., LILEY, H. G., GONZALES, L. W., ODOM, M. W., AMMANN, A. J., BENSON, B., WHITE, R. T. & WILLIAMS, M. C. 1990. Interferon-gamma and synthesis of surfactant components by cultured human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2, 137-143.
- BARTLETT, A. H. & HULTEN, K. G. 2010. *Staphylococcus aureus* pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *Pediatr Infect Dis J*, 29, 860-1.
- BAUGHMAN, R. P., STERNBERG, R. I., HULL, W., BUCHSBAUM, J. A. & WHITSETT, J. 1993. Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*, 147, 653-7.
- BEHARKA, A. A., GAYNOR, C. D., KANG, B. K., VOELKER, D. R., MCCORMACK, F. X. & SCHLESINGER, L. S. 2002. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol*, 169, 3565-73.
- BENNE, C. A., KRAAIJEVELD, C. A., VAN STRIJP, J. A., BROUWER, E., HARMSSEN, M., VERHOEF, J., VAN GOLDE, L. M. & VAN IWAARDEN, J. F. 1995. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis*, 171, 335-41.
- BERTANI, F. R., MOZETIC, P., FIORAMONTI, M., IULIANI, M., RIBELLI, G., PANTANO, F., SANTINI, D., TONINI, G., TROMBETTA, M., BUSINARO, L., SELCI, S. & RAINER, A. 2017. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep*, 7, 8965.
- BHATTI, F., BALL, G., HOBBS, R., LINENS, A., MUNZAR, S., AKRAM, R., BARBER, A. J., ANDERSON, M., ELLIOTT, M. & EDWARDS, M. 2014. Pulmonary surfactant protein a is expressed in mouse retina by Muller cells and impacts neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56, 232-42.
- BOGGARAM, V., SMITH, M. E. & MENDELSON, C. R. 1991. Posttranscriptional regulation of surfactant protein-A messenger RNA in human fetal lung in vitro by glucocorticoids. *Molecular Endocrinology*, 5, 414-423.
- BOUVIER, N. M. & PALESE, P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26 Suppl 4, D49-53.
- BROWN, Z., GERRITSEN, M. E., CARLEY, W. W., STRIETER, R. M., KUNKEL, S. L. & WESTWICK, J. 1994. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. Differential regulation of monocyte

- chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in response to interferon-gamma. *The American journal of pathology*, 145, 913.
- BUCHHOLZ, U., BUDA, S., REUSS, A., HAAS, W. & UPHOFF, H. 2016. [Influenza pandemic deaths in Germany from 1918 to 2009. Estimates based on literature and own calculations]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 59, 523-36.
- BUDA, S., PRAHM, K., DÜRRWALD, R., BIERE, B., SCHILLING, J., BUCHHOLZ, U. & HAAS, W. 2018. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2017/18.
- CHERTOW, D. S. & MEMOLI, M. J. 2013. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *JAMA*, 309, 275-82.
- CHIDA, S., PHELPS, D. S., CORDLE, C., SOLL, R., FLOROS, J. & TAEUSCH, H. W. 1988. Surfactant-associated proteins in tracheal aspirates of infants with respiratory distress syndrome after surfactant therapy. *Am Rev Respir Dis*, 137, 943-947.
- CHUQUIMIA, O. D., PETURSDOTTIR, D. H., PERIOLO, N. & FERNÁNDEZ, C. 2013. Alveolar epithelial cells are critical in protection of the respiratory tract by secretion of factors able to modulate the activity of pulmonary macrophages and directly control bacterial growth. *Infection and immunity*, 81, 381-389.
- COATES, R., MORAN, J. & HORSBURGH, M. J. 2014. Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol*, 9, 75-91.
- CONDON, J. C., JEYASURIA, P., FAUST, J. M. & MENDELSON, C. R. 2004. Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4978-83.
- CONTI, P. & DIGIOACCHINO, M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy and Asthma Proceedings*, 2001. OceanSide Publications, 133.
- DAS, K., ARAMINI, J. M., MA, L. C., KRUG, R. M. & ARNOLD, E. 2010. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 530-8.
- DELEMONS, R. A., SHERMETA, D. W., KNELSON, J. H., KOTAS, R. & AVERY, M. E. 1970. Acceleration of appearance of pulmonary surfactant in the fetal lamb by administration of corticosteroids. *American Review of Respiratory Disease*, 102, 459-461.
- DI GREGORIO, G. B., YAO-BORENGASSER, A., RASOULI, N., VARMA, V., LU, T., MILES, L. M., RANGANATHAN, G., PETERSON, C. A., MCGEHEE, R. E. & KERN, P. A. 2005. Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes*, 54, 2305-13.
- DOERR, H. W. & GERLICH, W. H. 2010. *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen; 115 Tabellen*, Georg Thieme Verlag.
- DOHLE, E., SINGH, S., NISHIGUSHI, A., FISCHER, T., WESSLING, M., MÖLLER, M., SADER, R., KASPER, J., GHANAATI, S. & KIRKPATRICK, C. J. 2018. Human co-and triple-culture model of the alveolar-capillary barrier on a basement membrane mimic. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 24, 495-503.
- DOU, D., REVOL, R., ÖSTBYE, H., WANG, H. & DANIELS, R. 2018. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Frontiers in immunology*, 9.
- DOUMANOV, J., JORDANOVA, A., ZLATKOV, K., MOSKOVA-DOUMANOVA, V. & LALCHEV, Z. 2012. Investigation of IL-6 effects on SP-A expression in A549 lung cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26, 96-99.
- EDINGER, A. L. & THOMPSON, C. B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 663-9.

- ELINAV, E., STROWIG, T., HENAO-MEJIA, J. & FLAVELL, R. A. 2011. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity*, 34, 665-79.
- EPELMAN, S., LAVINE, K. J. & RANDOLPH, G. J. 2014. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*, 41, 21-35.
- FADOK, V. A., BRATTON, D. L., KONOWAL, A., FREED, P. W., WESTCOTT, J. Y. & HENSON, P. M. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101, 890-8.
- FINELLI, L., FIORE, A., DHARA, R., BRAMMER, L., SHAY, D. K., KAMIMOTO, L., FRY, A., HAGEMAN, J., GORWITZ, R., BRESEE, J. & UYEKI, T. 2008. Influenza-associated pediatric mortality in the United States: increase of Staphylococcus aureus coinfection. *Pediatrics*, 122, 805-11.
- FLAHERTY, J. T., PIERCE, J. E., FERRANS, V. J., PATEL, D. J., TUCKER, W. K. & FRY, D. L. 1972. Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circulation Research*, 30, 23-33.
- GAMBLIN, S. J. & SKEHEL, J. J. 2010. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, 285, 28403-9.
- GAO, R., BHATNAGAR, J., BLAU, D. M., GREER, P., ROLLIN, D. C., DENISON, A. M., DELEON-CARNES, M., SHIEH, W. J., SAMBHARA, S., TUMPEY, T. M., PATEL, M., LIU, L., PADDOCK, C., DREW, C., SHU, Y., KATZ, J. M. & ZAKI, S. R. 2013. Cytokine and chemokine profiles in lung tissues from fatal cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1): role of the host immune response in pathogenesis. *Am J Pathol*, 183, 1258-1268.
- GARDAI, S. J., XIAO, Y. Q., DICKINSON, M., NICK, J. A., VOELKER, D. R., GREENE, K. E. & HENSON, P. M. 2003. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*, 115, 13-23.
- GAUTIER, E. L., SHAY, T., MILLER, J., GRETER, M., JAKUBZICK, C., IVANOV, S., HELFT, J., CHOW, A., ELPEK, K. G. & GORDONOV, S. 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature immunology*, 13, 1118.
- GEERTSMA, M. F., NIBBERING, P. H., HAAGSMAN, H. P., DAHA, M. R. & VAN FURTH, R. 1994. Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of Staphylococcus aureus by monocytes. *Am J Physiol*, 267, L578-84.
- GORWITZ, R. J., KRUSZON-MORAN, D., MCALLISTER, S. K., MCQUILLAN, G., MCDUGAL, L. K., FOSHEIM, G. E., JENSEN, B. J., KILLGORE, G., TENOVER, F. C. & KUEHNERT, M. J. 2008. Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004. *J Infect Dis*, 197, 1226-34.
- GREGORY, T., LONGMORE, W., MOXLEY, M., WHITSETT, J., REED, C., FOWLER, A. R., HUDSON, L., MAUNDER, R., CRIM, C. & HYERS, T. 1991. Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 88, 1976-1981.
- GROGER, M., RENNERT, K., GISZAS, B., WEISS, E., DINGER, J., FUNKE, H., KIEHNTOPF, M., PETERS, F. T., LUPP, A., BAUER, M., CLAUS, R. A., HUBER, O. & MOSIG, A. S. 2016. Monocyte-induced recovery of inflammation-associated hepatocellular dysfunction in a biochip-based human liver model. *Sci Rep*, 6, 21868.
- GUARINO, N., OUE, T., SHIMA, H. & PURI, P. 2000. Antenatal dexamethasone enhances surfactant protein synthesis in the hypoplastic lung of nitrofen-induced diaphragmatic hernia in rats. *Journal of pediatric surgery*, 35, 1468-1473.
- HACZKU, A. 2008. Protective role of the lung collectins surfactant protein A and surfactant protein D in airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 861-79; quiz 880-1.

- HAN, S. & MALLAMPALLI, R. K. 2015. The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections. *Ann Am Thorac Soc*, 12, 765-74.
- HAWGOOD, S. & CLEMENTS, J. A. 1990. Pulmonary surfactant and its apoproteins. *J Clin Invest*, 86, 1-6.
- HERZOG, E. L., BRODY, A. R., COLBY, T. V., MASON, R. & WILLIAMS, M. C. 2008. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 5, 778-782.
- HOF, H., DÖRRIES, R. & GEGINAT, G. 2014. Medizinische Mikrobiologie: Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Immunologie, klinische Infektiologie, Hygiene. 5., vollst. überarb. Aufl. Duale Reihe. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- HÖFFKEN, G., LORENZ, J., KERN, W., WELTE, T., BAUER, T., DALHOFF, K., DIETRICH, E., EWIG, S., GASTMEIER, P. & GRABEIN, B. 2009. Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobielle Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen unteren Atemwegsinfektionen sowie ambulant erworbener Pneumonie—Update 2009. *Pneumologie*, 63, e1-e68.
- HOPSTAKEN, R. M., MURIS, J. W., KNOTTNERUS, J. A., KESTER, A. D., RINKENS, P. E. & DINANT, G. J. 2003. Contributions of symptoms, signs, erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein to a diagnosis of pneumonia in acute lower respiratory tract infection. *Br J Gen Pract*, 53, 358-64.
- HOWDEN, B. P., DAVIES, J. K., JOHNSON, P. D., STINEAR, T. P. & GRAYSON, M. L. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 23, 99-139.
- HSIEH, I. N., DE LUNA, X., WHITE, M. R. & HARTSHORN, K. L. 2018. The Role and Molecular Mechanism of Action of Surfactant Protein D in Innate Host Defense Against Influenza A Virus. *Front Immunol*, 9, 1368.
- HUERTAS, A., GUIGNABERT, C., BARBERÀ, J. A., BÄRTSCH, P., BHATTACHARYA, J., BHATTACHARYA, S., BONSIGNORE, M. R., DEWACHTER, L., DINH-XUAN, A. T. & DORFMÜLLER, P. 2018. Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases: highlights from basic research to therapy. *European Respiratory Journal*, 51, 1700745.
- ISLAM, K. N. & MENDELSON, C. R. 2002. Potential role of nuclear factor kappaB and reactive oxygen species in cAMP and cytokine regulation of surfactant protein-A gene expression in lung type II cells. *Mol Endocrinol*, 16, 1428-40.
- ITO, Y. & MASON, R. J. 2010. The effect of interleukin-13 (IL-13) and interferon-gamma (IFN-gamma) on expression of surfactant proteins in adult human alveolar type II cells in vitro. *Respir Res*, 11, 157.
- IVERSON, A. R., BOYD, K. L., MCAULEY, J. L., PLANO, L. R., HART, M. E. & MCCULLERS, J. A. 2011. Influenza virus primes mice for pneumonia from *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 203, 880-8.
- JIA, L., ZHAO, J., YANG, C., LIANG, Y., LONG, P., LIU, X., QIU, S., WANG, L., XIE, J., LI, H., LIU, H., GUO, W., WANG, S., LI, P., ZHU, B., HAO, R., MA, H., JIANG, Y. & SONG, H. 2018. Severe Pneumonia Caused by Coinfection With Influenza Virus Followed by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Induces Higher Mortality in Mice. *Front Immunol*, 9, 3189.
- JOBE, A. H., MITCHELL, B. R. & GUNKEL, J. H. 1993. Beneficial effects of the combined use of prenatal corticosteroids and postnatal surfactant on preterm infants. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 168, 508-513.
- JOHANSSON, J., CURSTEDT, T. & ROBERTSON, B. 1994. The proteins of the surfactant system. *Eur Respir J*, 7, 372-91.

- JOHNSON, N. P. & MUELLER, J. 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*, 76, 105-15.
- JOSHI, S. & KOTTECHA, S. 2007. Lung growth and development. *Early human development*, 83, 789-794.
- KANTYKA, T., PYRC, K., GRUCA, M., SMAGUR, J., PLAZA, K., GUZIK, K., ZEGLEN, S., OCHMAN, M. & POTEMPA, J. 2013. Staphylococcus aureus proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung. *J Innate Immun*, 5, 251-60.
- KATYAL, S., AMENTA, J., SINGH, G. & SILVERMAN, J. 1984. Deficient lung surfactant apoproteins in amniotic fluid with mature phospholipid profile from diabetic pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 148, 48-53.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 34, 637-50.
- KHOOR, A., GRAY, M., HULL, W., WHITSETT, J. & STAHLMAN, M. 1993. Developmental expression of SP-A and SP-A mRNA in the proximal and distal respiratory epithelium in the human fetus and newborn. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 41, 1311-1319.
- KHUBCHANDANI, K. R. & SNYDER, J. M. 2001. Surfactant protein A (SP-A): the alveolus and beyond. *FASEB J*, 15, 59-69.
- KISHORE, U., BERNAL, A. L., KAMRAN, M. F., SAXENA, S., SINGH, M., SARMA, P. U., MADAN, T. & CHAKRABORTY, T. 2005. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53, 399-417.
- KISHORE, U., GREENHOUGH, T. J., WATERS, P., SHRIVE, A. K., GHAI, R., KAMRAN, M. F., BERNAL, A. L., REID, K. B., MADAN, T. & CHAKRABORTY, T. 2006. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol*, 43, 1293-315.
- KIZILKURTLU, A. A., POLAT, T., AYDIN, G. B. & AKPEK, A. 2018. Lung on a Chip for Drug Screening and Design. *Curr Pharm Des*, 24, 5386-5396.
- KLEMM, C., BRUCHHAGEN, C., VAN KRUCHTEN, A., NIEMANN, S., LOFFLER, B., PETERS, G., LUDWIG, S. & EHRHARDT, C. 2017. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) regulate IL-6 over-production during concomitant influenza virus and Staphylococcus aureus infection. *Sci Rep*, 7, 42473.
- KOLLEF, M. H. & MICEK, S. T. 2005. Staphylococcus aureus pneumonia: a "superbug" infection in community and hospital settings. *Chest*, 128, 1093-7.
- KONISHI, M., FUJIWARA, T., NAITO, T., TAKEUCHI, Y., OGAWA, Y., INUKAI, K., FUJIMURA, M., NAKAMURA, H. & HASHIMOTO, T. 1988. Surfactant replacement therapy in neonatal respiratory distress syndrome. A multi-centre, randomized clinical trial: comparison of high- versus low-dose of surfactant TA. *Eur J Pediatr*, 147, 20-5.
- KORFHAGEN, T. R., BRUNO, M. D., ROSS, G. F., HUELSMAN, K. M., IKEGAMI, M., JOBE, A. H., WERT, S. E., STRIPP, B. R., MORRIS, R. E., GLASSER, S. W., BACHURSKI, C. J., IWAMOTO, H. S. & WHITSETT, J. A. 1996. Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9594-9.
- KOTAS, R. V. & AVERY, M. E. 1971. Accelerated appearance of pulmonary surfactant in the fetal rabbit. *Journal of Applied Physiology*, 30, 358-361.
- KUDVA, A., SCHELLER, E. V., ROBINSON, K. M., CROWE, C. R., CHOI, S. M., SLIGHT, S. R., KHADER, S. A., DUBIN, P. J., ENELOW, R. I., KOLLS, J. K. & ALCORN, J. F. 2011. Influenza A inhibits Th17-mediated host defense against bacterial pneumonia in mice. *J Immunol*, 186, 1666-1674.
- KURONUMA, K., SANO, H., KATO, K., KUDO, K., HYAKUSHIMA, N., YOKOTA, S., TAKAHASHI, H., FUJII, N., SUZUKI, H., KODAMA, T., ABE, S. & KUROKI,

- Y. 2004. Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A. *J Biol Chem*, 279, 21421-30.
- KWEI, S., STAVRAKIS, G., TAKAHAS, M., TAYLOR, G., FOLKMAN, M. J., GIMBRONE JR, M. A. & GARCÍA-CARDEÑA, G. 2004. Early adaptive responses of the vascular wall during venous arterialization in mice. *The American journal of pathology*, 164, 81-89.
- LAVIN, Y., WINTER, D., BLECHER-GONEN, R., DAVID, E., KEREN-SHAUL, H., MERAD, M., JUNG, S. & AMIT, I. 2014. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159, 1312-26.
- LAZAROWITZ, S. G., GOLDBERG, A. R. & CHOPPIN, P. W. 1973. Proteolytic cleavage by plasmin of the HA polypeptide of influenza virus: host cell activation of serum plasminogen. *Virology*, 56, 172-80.
- LEE, N., WONG, C. K., CHAN, P. K., CHAN, M. C., WONG, R. Y., LUN, S. W., NGAI, K. L., LUI, G. C., WONG, B. C., LEE, S. K., CHOI, K. W. & HUI, D. S. 2011. Cytokine response patterns in severe pandemic 2009 H1N1 and seasonal influenza among hospitalized adults. *PLoS One*, 6, e26050.
- LEVINE, A. M., BRUNO, M. D., HUELSMAN, K. M., ROSS, G. F., WHITSETT, J. A. & KORFHAGEN, T. R. 1997. Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol*, 158, 4336-40.
- LEVINE, A. M., GWOZDZ, J., STARK, J., BRUNO, M., WHITSETT, J. & KORFHAGEN, T. 1999a. Surfactant protein-A enhances respiratory syncytial virus clearance in vivo. *J Clin Invest*, 103, 1015-21.
- LEVINE, A. M., HARTSHORN, K., ELLIOTT, J., WHITSETT, J. & KORFHAGEN, T. 2002. Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 282, L563-72.
- LEVINE, A. M., KURAK, K. E., BRUNO, M. D., STARK, J. M., WHITSETT, J. A. & KORFHAGEN, T. R. 1998. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 19, 700-8.
- LEVINE, A. M., KURAK, K. E., WRIGHT, J. R., WATFORD, W. T., BRUNO, M. D., ROSS, G. F., WHITSETT, J. A. & KORFHAGEN, T. R. 1999b. Surfactant protein-A binds group B streptococcus enhancing phagocytosis and clearance from lungs of surfactant protein-A-deficient mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20, 279-86.
- LEVINE, A. M., LOTZE, A., STANLEY, S., STROUD, C., O'DONNELL, R., WHITSETT, J. & POLLACK, M. M. 1996. Surfactant content in children with inflammatory lung disease. *Crit Care Med*, 24, 1062-7.
- LEVINE, A. M., WHITSETT, J. A., GWOZDZ, J. A., RICHARDSON, T. R., FISHER, J. H., BURHANS, M. S. & KORFHAGEN, T. R. 2000. Distinct effects of surfactant protein A or D deficiency during bacterial infection on the lung. *J Immunol*, 165, 3934-40.
- LIANG, S. C., TAN, X.-Y., LUXENBERG, D. P., KARIM, R., DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., COLLINS, M. & FOUSSER, L. A. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of experimental medicine*, 203, 2271-2279.
- LIGGINS, G. C. & HOWIE, R. N. 1972. A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics*, 50, 515-525.
- LIMBAGO, B., FOSHEIM, G. E., SCHOONOVER, V., CRANE, C. E., NADLE, J., PETIT, S., HELTZEL, D., RAY, S. M., HARRISON, L. H., LYNFIELD, R., DUMYATI, G., TOWNES, J. M., SCHAFFNER, W., MU, Y., FRIDKIN, S. K. & ACTIVE BACTERIAL CORE SURVEILLANCE, M. I. 2009. Characterization of

- methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected in 2005 and 2006 from patients with invasive disease: a population-based analysis. *J Clin Microbiol*, 47, 1344-51.
- LOFFLER, B., HUSSAIN, M., GRUNDMEIER, M., BRUCK, M., HOLZINGER, D., VARGA, G., ROTH, J., KAHL, B. C., PROCTOR, R. A. & PETERS, G. 2010. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog*, 6, e1000715.
- LOFFLER, B., NIEMANN, S., EHRHARDT, C., HORN, D., LANCKOHR, C., LINA, G., LUDWIG, S. & PETERS, G. 2013. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* necrotizing pneumonia: the role of PVL and an influenza coinfection. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 11, 1041-51.
- LOURIA, D. B., BLUMENFELD, H. L., ELLIS, J. T., KILBOURNE, E. D. & ROGERS, D. E. 1959. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest*, 38, 213-65.
- LOWY, F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339, 520-32.
- MAIRPADY SHAMBAT, S., CHEN, P., NGUYEN HOANG, A. T., BERGSTEN, H., VANDENESCH, F., SIEMENS, N., LINA, G., MONK, I. R., FOSTER, T. J., ARAKERE, G., SVENSSON, M. & NORRBY-TEGLUND, A. 2015. Modelling staphylococcal pneumonia in a human 3D lung tissue model system delineates toxin-mediated pathology. *Dis Model Mech*, 8, 1413-25.
- MAN, Y., HART, V. J., RING, C. J., SANJAR, S. & WEST, M. R. 2000. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 23, 610-617.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A. & LOCATI, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25, 677-86.
- MARIENCHECK, W. I., ALCORN, J. F., PALMER, S. M. & WRIGHT, J. R. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 28, 528-37.
- MARTIN, T. R. & FREVERT, C. W. 2005. Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2, 403-411.
- MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.
- MARTINEZ, F. O., HELMING, L. & GORDON, S. 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*, 27, 451-83.
- MCCULLERS, J. A. & BARTMESS, K. C. 2003. Role of neuraminidase in lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 187, 1000-9.
- MENDELSON, C. R., GAO, E., LI, J., YOUNG, P. P., MICHAEL, L. F. & ALCORN, J. L. 1998. Regulation of expression of surfactant protein-A. *Biochim Biophys Acta*, 1408, 132-49.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MIKOTINA, O. L. & SNYDER, J. M. 2002. TNF-alpha inhibits SP-A gene expression in lung epithelial cells via p38 MAPK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L418-27.
- MOLDOVEANU, B., OTMISHI, P., JANI, P., WALKER, J., SARMIENTO, X., GUARDIOLA, J., SAAD, M. & YU, J. 2009. Inflammatory mechanisms in the lung. *Journal of inflammation research*, 2, 1.

- MORALES-NEBREDA, L., MISHARIN, A. V., PERLMAN, H. & BUDINGER, G. S. 2015. The heterogeneity of lung macrophages in the susceptibility to disease. *European Respiratory Review*, 24, 505-509.
- MORENS, D. M., TAUBENBERGER, J. K. & FAUCI, A. S. 2008. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J Infect Dis*, 198, 962-70.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MULCAHY, M. E., LEECH, J. M., RENAULD, J. C., MILLS, K. H. & MCLOUGHLIN, R. M. 2016. Interleukin-22 regulates antimicrobial peptide expression and keratinocyte differentiation to control *Staphylococcus aureus* colonization of the nasal mucosa. *Mucosal Immunol*, 9, 1429-1441.
- MULCAHY, M. E. & MCLOUGHLIN, R. M. 2016a. Host-Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends Microbiol*, 24, 872-886.
- MULCAHY, M. E. & MCLOUGHLIN, R. M. 2016b. *Staphylococcus aureus* and Influenza A Virus: Partners in Coinfection. *MBio*, 7.
- MURRAY, P. J., ALLEN, J. E., BISWAS, S. K., FISHER, E. A., GILROY, D. W., GOERDT, S., GORDON, S., HAMILTON, J. A., IVASHKIV, L. B., LAWRENCE, T., LOCATI, M., MANTOVANI, A., MARTINEZ, F. O., MEGE, J. L., MOSSER, D. M., NATOLI, G., SAEIJ, J. P., SCHULTZE, J. L., SHIREY, K. A., SICA, A., SUTTLES, J., UDALOVA, I., VAN GINDERACHTER, J. A., VOGEL, S. N. & WYNN, T. A. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41, 14-20.
- NAGEL, T., RESNICK, N., ATKINSON, W. J., DEWEY, C. F. & GIMBRONE, M. A. 1994. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 94, 885-891.
- NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E. & RUBIN, B. Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*, 158, 670-89.
- NGUYEN HOANG, A. T., CHEN, P., JUAREZ, J., SACHAMITR, P., BILLING, B., BOSNJAK, L., DAHLEN, B., COLES, M. & SVENSSON, M. 2012. Dendritic cell functional properties in a three-dimensional tissue model of human lung mucosa. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 302, L226-37.
- NIEMANN, S., EHRHARDT, C., MEDINA, E., WARNKING, K., TUCHSCHERR, L., HEITMANN, V., LUDWIG, S., PETERS, G. & LOFFLER, B. 2012. Combined action of influenza virus and *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin provokes severe lung epithelium damage. *J Infect Dis*, 206, 1138-48.
- NOURSHARGH, S. & ALON, R. 2014. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41, 694-707.
- O'BRIEN, A. D., STANDIFORD, T. J., CHRISTENSEN, P. J., WILCOXEN, S. E. & PAINE III, R. 1998. Chemotaxis of alveolar macrophages in response to signals derived from alveolar epithelial cells. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131, 417-424.
- ODOM, M. J., SNYDER, J. M. & MENDELSON, C. R. 1987. Adenosine 3', 5'-monophosphate analogs and β -adrenergic agonists induce the synthesis of the major surfactant apoprotein in human fetal lung in vitro. *Endocrinology*, 121, 1155-1163.
- OSORIO, F. & REIS E SOUSA, C. 2011. Myeloid C-type lectin receptors in pathogen recognition and host defense. *Immunity*, 34, 651-64.
- OTTO, M. 2010. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*, 64, 143-62.

- OYARZUN, M. J. & CLEMENTS, J. A. 1978. Control of lung surfactant by ventilation, adrenergic mediators, and prostaglandins in the rabbit. *Am Rev Respir Dis*, 117, 879-91.
- PAPANICOLAOU, G. A. 2013. Severe influenza and *S. aureus* pneumonia: for whom the bell tolls? *Virulence*, 4, 666-8.
- PARKER, D. 2017. Humanized mouse models of *Staphylococcus aureus* infection. *Frontiers in immunology*, 8, 512.
- PASTVA, A. M., WRIGHT, J. R. & WILLIAMS, K. L. 2007. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc*, 4, 252-7.
- PFLUG, A., LUKARSKA, M., RESA-INFANTE, P., REICH, S. & CUSACK, S. 2017. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine. *Virus Res*, 234, 103-117.
- PIKAAR, J. C., VOORHOUT, W. F., VAN GOLDE, L. M., VERHOEF, J., VAN STRIJP, J. A. & VAN IWAARDEN, J. F. 1995. Opsonic activities of surfactant proteins A and D in phagocytosis of gram-negative bacteria by alveolar macrophages. *J Infect Dis*, 172, 481-9.
- PORTELA, A. & DIGARD, P. 2002. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol*, 83, 723-734.
- POSSMAYER, F. 1988. A proposed nomenclature for pulmonary surfactant-associated proteins. *Am Rev Respir Dis*, 138, 990-8.
- PROCTOR, R. A., VON EIFF, C., KAHL, B. C., BECKER, K., MCNAMARA, P., HERRMANN, M. & PETERS, G. 2006. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol*, 4, 295-305.
- RAASCH, M., RENNERT, K., JAHN, T., PETERS, S., HENKEL, T., HUBER, O., SCHULZ, I., BECKER, H., LORKOWSKI, S., FUNKE, H. & MOSIG, A. 2015. Microfluidically supported biochip design for culture of endothelial cell layers with improved perfusion conditions. *Biofabrication*, 7, 015013.
- REDDINGER, R. M., LUKE-MARSHALL, N. R., HAKANSSON, A. P. & CAMPAGNARI, A. A. 2016. Host Physiologic Changes Induced by Influenza A Virus Lead to *Staphylococcus aureus* Biofilm Dispersion and Transition from Asymptomatic Colonization to Invasive Disease. *MBio*, 7.
- RICE, T. W., RUBINSON, L., UYEKI, T. M., VAUGHN, F. L., JOHN, B. B., MILLER, R. R., 3RD, HIGGS, E., RANDOLPH, A. G., SMOOT, B. E., THOMPSON, B. T. & NETWORK, N. A. 2012. Critical illness from 2009 pandemic influenza A virus and bacterial coinfection in the United States. *Crit Care Med*, 40, 1487-98.
- ROBERTSON, L., CALEY, J. P. & MOORE, J. 1958. Importance of *Staphylococcus aureus* in pneumonia in the 1957 epidemic of influenza A. *Lancet*, 2, 233-6.
- ROLFE, M. W., KUNKEL, S. L., STANDIFORD, T. J., ORRINGER, M. B., PHAN, S., EVANOFF, H. L., BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M. 1992. Expression and regulation of human pulmonary fibroblast-derived monocyte chemotactic peptide-1. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 263, L536-L545.
- ROONEY, S. A. 2001. Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 129, 233-43.
- ROONEY, S. A., YOUNG, S. L. & MENDELSON, C. R. 1994. Molecular and cellular processing of lung surfactant. *FASEB J*, 8, 957-67.
- RÖSZER, T. 2015. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of inflammation*, 2015.
- RUUSKANEN, O., LAHTI, E., JENNINGS, L. C. & MURDOCH, D. R. 2011. Viral pneumonia. *Lancet*, 377, 1264-75.

- RYNDA-APPLE, A., ROBINSON, K. M. & ALCORN, J. F. 2015. Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease. *Infect Immun*, 83, 3764-70.
- SCHAGAT, T. L., WOFFORD, J. A. & WRIGHT, J. R. 2001. Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, 166, 2727-33.
- SCHEIBLAUER, H., REINACHER, M., TASHIRO, M. & ROTT, R. 1992. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis*, 166, 783-91.
- SELF, W. H., WUNDERINK, R. G., WILLIAMS, D. J., ZHU, Y., ANDERSON, E. J., BALK, R. A., FAKHRAN, S. S., CHAPPELL, J. D., CASIMIR, G., COURTNEY, D. M., TRABUE, C., WATERER, G. W., BRAMLEY, A., MAGILL, S., JAIN, S., EDWARDS, K. M. & GRIJALVA, C. G. 2016. Staphylococcus aureus Community-acquired Pneumonia: Prevalence, Clinical Characteristics, and Outcomes. *Clin Infect Dis*, 63, 300-9.
- SENDI, P. & PROCTOR, R. A. 2009. Staphylococcus aureus as an intracellular pathogen: the role of small colony variants. *Trends Microbiol*, 17, 54-8.
- SEVER-CHRONEOS, Z., KRUPA, A., DAVIS, J., HASAN, M., YANG, C. H., SZELIGA, J., HERRMANN, M., HUSSAIN, M., GEISBRECHT, B. V., KOBZIK, L. & CHRONEOS, Z. C. 2011. Surfactant protein A (SP-A)-mediated clearance of Staphylococcus aureus involves binding of SP-A to the staphylococcal adhesin eap and the macrophage receptors SP-A receptor 210 and scavenger receptor class A. *J Biol Chem*, 286, 4854-70.
- SHAHANGIAN, A., CHOW, E. K., TIAN, X., KANG, J. R., GHAFFARI, A., LIU, S. Y., BELPERIO, J. A., CHENG, G. & DENG, J. C. 2009. Type I IFNs mediate development of postinfluenza bacterial pneumonia in mice. *J Clin Invest*, 119, 1910-20.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., SEIFI, B., MOHAMMADI, A., AFSHARI, J. T. & SAHEBKAR, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233, 6425-6440.
- SICA, A., ERRENI, M., ALLAVENA, P. & PORTA, C. 2015. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*, 72, 4111-26.
- SICA, A. & MANTOVANI, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of clinical investigation*, 122, 787-795.
- SIEMENS, N., OEHMCKE-HECHT, S., METTENLEITER, T. C., KREIKEMEYER, B., VALENTIN-WEIGAND, P. & HAMMERSCHMIDT, S. 2017. Port d'Entree for Respiratory Infections - Does the Influenza A Virus Pave the Way for Bacteria? *Front Microbiol*, 8, 2602.
- SIMONSEN, L. 1999. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine*, 17 Suppl 1, S3-10.
- SNYDER, J. M. & MENDELSON, C. R. 1987. Insulin inhibits the accumulation of the major lung surfactant apoprotein in human fetal lung explants maintained in vitro. *Endocrinology*, 120, 1250-1257.
- SO, K., GOMMERS, D., EIJKING, E., FIÉVEZ, R., SPRENGER, M. & LACHMANN, B. 1991. Intratracheal surfactant administration restores gas exchange in experimental adult respiratory distress syndrome associated with viral pneumonia. *Anesthesia and analgesia*, 72, 589-595.
- STEVENS, T., GARCIA, J. G., SHASBY, D. M., BHATTACHARYA, J. & MALIK, A. B. 2000. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, L419-L422.

- STOGER, J. L., GIJBELS, M. J., VAN DER VELDEN, S., MANCA, M., VAN DER LOOS, C. M., BIESSEN, E. A., DAEMEN, M. J., LUTGENS, E. & DE WINTHER, M. P. 2012. Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 225, 461-8.
- STRYJEWSKI, M. E. & COREY, G. R. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an evolving pathogen. *Clin Infect Dis*, 58 Suppl 1, S10-9.
- TASHIRO, M., CIBOROWSKI, P., KLENK, H. D., PULVERER, G. & ROTT, R. 1987. Role of *Staphylococcus protease* in the development of influenza pneumonia. *Nature*, 325, 536-7.
- TAUBENBERGER, J. K. & MORENS, D. M. 2008. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*, 3, 499-522.
- TENNER, A. J., ROBINSON, S. L., BORCHELT, J. & WRIGHT, J. R. 1989. Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to C1q, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem*, 264, 13923-8.
- THOMER, L., SCHNEEWIND, O. & MISSIAKAS, D. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annu Rev Pathol*, 11, 343-64.
- TONG, S. Y., DAVIS, J. S., EICHENBERGER, E., HOLLAND, T. L. & FOWLER, V. G., JR. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*, 28, 603-61.
- TSE, L. V. & WHITTAKER, G. R. 2015. Modification of the hemagglutinin cleavage site allows indirect activation of avian influenza virus H9N2 by bacterial staphylokinase. *Virology*, 482, 1-8.
- TUCHSCHERR, L., HEITMANN, V., HUSSAIN, M., VIEMANN, D., ROTH, J., VON EIFF, C., PETERS, G., BECKER, K. & LOFFLER, B. 2010. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are adapted phenotypes for intracellular persistence. *J Infect Dis*, 202, 1031-40.
- TUCHSCHERR, L., MEDINA, E., HUSSAIN, M., VOLKER, W., HEITMANN, V., NIEMANN, S., HOLZINGER, D., ROTH, J., PROCTOR, R. A., BECKER, K., PETERS, G. & LOFFLER, B. 2011. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med*, 3, 129-41.
- TZIMA, E., IRANI-TEHRANI, M., KIOSSES, W. B., DEJANA, E., SCHULTZ, D. A., ENGELHARDT, B., CAO, G., DELISSER, H. & SCHWARTZ, M. A. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437, 426.
- VAN KRUCHTEN, A., WILDEN, J. J., NIEMANN, S., PETERS, G., LOFFLER, B., LUDWIG, S. & EHRHARDT, C. 2018. *Staphylococcus aureus* triggers a shift from influenza virus-induced apoptosis to necrotic cell death. *FASEB J*, 32, 2779-2793.
- VANDIVIER, R. W., OGDEN, C. A., FADOK, V. A., HOFFMANN, P. R., BROWN, K. K., BOTTO, M., WALPORT, M. J., FISHER, J. H., HENSON, P. M. & GREENE, K. E. 2002. Role of surfactant proteins A, D, and C1q in the clearance of apoptotic cells in vivo and in vitro: calreticulin and CD91 as a common collectin receptor complex. *J Immunol*, 169, 3978-86.
- VERHOEVEN, P. O., GAGNAIRE, J., BOTELHO-NEVERS, E., GRATTARD, F., CARRICAJÓ, A., LUCHT, F., POZZETTO, B. & BERTHELOT, P. 2014. Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 12, 75-89.
- VIEIRA, F., KUNG, J. W. & BHATTI, F. 2017. Structure, genetics and function of the pulmonary associated surfactant proteins A and D: The extra-pulmonary role of these C type lectins. *Ann Anat*, 211, 184-201.

- VON EIFF, C., BECKER, K., MACHKA, K., STAMMER, H. & PETERS, G. 2001. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. Study Group. *N Engl J Med*, 344, 11-6.
- WANG, J., EDEEN, K., MANZER, R., CHANG, Y., WANG, S., CHEN, X., FUNK, C. J., COSGROVE, G. P., FANG, X. & MASON, R. J. 2007. Differentiated human alveolar epithelial cells and reversibility of their phenotype in vitro. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 36, 661-668.
- WARNKING, K., KLEMM, C., LOFFLER, B., NIEMANN, S., VAN KRUCHTEN, A., PETERS, G., LUDWIG, S. & EHRHARDT, C. 2015. Super-infection with *Staphylococcus aureus* inhibits influenza virus-induced type I IFN signalling through impaired STAT1-STAT2 dimerization. *Cell Microbiol*, 17, 303-17.
- WERTHEIM, H. F., MELLES, D. C., VOS, M. C., VAN LEEUWEN, W., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H. A. & NOUWEN, J. L. 2005. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*, 5, 751-62.
- WHITSETT, J., PILOT, T., CLARK, J. & WEAVER, T. 1987a. Induction of surfactant protein in fetal lung. Effects of cAMP and dexamethasone on SAP-35 RNA and synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5256-5261.
- WHITSETT, J. A. & GLASSER, S. W. 1998. Regulation of surfactant protein gene transcription. *Biochim Biophys Acta*, 1408, 303-11.
- WHITSETT, J. A., WEAVER, T. E., LIEBERMAN, M. A., CLARK, J. C. & DAUGHERTY, C. 1987b. Differential effects of epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on synthesis of Mr= 35,000 surfactant-associated protein in fetal lung. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 7908-7913.
- WISPE, J. R., CLARK, J. C., WARNER, B. B., FAJARDO, D., HULL, W. E., HOLTZMAN, R. B. & WHITSETT, J. A. 1990. Tumor necrosis factor-alpha inhibits expression of pulmonary surfactant protein. *J Clin Invest*, 86, 1954-60.
- WRIGHT, J. R. 1997. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiological Reviews*, 77, 931-962.
- WRIGHT, J. R. 2005. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*, 5, 58-68.
- WRIGHT, J. R. & DOBBS, L. G. 1991. Regulation of pulmonary surfactant secretion and clearance. *Annu Rev Physiol*, 53, 395-414.
- WU, H., KUZMENKO, A., WAN, S., SCHAFFER, L., WEISS, A., FISHER, J. H., KIM, K. S. & MCCORMACK, F. X. 2003. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest*, 111, 1589-602.
- WYNN, T. A., CHAWLA, A. & POLLARD, J. W. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496, 445-55.
- YE, P., GARVEY, P. B., ZHANG, P., NELSON, S., BAGBY, G., SUMMER, W. R., SCHWARZENBERGER, P., SHELLITO, J. E. & KOLLS, J. K. 2001. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25, 335-340.
- YU, X., ZHANG, X., ZHAO, B., WANG, J., ZHU, Z., TENG, Z., SHAO, J., SHEN, J., GAO, Y., YUAN, Z. & WU, F. 2011. Intensive cytokine induction in pandemic H1N1 influenza virus infection accompanied by robust production of IL-10 and IL-6. *PLoS One*, 6, e28680.
- ZHANG, L. & WANG, C. C. 2014. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 13, 138-52.

Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

Die Promotion wurde am Universitätsklinikum Jena am Institut für Medizinische Mikrobiologie Sektion Experimentelle Virologie angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Dr. Stefanie Deinhardt-Emmer danken für ihr Engagement und ihren Enthusiasmus für diese Arbeit, für die vielen fachlichen Diskussionen und nicht zuletzt für ihre positive und optimistische Einstellung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Bettina Löffler für die fachliche Betreuung und das stetige Interesse an meinen Experimenten und dem Voranschreiten der Arbeit. Ebenso danke ich Prof. Dr. Christina Ehrhardt für die fachliche Unterstützung meiner Promotion.

Mein Dank gilt weiterhin dem gesamten Institut für die angenehme Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Laborgerätschaften und des Laborarbeitsplatzes. Besonderen Dank verdient dabei Dr. Michael Schacke für die Hilfe in der Zellkultur. Weiterhin gilt mein Dank der Arbeitsgruppe der Sektion für Experimentelle Virologie, besonders Frau Prof. Dr. Michaela Schmidtke für die Durchführung der Tierexperimente.

Ich danke auch der Arbeitsgruppe von PD Dr. Alexander Mosig. Hierbei seien besonders Tobias Vogt für den Unterricht im Biochip-Handling und Fatina Siwczak für die Hilfe während der Aufnahmen der Immunfluoreszenz genannt. Hier sei auch Dr. Knut Rennert gedankt, der das humane Alveolus-on-a-Chip Modell entwickelt hat.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Marc Thilo Figge und Dr. Zoltán Cseresnyés für die Analyse und Quantifizierung der Bilder der Immunfluoreszenz.

Bedanken möchte ich mich auch für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Promotionsstipendiums von Seiten des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF).

Meinen Freunden und Eltern danke ich für die moralische Unterstützung und die aufmunternden Worte. Vor allem möchte ich mich bei meinem Mann Matthias Müller bedanken, der mir immer zur Seite stand und mich motivierte. Nicht zu vergessen sind die Großeltern unseres Sohnes, die mir durch viele Spaziergänge mit ihrem Enkel die Zeit verschafft haben, diese Arbeit zu verfassen.