

3 DISKUSSION

3.1 Pathogen-Wirtszell-Interaktion

Das Lungenepithel erfüllt die notwendigen Voraussetzungen zur Erkennung von *S. pneumoniae* und zur Aktivierung des Immunsystems in der beginnenden Pneumonie: Mit transmembranären und zytosolischen Rezeptoren werden ganze Pneumokokken und einzelne Bestandteile erkannt und komplexe Aktivierungsmuster der lokalen und systemischen Inflammation über differenzierte Signalwege angesteuert [36, 47].

Die komplexe Antwort des Lungenepithels auf Atemwegskeime spiegelt die große Breite an Stimuli und Signalkaskaden wieder. Die epitheliale Antwort beinhaltet die Produktion und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren wie Zytokine und Chemokine, die Expression epithelialer Adhäsionsmoleküle und die Freisetzung antimikrobieller Peptide [34].

So führt zum Beispiel die Exposition von Bronchialepithel mit Bakterien (u.a. *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *M. catharalis*) oder aufgereinigten Virulenzfaktoren (etwa Flagellin, Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure) zur Freisetzung des chemotaktischen Zytokins IL-8 [34, 37]. Dieses scheint eine wichtige Rolle in der pulmonalen Inflammation zu spielen. Die Stimulation verschiedener Pathogenerkennungsrezeptoren (u.a. TLR2, 4, 9) resultiert auch in der Freisetzung von TNF α und IL-6 [37, 54, 55]. Durch auto- und parakrine Stimulation kommt es dann zur Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren. So ergab eine systematische Analyse des Transkriptoms von TNF α - und IL-1 β -exponierten primären humanen Bronchialepithelzellen über 60 regulierte Gene, u.a. Proteasen und Antiproteasen, Adhäsionsmoleküle, sowie Zyto- und Chemokine [56].

Weiterhin deutet die in Mauslungen und humanen Bronchialepithelzellen beobachtete Freisetzung von Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) durch eine Pneumokokkeninfektion sogar auf systemische Effekte der pulmonalen Infektion hin [35]. GM-CSF kann zur Aktivierung unreifer Vorläuferzellen im Knochenmark führen [57].

Auch der Arachidonsäuremetabolismus ist in die Entzündungsreaktion involviert. In pneumokokkeninfiziertem Bronchialepithel und Lungen von Mäusen mit Pneumokokkenpneumonie zeigte sich eine vermehrte Cyclooxygenase 2-Expression und subsequenter Prostaglandin E2 (PGE2) Freisetzung [58]. PGE2 kann wiederum

Immunzellen, die Verteilung der Blutzirkulation und die Lungenfunktion beeinflussen [59].

Auf diese Weise interagiert das Lungenepithel sehr eng mit anderen Effektoren der angeborenen und spezifischen Immunität, wie etwa Phagozyten (Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen), natürlichen Killerzellen und Lymphozyten [60-64].

Welche individuellen Rollen den Lungenepithelzellen und den Effektorzellen der hämatogenen Reihe in der pulmonalen Infektion zukommen, ist noch nicht umfassend geklärt und scheint auch von der Art der Inflammation abzuhängen. So ist etwa in *P. aeruginosa*-infizierten Lungen chimerer Mäuse die Expression von MyD88 in nicht dem Knochenmark entstammenden Zellen für die frühe Infektionskontrolle, die Zytokinproduktion und die Neutrophilenchemotaxis notwendig [65]. Für eine längerfristige Kontrolle der Erreger bedarf es jedoch parenchymaler und hämatopoetischer Zellen [65]. Nach einer Endotoxin-Inhalation ist die Zytokinfreisetzung bei MyD88-chimeren Mäusen vor allem von hämatopoetischen Zellen abhängig, während die Bronchokonstriktion von Parenchymzellen gesteuert wird [66]. Andererseits führte eine Inhibition des nukleären Faktors κB (NF- κB) im distalen Lungenepithel zu einer reduzierten Zytokinfreisetzung und Rekrutierung Neutrophiler Granulozyten nach Endotoxin-Stimulation [67, 68].

3.2 Signalweiterleitung

Nach Erkennung bakterieller Pathogene oder ihrer Bestandteile, wie LPS, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan oder Pneumolysin, durch Mustererkennungsrezeptoren, z.B. der TLR- oder Nod-Familie werden einige spezifische Signalwege aktiviert, die an zentralen Stellen durch chemische Inhibitoren therapeutisch beeinflusst werden können.

Als zentraler Regulator der proinflammatorischen Genregulation wird durch Pneumokokken TLR1/2 und Nod2-abhängig der Transkriptionsfaktor NF- κB aktiviert. Der prototypische Inhibitor $\kappa\text{B}\alpha$ wird nach einer Pneumokokkeninfektion degradiert. So kann der Heterodimer p65/p50 in den Kern translozieren und an den Genpromotor für IL-8 binden. NF- κB spielt eine zentrale Rolle in inflammatorischen Prozessen verschiedenster Genese in fast allen Geweben und Zelltypen, unterscheidet sich jedoch in seiner Aktivierung – kanonisch oder alternativ – und in

der Komposition der Dimere, die als p50-Homodimer sogar inhibitorisch auf die Gentranskription wirken können [52]. Auch in der Karzinogenese wird NF- κ B eine Bedeutung zugemessen. Daher werden spezifische Inhibitoren, überwiegend des I κ B-Kinasen-Komplexes, entwickelt und als Therapeutikum bei Hyperinflammation oder Krebs erprobt. Aber auch seit langem bekannte antiinflammatorische Substanzen, wie die Acetylsalicylsäure, inhibieren den kanonischen NF- κ B-Weg [69], während Glucocorticoide die NF- κ B-abhängige Gentranskription auf der Chromatinebene hemmen [70].

Gleichzeitig wird ein weiterer Signalweg aktiviert [35]: Eine Kinasenkaskade, in deren Zentrum die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 (p38 MAP Kinase) steht [35]. Beide Wege konvergieren im Kern (Abb. 5): Nur wenn der an den Genpromotor gebundene Transkriptionsfaktor NF- κ B an Serin 536 p38-abhängig phosphoryliert ist, erfolgt die Gentranskription [35]. Diese Kinase ist ein wichtiger Bestandteil der pulmonalen Entzündungsreaktion [71]. Kommt es im Rahmen einer respiratorischen Infektion zu einer überschießenden Inflammation wie bei der Sepsis, kann ihre Hemmung möglicherweise therapeutisch genutzt werden, um z. B. die Ausbildung eines parapneumonischen ARDS zu verhindern: p38-Inhibitoren können Versuchstiere vor einem tödlichen septischen Schock schützen. Bei gesunden Freiwilligen konnten p38-Inhibitoren die Entzündungsreaktion in den Atemwegen nach Endotoxininhalation kupieren [72]. Diese anti-inflammatorische Wirkung durch p38-Inhibitoren wird u.a. durch eine Blockade des zentralen Transkriptionsfaktors NF- κ B erreicht [35]. Beide Signalwege, der p38 MAP-Kinasenweg und der kanonische NF- κ B-Weg, wurden auch in den Lungen von Mäusen mit Pneumokokkenpneumonien aktiviert.

Am Model der *Listeria monocytogenes*-Infektion zeigte sich noch eine weitere Ebene der Genregulation durch die p38 MAP-Kinase: Die Vorbereitung der Chromatinstruktur des Genpromotors für die Bindung von Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II durch Histonmodifikationen. Die dafür notwendige Phosphorylierung und Acetylierung der Histone H3 und H4 am *i/8*-Promotor war von der *L. monocytogenes*-induzierten p38 MAPK-Aktivierung abhängig [49].

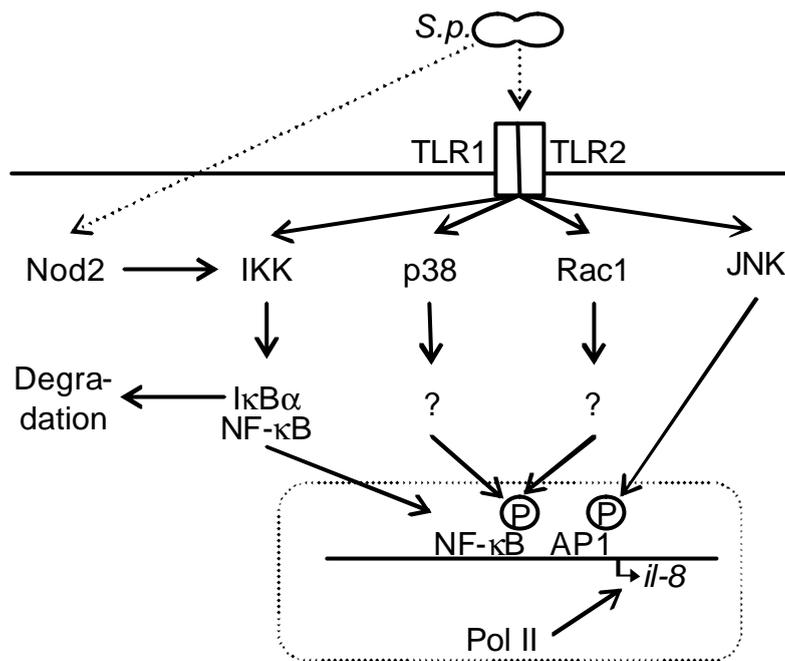


Abb. 5: In dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktion der *S. pneumoniae*-induzierten IL-8 Expression in Lungenepithelzellen.

Rac1 ist als kleines, GTP-bindendes Protein der Rho-Familie ursprünglich als molekularer Schalter der Zellmigration untersucht worden [73]. Jedoch gibt es auch zunehmend Hinweise für seine Bedeutung in der TLR2- und TLR4-Signaltransduktion [74, 75]. Es zeigte sich, dass Rac1 auch für die pneumokokkeninduzierte Phosphorylierung von NF-κB und damit für die *il8* Gentranskription in humanen Lungenepithelzellen von kritischer Bedeutung ist. Gleichermäßen wurde Rac1 als zentrales Element der NF-κB-Aktivierung in Epithelzellen durch Yersinien [76] beschrieben. Bei der Infektion humaner Endothelzellen durch *Listeria monocytogenes* ist Rac1 jedoch für die die Gentranskription erst ermöglichende Phosphorylierung und Acetylierung der Histone H3 und H4 am *il8* Genpromotor notwendig [77].

Ebenfalls nach der Pneumokokkeninfektion kommt es im Lungenepithel und Endothel zur Phosphorylierung und Aktivierung der JNK. Im Epithel führt dies zur Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der gemeinsam mit NF-κB die IL-8 Expression reguliert. Im Gegensatz dazu ist die JNK-Aktivität nicht für die pneumokokkeninduzierte Cox2-Expression und PGE₂-Freisetzung notwendig. JNK und AP-1 sind bisher überwiegend wegen ihrer wichtigen Rolle in der Karzinogenese intensiv untersucht worden [78]. Es wurden auch hier spezifische chemische Inhibitoren entwickelt, deren Einsatz primär als Chemotherapeutikum in

der Onkologie gedacht war, die jedoch auch im Kontext der Hyperinflammation zur Anwendung kommen könnten [79].

3.3 Apoptose

In der bakteriellen Pneumonie ist das bronchiale Epithel jedoch auch eine mechanische Barriere zwischen den bakteriell besiedelten oder infizierten Atemwegen und dem Blutstrom und damit dem Gesamtorganismus.

Um dieses Hindernis zu überwinden, haben Bakterien verschiedene Strategien entwickelt. *S. pneumoniae* kann zum Beispiel mit Hilfe des IgA-Rezeptors durch die Epithelschicht translozieren, doch ist dieser Weg in seiner Kapazität limitiert [80]. Eine massivere Invasion ist aber nur durch Elimination der Epithel- und Endothelbarriere möglich. Zwei zentrale Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* sind Wasserstoffperoxyd (H_2O_2) und das porenbildende Exotoxin Pneumolysin. Beide können in hoher Konzentration bronchiales Epithel und Endothel in die Nekrose treiben [58, 81]. Über weitere, bisher unbekannte Virulenzfaktoren töten Pneumokokken Epithel und Endothel auch durch Apoptose, den Programmierten Zelltod (s. Abb. 6) [58, 81].

Alle Zellen des Körpers verfügen über einen komplexes, eng reguliertes System von Proteasen (u.a. Caspasen). Es gibt regulatorische Caspasen wie Caspase 8, die durch den Zelltodesrezeptor (Fas/CD95) aktiviert wird, oder Caspase 9, die nach mitochondrialen Membranstörungen Apoptose initiiert. Von ihnen werden Exekutionscaspasen (z. B. Caspase 3 und 6) aktiviert [82]. Spezielle Enzyme spalten die DNA und lösen Organellen auf. Die Überbleibsel der Zellen werden in membranumschlossene Vesikel verpackt, die vom benachbarten Gewebe ohne Entzündungsreaktion abgebaut werden. Dieser Prozess eliminiert geschädigte oder infizierte Zellen und schützt so den Organismus [83]. Bei Krankheiten kommt es oft zu einer Störung der Apoptose. Sie kann zum Beispiel durch Genmutationen pathologisch gehemmt (etwa bei malignen Neoplasien) oder durch virale Infektionen krankhaft gesteigert sein (etwa bei HIV-infizierten T-Lymphozyten) [84].

Pneumokokken induzieren Apoptose des Bronchialepithels und Endothels über mitochondriale Proteine und die Caspase 6 [58, 81]. Dadurch können die Erreger leichter in das Gewebe und die Blutbahn eindringen. Im Gegenzug wird in der pneumonischen Mauslunge das mitochondriale Protein Bcl-2 vermehrt exprimiert,

welches das Epithel teilweise vor bakterieninduzierter Apoptose schützt [81]. Im Endothel haben auch die MAP-Kinasen eine besondere Bedeutung für die pneumokokkeninduzierte Apoptose [58].

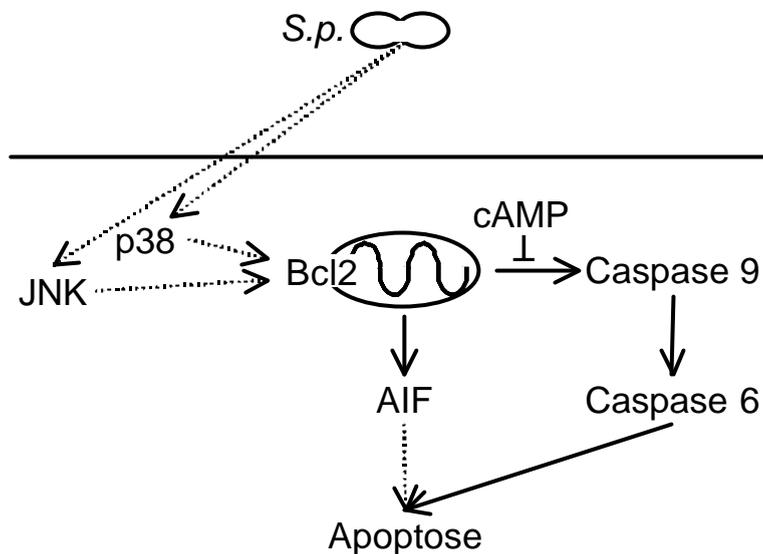


Abb. 6: In dieser Arbeit untersuchte Signaltransduktion der *S. pneumoniae*-induzierten Apoptose in Endothelzellen.

Einige Studien deuten auf einen Überlebensvorteil durch Apoptosehemmung in der Sepsis hin [85, 86]. Auch bei einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis erwies sich eine Caspaseninhibition als vorteilhaft weil neuroprotektiv [87]. Bei anderen Keimen, etwa *P. aeruginosa* scheint die epitheliale Apoptose allerdings für eine erfolgreiche Lyse der Pneumonie notwendig zu sein [88]. Somit bleibt das therapeutische Potential einer Apoptosehemmung in der Pneumokokkenpneumonie vorerst unklar.

3.4 Ausblick

Obwohl die Pneumokokkenpneumonie eine weltweit sehr häufige Erkrankung ist, die Millionen Todesfälle jährlich verursacht, sind zentrale Mechanismen der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und der ersten Barriere gegen ihre Invasion, dem Lungenepithel, noch ungeklärt. Die Expression von transmembranären und zytosolischen Pathogenerkennungsrezeptoren und deren epithelspezifische

Signalwege waren weitgehend unbekannt und konnten in dieser Arbeit teilweise aufgeklärt werden. Weitere Details dieser Signalwege wurden von klassischen Immunzellen der hämatogenen Reihe deduziert, obwohl wichtige Unterschiede bestehen mögen. Auch organspezifische Besonderheiten der Lunge zu den mukosalen Organen des Gastrointestinaltraktes und den soliden Organen wurden bisher nur wenig beachtet. Weiterhin wurde die immunmodulatorische Rolle der Surfactantproteine in der Alveolarflüssigkeit bisher nur unzureichend charakterisiert [89-92]. Und schließlich wird in Zukunft die Betrachtung der Lungenimmunität bei Koinfektionen mehrerer Atemwegsbakterien oder von Bakterien und Erkältungs- oder Influenzaviren eine große methodische und konzeptionelle Herausforderung darstellen.

Neben den bisher betrachteten Mechanismen der Entzündung sollten in weiteren Studien auch die kontrollierte Beendigung der Inflammation und lokale Reparaturmechanismen nach der Pneumonie mehr Beachtung finden. In der Lunge ist die Bewahrung oder Rekonstitution einer sehr filigranen Organstruktur mit einer sehr großen Oberfläche zur Gewährleistung des Gasaustausches und damit der körperlichen Leistungsfähigkeit notwendig. Dies impliziert eine viel engere Steuerung und Limitierung der Entzündungsreaktion, als dies in soliden Organen der Fall ist [93-95]. So erscheint es, ähnlich wie im Darm, notwendig, die Initiierung von Entzündungsreaktionen durch zufällige und harmlose Umweltantigene möglichst zu verhindern [96, 97]. Gerade in landwirtschaftlich geprägter Umgebung ist die Konzentration von Endotoxin sehr hoch und könnten so zur chronischen Inflammation der Atemwege führen [98, 99]. Mögliche Mechanismen dies zu verhindern sind eine Limitierung der proinflammatorischen Aktivierung des Lungenepithels durch Restriktion der Pathogenerkennungsrezeptoren auf der Oberfläche [55, 100], eine reduzierte Expression von Signalmolekülen (wie z.B. für MD-2 gezeigt) oder die Bildung spezifischer inhibitorischer Proteine (wie z.B. TOLLIP) [101-103].

Angetrieben durch die ständige Zunahme von Resistenzen in der antimikrobiellen Therapie und beflügelt durch eine atemberaubende Weiterentwicklung der experimentellen Methodik in der biomedizinischen Forschung nehmen wir an einem rasanten Erkenntniszuwachs auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten teil. Die Halbwertszeit unseres immunologischen und mikrobiellen Wissens war noch nie so kurz. Daher darf die Klinik nicht den Anschluss an die biomedizinische Forschung

verlieren. Es verbleibt eine Vielzahl von Fragen über die Pneumokokkenpneumonie, speziell die molekulare Interaktion von *S. pneumoniae* mit dem Lungenepithel und ihre Bedeutung für den Verlauf der Entzündung. Eine genauere Analyse mag die Basis für eine rationale Entwicklung neuer therapeutischer Strategien legen.