

## 2 ERGEBNISSE

### 2.1 Erkennung von *S. pneumoniae* durch pulmonale Epithelzellen

**Schmeck, B.**, Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A. C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 290(4): L730-L737

*Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie und eine der wichtigsten Todesursachen aufgrund von Infektionskrankheiten. Das respiratorische Epithel bildet die erste physikalische und immunologische Barriere für Pneumokokken. Daher haben wir die pneumokokkeninduzierte Aktivierung von bronchialen Epithelzellen und die nachfolgende Signaltransduktion untersucht.

*S. pneumoniae* und sein Exotoxin Pneumolysin induzieren eine Interleukin-8 (IL-8)-Freisetzung durch die humane bronchiale Epithellzelllinie BEAS-2B. Diese Zellen exprimieren TLR4- und TLR6-, aber nur wenig TLR1- und TLR2-mRNA. Eine Pneumokokkeninfektion steigert die Expression von TLR1- und TLR2-mRNA. TLR1 und 2 erkennen synergistisch Pneumokokken, während TLR4, TLR6, LBP und CD14 nicht in die pneumokokkenbedingte Zellaktivierung involviert zu sein scheinen. Pneumolysin wird dagegen über TLR4 erkannt. Die Aktivierung pneumokokkeninfizierter Zellen war MyD88- und Phosphatidylinositol 3-Kinase-abhängig. Dominant-negative Mutanten der GTPasen Rac1 und Cdc42 reduzierten die NF- $\kappa$ B-Aktivierung und IL-8-Freisetzung, während RhoA nicht involviert war. Der chemische Rac1-Inhibitor Nsc23766 reduzierte die IL-8-Freisetzung und die Rekrutierung der phosphorylierten NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 an den IL-8 Promotor. Die Bindung der phosphorylierten AP-1-Untereinheit cJun an den Promotor wurde jedoch nicht verringert.

Diese Daten implizieren eine Aktivierung humaner Epithelzellen durch Pneumokokken über TLR1/2 und einen Pi3K-Rac1-NF- $\kappa$ B Signalweg.

Opitz, B., Puschel, A., **Schmeck, B.**, Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., Hippenstiel, S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem. 2004, 279(35): 36426-32.

*S. pneumoniae* invadiert transient Epithel- und Endothelzellen. Konservierte pathogenassoziierte Oberflächenmuster werden von der angeborenen Immunität durch „Toll-like“-Rezeptoren, aber auch von den neu beschriebenen zytosolischen Rezeptoren Nod1/CARD4 und Nod2/CARD15 erkannt. Diese detektieren unter anderem Peptidoglykane. Wir haben in dieser Arbeit untersucht, ob Nod-Proteine in die intrazelluläre Erkennung von Pneumokokken involviert sind.

Pneumokokken invadieren HEK293 Zellen. Genetische Komplementationsstudien in diesen Zellen demonstrierten, dass die *S. pneumoniae*-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung von Nod2 abhängt. Die intrazelluläre Transfektion inaktivierter Pneumokokken bestätigte die Nod-2-Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch Pneumokokken in HEK293 Zellen. Durch dominant-negative Überexpression und siRNA-Experimente konnten wir zum erstenmal zeigen, dass IRAK an der Nod2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung teilnimmt. Weiterhin inhibierten dominant-negative Mutanten von IRAK2, TRAF6, NIK, TAB2 und TAK1 auch die Nod2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Schließlich fanden wir im Lungengewebe von C57BL/6-Mäusen in vivo und in der bronchialepithelialen Zelllinie BEAS-2B eine Zunahme der Nod1- und Nod2-mRNA-Expression nach einer Infektion mit Pneumokokken.

Die vorliegenden Daten implizieren, dass Nod-Proteine zur Erkennung von *S. pneumoniae* durch die angeborene Immunität beitragen. Zudem sind Rip-2 und Mitglieder der TLR-Signalkaskade an der Nod2-abhängigen Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Pneumokokken beteiligt.

## 2.2 Pneumokokken-induzierte Signaltransduktion in pulmonale Epithelzellen

**Schmeck, B.**, Zahlten, J., Moog, K., van Laak, V., Huber, S., Hocke, A. C., Opitz, B., Hoffmann, E., Kracht, M., Zerrahn, J., Hammerschmidt, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. *Streptococcus pneumoniae*-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promotor. *J Biol Chem.* 2004, 279(51): 53241-7.

Die *S. pneumoniae*-induzierte Signaltransduktion in der Lunge ist weitgehend unbekannt. Wir haben in dieser Studie den Einfluss der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) auf die proinflammatorische Zellaktivierung untersucht.

In den Lungen von Mäusen mit experimentell induzierter Pneumokokkenpneumonie fanden wir eine vermehrte Expression des IL-8-Homologs KC und des Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktors (GM-CSF) im DNA-Mikroarray und der RT-PCR. Weiterhin wurde die p38 MAP-Kinase phosphoryliert. Wir wählten humanes Bronchialepithel als Modell, da es die erste Barriere für respiratorische Krankheitserreger darstellt und eine wichtige Funktion in der angeborenen Immunität wahrnimmt. Eine Pneumokokkeninfektion führte in der humanen bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B zur Freisetzung von IL-8 and GM-CSF und zur Aktivierung der p38 MAP-Kinase. Die Inhibition der p38 MAP-Kinase durch die chemischen Inhibitoren SB202190 und SB203580 reduzierte die pneumokokkeninduzierte Zytokinfreisetzung. In vivo in Mauslungen und in kultivierten humanen Epithelzellen führte eine Pneumokokkeninfektion zur I $\kappa$ B-Kinase-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Die Hemmung der p38 MAP-Kinase mit chemischen Inhibitoren oder durch RNAi gegen p38 $\alpha$  reduzierte die pneumokokkeninduzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription. Dabei blockierte die p38-Hemmung nicht die pneumokokkeninduzierte nukleäre Translokation von NF- $\kappa$ B/p65 und seine Rekrutierung an den IL-8-Promotor, wohl aber die Bindung von phosphoryliertem NF- $\kappa$ B/p65 (Serin 536) und der RNA-Polymerase II an den Promotor.

Somit trägt die p38 MAP-Kinase zur pneumokokkeninduzierten NF- $\kappa$ B-Transaktivierung und der nachfolgenden Zytokintranskription bei.

**Schmeck, B.,** Moog, K., Zahlten, J., van Laak, V., N'Guessan, P. D., Opitz, B., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. *Streptococcus pneumoniae* induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1-dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res.* 2006, 7(1): 98

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob die c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinase (JNK) auch für die pneumokokkeninduzierte Zytokinfreisetzung durch Lungenepithelzellen von Bedeutung ist.

*S. pneumoniae* induzierte die Freisetzung bestimmter CC- und CXC-, sowie Th1- und Th2-Zytokine und Wachstumsfaktoren durch die humane Lungenepithelzelllinie BEAS-2B. Weiterhin kam es nach Pneumokokkeninfektion zur Phosphorylierung der JNK in BEAS-2B-Zellen. Die Inhibition der JNK durch den niedermolekularen Inhibitor SP600125 reduzierte die pneumokokkeninduzierte IL-8 mRNA-Expression und die Freisetzung von IL-8 und IL-6. Ein wichtiger Regulator des *i18*-Promotors ist der durch die JNK phosphorylierte Transkriptionsfaktor AP-1. *S. pneumoniae* induzierte zeitabhängig die DNA-Bindung von AP-1 und seiner phosphorylierten Untereinheit cJun mit einem Maximum 3 bis 5 Stunden nach der Infektion. Die Rekrutierung von an Ser<sup>63/73</sup>-phosphoryliertem cJun und der RNA Polymerase II an den endogenen *i18*-Promotor zeigte sich 2 Stunden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* in der Chromatin-Immunopräzipitation. Der AP-1-Repressor A-Fos reduzierte die Pneumokokken-, aber nicht die TNF $\alpha$ -induzierte IL-8-Freisetzung durch TLR2-überexprimierende HEK293-Zellen. Antisenskonstrukte gegen die AP-1 Untereinheiten Fra1 und Fra2 hatten jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf die pneumokokkeninduzierte IL-8-Freisetzung.

Zusammenfassend war die *S. pneumoniae*-induzierte IL-8-Expression durch humane epitheliale BEAS-2B-Zellen von der Aktivierung der JNK und der Rekrutierung von phosphoryliertem cJun an den *i18*-Promotor abhängig.

N'Guessan, P. D., Hippenstiel, S., Etouem, M. O., Zahlten, J., Beermann, W., Lindner, D., Opitz, B., Witzzenrath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., **Schmeck, B.** *Streptococcus pneumoniae* induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006, 290(6): L1131-8.

Von den Cyclooxygenasen (COX) produzierte Prostaglandine, wie etwa PGE(2), werden als wichtige Effektoren der Abwehrfunktion des Lungenepithels und als zentrale Regulatoren der Lungenfunktion betrachtet. Daher haben wir untersucht, ob, und wenn ja, wie Pneumokokken die PGE(2)-Produktion in pulmonalen Epithelzellen induzieren.

Pneumokokkeninfizierte humane pulmonale BEAS-2B Epithelzellen sezernierten PGE(2). Die Expression der COX-2, nicht aber der COX-1, war in *S. pneumoniae*-infizierten BEAS-2B Zellen und in Lungen von Mäusen mit Pneumokokkenpneumonie zeit- und dosisabhängig erhöht. *S. pneumoniae* induzierte die Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  und die DNA-Bindung von NF- $\kappa$ B. Ein spezifischer Peptidinhibitor des I $\kappa$ B $\alpha$ -Kinasenkomplexes blockierte die pneumokokeninduzierte PGE(2)-Freisetzung und COX-2-Expression. Zudem beobachteten wir eine Aktivierung der p38 MAPK und der JNK in pneumokokeninfizierten BEAS-2B-Zellen. Die PGE(2)-Freisetzung und die COX-2-Expression wurden durch den p38 MAPK-Inhibitor SB-202190, aber nicht durch den JNK-Inhibitor SP-600125 reduziert. Wir haben nun die Interaktion des p38 MAPK- und des NF- $\kappa$ B-Signalweges analysiert und fanden, dass dominant-negative Mutanten der p38 MAPK-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  die *S. pneumoniae*-induzierte NF- $\kappa$ B Aktivierung blockierten. Ebenso waren die Rekrutierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65/RelA und der RNA Polymerase II an den *cox2*-Promotor p38 MAPK-, aber nicht JNK-abhängig. Zusammenfassend kann die p38 MAPK- und NF- $\kappa$ B-abhängige COX-2-Expression und subsequente PGE(2)-Freisetzung durch Lungenepithelzellen zur Wirtsantwort bei der Pneumokokkenpneumonie beitragen.

## 2.3 Schädigung von Epithel- und Endothelzellen durch *S. pneumoniae*

**Schmeck, B.**, Gross, R., N'Guessan, P. D., Hocke, A. C., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. *Streptococcus pneumoniae*-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. *Infect Immun.* 2004, 72(9): 4940-7.

Das bronchiale und alveoläre Epithel stellt eine erste physikalische und immunologische Barriere für respiratorische Krankheitserreger dar und muss bei einer invasiven Infektion überwunden werden. Daher haben wir untersucht, ob *S. pneumoniae* apoptotischen oder nekrotischen Zelltod von humanen Lungenepithelzellen induziert.

Der unbekapselte Pneumokokkenstamm R6x induzierte programmierten Zelltod in humanen alveolären und bronchialen Epithelzellen, während der bekapselte Stamm D39 Nekrose hervorrief. Die Pathogenitätsfaktoren Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> waren nicht für die pneumokokkeninduzierte Apoptose verantwortlich. In apoptotischen alveolären Epithelzellen fand sich eine gesteigerte Aktivität der Caspasen 6, 8 und 9, nicht aber der Caspase 3. Der pneumokokkeninduzierte programmierte Zelltod konnte durch einen Caspase-6-spezifischen Inhibitor und einen Pan-Caspaseninhibitor deutlich reduziert werden. Auch Hemmstoffe von Calpain-, Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Proteasen reduzierten die Apoptose. Weiterhin zeigten pneumokokkeninfizierte humane alveoläre Epithelzellen eine Spaltung von Bid und niedrigere Spiegel von Bcl2 und Bax. Eine Überexpression von Bcl2 in diesen Zellen reduzierte die Apoptose deutlich.

Pneumokokken induzierten also Apoptose in humanen alveolären und bronchialen Epithelzellen. Der programmierte Zelltod wurde durch Caspase 6 und nicht-caspasenartige Proteasen exekutiert und konnte durch Überexpression von Bcl2 blockiert werden.

N'Guessan\*, P. D., Schmeck\*, B., Ayim, A., Hocke, A. C., Brell, B., Hammerschmidt, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. *Thromb Haemost.* 2005, 94(2): 295-303.  
\*) Geteilte Erstautorenschaft

Pneumokokkeninfektionen wie Otitis media, Meningitis und Sepsis erfordern eine hämatogene Streuung der Erreger. Dabei ist das Endothel den Pneumokokken und ihren Pathogenitätsfaktoren unmittelbar ausgesetzt und muss bei einer Invasion überwunden werden. Wir haben daher die Hypothese getestet, dass *S. pneumoniae* endotheliale Apoptose induziert.

Unbekapselte Pneumokokken induzierten sowohl in venösen als auch in pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen starke Apoptose, während bekapselte Pneumokokken überwiegend Nekrose verursachten. Pneumolysin-defiziente Bakterien induzierten etwas weniger programmierten Zelltod in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene. In den apoptotischen Zellen fand sich eine vermehrte Spaltung und Aktivität der Caspasen 6 und 9, aber nur wenig Caspase 3-Aktivierung. Der programmierte Zelltod wurde durch einen Pan-Caspaseninhibitor deutlich gehemmt. Reduzierte Mengen von Bcl2 und ein zytosolischer Anstieg des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) in pneumokokkeninfizierten Zellen implizierte die Aktivierung mitochondrialer Signalwege. Caspasenaktivierung und Apoptose konnten durch eine pharmakologische cAMP-Erhöhung blockiert werden. Auch eine Inhibition der p38 MAP-Kinase und der JNK, die beide in pneumokokkeninfiziertem Endothel aktiviert wurden, reduzierten die Caspasenaktivierung und den programmierten Zelltod deutlich.

Zusammenfassend ist die pneumokokkeninduzierten endothelialen Apoptose abhängig von Caspasen und MAP-Kinasen.

Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A. C., **Schmeck, B.**, Hippenstiel, S., Berger, K., Mitchell, T. J., de los Toyos, J. R., Rosseau, S., Suttorp, N., Schutte, H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 2006, 34(7): 1947-54.

Die akute respiratorische Insuffizienz ist eine wesentliche Komplikation der schweren Pneumokokkenpneumonie. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch nicht genau untersucht. Wir beobachteten nach einer pulmonalen Infektion mit *S. pneumoniae* im Mausmodell eine Undichtigkeit der kleinen Lungengefäße und nahmen an, dass Pneumolysin, einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*, die Ursache für diese frühzeitige Lungenschädigung sein könnte.

Ventilierte und blutfrei perfundierte Mauslungen wurden daher mit rekombinantem Pneumolysin über die Atemwege oder über die Blutgefäße exponiert. Aerosolisiertes Pneumolysin steigerte dosisabhängig die kapilläre Permeabilität und führte so zu einem schweren Lungenödem. Dabei wurde der pulmonale Gefäßwiderstand jedoch nicht beeinflusst. Intravaskuläres Pneumolysin führte dagegen neben einer dosisabhängigen Zunahme der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität auch zu einem dramatischen Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes. Dabei konnte Pneumolysin immunhistochemisch überwiegend in den Wänden der Pulmonalarterien nachgewiesen werden, die auch eine starke Vasokonstriktion aufwiesen. Weiterhin steigerte Pneumolysin auch die hydraulische Konduktivität und reduzierte die elektrische Impedanz von Zellrasen humaner umbilikalvenöser Endothelzellen und humaner alveolärer Epithelzellen im Sinne einer gesteigerten Permeabilität. In der Immunfluoreszenzmikroskopie fanden sich in pneumolysinexponierten Endothelzellen eine Zunahme intrazellulärer Zwischenräume und eine moderate Zunahme von Stressfasern.

Diese Ergebnisse weisen auf eine zentrale Rolle von Pneumolysin bei der frühzeitigen Lungenschädigung in der Pneumokokkenpneumonie durch Schädigung der pulmonalen mikrovaskulären Barrierefunktion und Induktion einer schweren pulmonalen Hypertonie hin.