

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

DISSERTATION

Bedeutung der Protein Kinase C für die  
Pneumokokken-induzierte Aktivierung bronchialer Epithelzellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Elizabeth Vallebella Pastén

aus Punta Arenas - Chile

Gutachter: 1. Priv.- Doz. Dr. med. B. Schmeck

2. Prof. Dr. J. Lohmeyer

3. Priv.- Doz. Dr. S. Fischer

Datum der Promotion: 03. September 2010

## Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Aqua bidestillata
AEP	ambulant erworbene Pneumonie
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2- bis- (2-aminophenoxyethane)- N,N,N',N'tetraacetic acid
BEAS–2B	humane Bronchial-Epithelzelllinie
CAP	community acquired pneumonia
CRP	C-reaktives Protein
cfu	colony forming units
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
COX	Zyklooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis 4(8-aminoethylether)N,N'-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FCS	fetal calf serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HAP	hospital acquired pneumonia
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of $\kappa$ B $\alpha$
IKK	I $\kappa$ B kinase
IL	Interleukin

## VERZEICHNIS

---

IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 Trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MARCKS	myristolated alanine rich C kinase substrat
NEP	nosokomial erworbene Pneumonie
NF-κB	Nukleäre Faktor κ B
Nod	nucleotide-binding oligomerization domain
OD	optische Dichte
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PCR	polymerase chain reaction
PDK-1	3- phosphoinositide-dependent kinase
PG	Prostaglandin
PIP <sub>2</sub>	Phosphoinositol-4, 5- Biphosphat
PLC	Phospholipase C
PKC	Protein Kinase C
PMA	phorbol 12- myristate 13- acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POL II	RNA Polymerase II
PRR	pattern recognition receptor
RKI	Robert Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

## VERZEICHNIS

---

STIKO	Ständige Impfkommision
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TXA 2	Thromboxan
U 73122	1-(6-[17beta-3-methoxyestra-1,3,5-(10)triene-17-yl]amino/hexyl) 1H-pyrroledione

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pneumonie	1
1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
1.3	Pulmonale Abwehrmechanismen	7
1.4	Zytokine	13
1.5	Prostaglandinstoffwechsel	14
1.6	Protein Kinase C	17
2	ZIELSETZUNG	22
3	MATERIAL	23
3.1	Zellkultur	23
3.2	Bakterienkultur	23
3.3	Puffer- und Gelzusammensetzung	24
3.4	Chemikalien	28
3.5	Geräte	29
3.6	Verbrauchsmaterial	30
3.7	Software	30
4	METHODEN	31
4.1	Zellkultur	31
4.2	Bakterienkultur	31
4.3	Molekularbiologische Methoden	32
4.4	Statistik	37
5	ERGEBNISSE	38
5.1	Die Aktivierung der Protein Kinase C durch Pneumokokken	38
5.2	Die Inhibition der PKC $\alpha$ und $\beta$ blockiert die Pneumokokken-induzierte Interleukin-8 Transkription und Freisetzung in humanen Bronchialepithelzellen	40

## VERZEICHNIS

---

5.3	Die Inhibition der PKC blockiert die Freisetzung von IL-6 nach Pneumokokkeninfektion humaner Bronchialepithelzellen	42
5.4	Rolle der PKC in der Freisetzung von PGE <sub>2</sub> und COX-2 nach Infektion von Bronchialepithelzellen durch Pneumokokken	43
5.5	Bedeutung der Phospholipase C bei der IL-8 Freisetzung nach Pneumokokkeninfektion von Bronchialepithelzellen	45
5.6	Einfluss von Kalzium auf die IL-8 Freisetzung bei der Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken	46
5.7	Bedeutung der PKC $\alpha$ für die Bindung von NF- $\kappa$ B am <i>il8</i> Promotor bei Inhibition nach Pneumokokkeninfektion von BEAS-2B-Zellen	48
5.8	Bedeutung der PKC $\varepsilon$ in der IL-8 Freisetzung nach Infektion von BEAS-2B-Zellen mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	50
6	DISKUSSION	52
6.1	Aktivierung der Protein Kinase C bei Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	52
6.2	Protein Kinase C und IL-8 Expression	53
6.3	Protein Kinase C und IL-6 Freisetzung	56
6.4	Einfluss von Kalzium und Phospholipase C auf die IL-8 Freisetzung	57
6.5	Protein Kinase C und Prostaglandinstoffwechsel	59
6.6	Ausblick	60
7	ZUSAMMENFASSUNG	62
8	LITERATUR	64
9	ANHANG	78
9.1	Danksagung	78
9.2	Tabellarischer Lebenslauf	79
9.3	Selbständigkeitserklärung	80

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ätiologie der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland	2
Abbildung 2: Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie	3
Abbildung 3: Elektronmikroskopische Aufnahme von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung wichtiger Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
Abbildung 5: TLR Struktur	10
Abbildung 6: NF- $\kappa$ B Signalkaskade	12
Abbildung 7: Signalweg der Prostaglandinfreisetzung	16
Abbildung 8: Struktur und Aktivierung der Protein Kinase C	18
Abbildung 9: Signalweg der Protein Kinase C Aktivierung	20
Abbildung 10: PKC-Aktivität und Translokation in BEAS-2B-Zellen nach <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Infektion	39
Abbildung 11: Transkription und Freisetzung von IL-8 nach Hemmung der PKC Isoformen $\alpha$ und $\beta$ mit spezifischen Inhibitoren in BEAS-2B-Zellen nach <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Infektion	41
Abbildung 12: Einfluss der Inhibition der PKC auf die IL-6 Freisetzung in <i>Streptococcus pneumoniae</i> -stimulierten Bronchialepithelzellen	43
Abbildung 13: Die Inhibition der PKC hemmt die Pneumokokken-induzierte PGE <sub>2</sub> und COX-2 Freisetzung in Bronchialepithelzellen	44
Abbildung 14: Die Inhibition der PLC bewirkt eine Abnahme in der IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken	46
Abbildung 15: Einfluss von Kalzium auf die IL-8 Freisetzung nach <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Infektion von Bronchialepithelzellen	48
Abbildung 16: Bindung von NF- $\kappa$ B am Promotor von <i>il8</i> nach Infektion von BEAS-2B-Zellen mit Pneumokokken	49
Abbildung 17: Hemmung der IL-8 Freisetzung nach Inhibition der PKC $\epsilon$ nach Pneumokokkeninfektion humaner Bronchialepithelzellen	50

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkulturmedien	23
Tabelle 2: Coating-Lösung	23
Tabelle 3: Bakterienkulturmedien	24
Tabelle 4: PCR Puffer und Gel	24
Tabelle 5: Western Blot Puffer	24
Tabelle 6: Western Blot Gele	25
Tabelle 7: IL-8 und IL-6 ELISA Puffer	26
Tabelle 8: CHIP Puffer	26
Tabelle 9: Reaktionsgemischansätze für PCR	27
Tabelle 10: Inhibitoren und Aktivatoren	28
Tabelle 11: Primärantikörper Western Blot	28
Tabelle 12: Sekundärantikörper Western Blot	29
Tabelle 13: Antikörper für CHIP	29
Tabelle 14: Primer	29
Tabelle 15: PCR-Cycler-Programme	34

### 1 Einleitung

Die Pneumonie ist die häufigste Todesursache durch Infektionserkrankungen und die häufigste Ursache für eine Hospitalisierung weltweit (Garibaldi, 1985).

Die bisher verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten sind unzureichend, denn die Erreger der Pneumonie weisen zunehmend Antibiotikaresistenzen auf. Somit nimmt neben der Entwicklung neuer Antibiotika die Dringlichkeit der Erforschung innovativer Therapiestrategien zu (Hippenstiel et al., 2006).

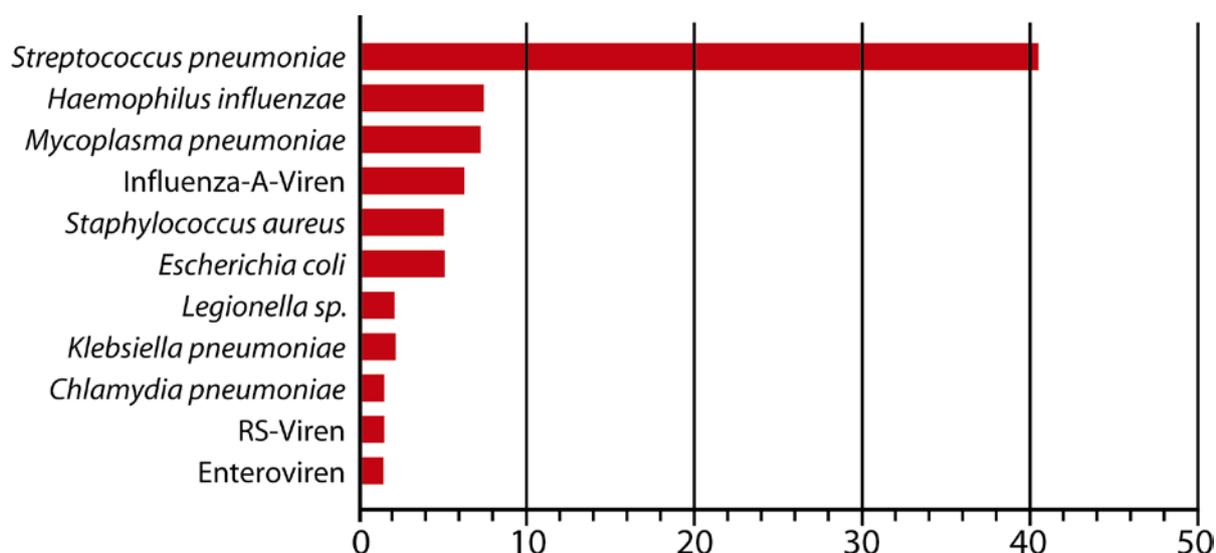
#### 1.1 Pneumonie

Als Pneumonie wird eine Infektion der distalen Atemwege und des Alveolarraums bezeichnet, die durch Akkumulation von Entzündungszellen in den Alveolen charakterisiert ist und nachfolgend eine Beeinträchtigung des Gasaustauschs bedingt (Welte et al., 2004).

Infektiöse Pneumonien werden in zwei Typen unterteilt: **ambulant erworbene Pneumonien** (AEP, englisch: **community-acquired-pneumonia** (CAP)) und **nosokomial erworbene Pneumonien** (NEP, englisch: **hospital-acquired-pneumonia** (HAP)) (Grossman et al., 2005).

Weltweit wird die jährliche Inzidenz der ambulant erworbenen Pneumonie auf 1 bis 4 pro 1.000 Einwohner geschätzt, wobei die Inzidenz und die Intensität der Erkrankung bei jungen Kindern (<5 Jahre) und im Alter (> 60 Jahre) höher sind (Finch, 2001).

Der verursachende Erreger wird trotz intensiver Diagnostik nur in 30 bis 60% aller Fälle identifiziert (Hunterman und Lorenz, 2004). Neben dem am häufigsten isolierten *Streptococcus pneumoniae* werden eine Reihe anderer Erreger wie *C. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *M. pneumoniae*, *S. aureus* und diverse Viren ermittelt (s. Abb. 1) (Woodhead, 2002).



**Abb. 1: Ätiologie der ambulant erworbenen Pneumonie in Deutschland**

Die Abbildung stellt die Erregerhäufigkeit der Pneumonie in einer Studie des Kompetenznetzes CAPNETZ in Prozent dar. Die Ergebnisse beziehen sich auf Patienten mit eitrigem Sputum bzw. positiver Blutkultur. Die Grafik wurde modifiziert nach Welte (Welte, 2006).

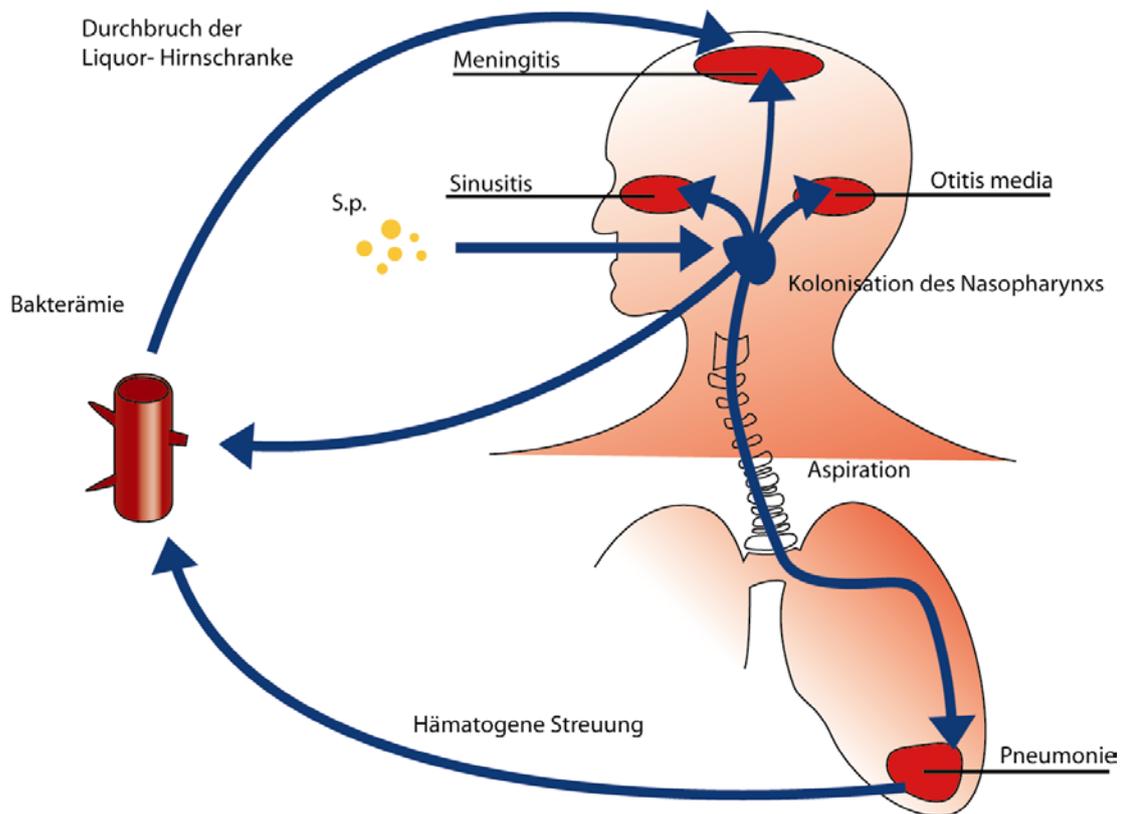
Eine nosokomiale Pneumonie wird als eine 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme oder direkt nach Krankenhausaufenthalt auftretende Infektion definiert. Betroffen sind zumeist Intensivstationspatienten, Patienten in hohem Alter, sowie Patienten nach Aspiration (Masteron et al., 2007). Die Bandbreite der Keime ist groß und oft finden sich Antibiotikaresistenzen. HAP verursacht 15 % der nosokomialen Infektionen und zeigt eine Mortalität von mindestens 30 % (Lynch, 2001).

CAP und HAP stellen eine enorme Belastung für das Gesundheitssystem dar (Nicolau, 2002). Die Einführung von Antibiotika hat die Mortalität nicht gesenkt. Grund hierfür sind die zunehmende Antibiotikaresistenz sowie die steigende Zahl anfälliger Patienten (Hoffken und Niedermann, 2002). Während sich die Prognose jüngerer Patienten verbessert hat, stieg die Erkrankungsrate und Sterblichkeit Älterer (Janssens, 2005).

Die Resistenzraten typischer CAP-Erreger in Europa erhöhten sich innerhalb der letzten 10 bis 15 Jahren rapide. Die Zunahme penizillin- und makrolidresistenter Pneumokokken entwickelt sich zu einem besonderen Problem (Reinert et al., 2004).

Prädisponierende Faktoren wie Alter, Alkoholismus, Diabetes mellitus, Influenza-Infektion, Asplenie und AIDS führen zu einer vermehrten Manifestation der Infektion (Buttery und Moxon, 2002; Jedrzejak, 2001). Die Mikroaspiration wird zudem von mechanischen Faktoren wie geringerem Würgereflex, verminderter mukoziliären Bewegung und gesteigerter Schleimbildung beeinflusst (Rosseau und Suttorp, 2000).

Eine ambulant erworbene akute Pneumonie beginnt plötzlich mit Schüttelfrost, es folgen Fieber, schwere Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Husten und purulentes Sputum. Bei älteren Menschen kann das klinische Bild diskreter sein. Sie fallen durch Schwäche, Anorexie oder abdominelle Schmerzen auf (Bartlett et al., 1998).



**Abb. 2: Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie**

Nach Übertragung durch Tröpfcheninfektion, siedelt sich *S. pneumoniae* im oberen Respirationstrakt an. Später gelangt er transepithelial ins Blut und hämatogen in die Meningen, durch Aspiration in die Alveolen oder durch Aszension in die Nasennebenhöhlen oder ins Mittelohr. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Salyers und Whitt (1994).

Das erste Ziel der Diagnostik der CAP ist die Risikoabschätzung. Leichte Erkrankungen bei ansonsten Gesunden können ohne weitere Maßnahmen antibiotisch therapiert werden. Bei schwerer Symptomatik oder Risikogruppen ist die frühzeitige Thoraxröntgenaufnahme indiziert. Ein mikrobiologisches Präparat und eine Gramfärbung des Sputums ist bei ambulanten Risikopatienten zu entnehmen. Eine weiterführende Diagnostik ist bei stationär behandelten Patienten notwendig.

Eine bronchioalveoläre Lavage sollte bei allen beatmungspflichtigen und bei therapierefraktären Patienten erfolgen. Sollte trotz aller Maßnahmen keine Besserung eintreten, kommen differentialdiagnostisch u.a. ein Lungeninfarkt, ein Malignom, eine Alveolitis oder eine Tuberkulose in Frage (Ewig et al., 2006).

### **1.2 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* wurde 1881 von Pasteur (Frankreich) und von Sternberg (USA) isoliert. Im Jahr 1886 identifizierte Weichselbaum zum ersten Mal *Streptococcus pneumoniae* als Erreger der Pneumonie (Austrian, 1999).

*Streptococcus pneumoniae* ist ein ca. 1 µm großes gram-positives Bakterium. Klinische Isolate können sowohl in Kettenform als auch als charakteristische lanzett-förmige Diplokokken im Sputum isoliert werden. Er ist fakultativ anaerob, Katalase negativ, Oxidase negativ und macht eine  $\alpha$ -Hämolyse auf Blutagarplatten (Kadioglu und Andrew, 2004).

*Streptococcus pneumoniae* ist der am häufigsten nachgewiesene Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (Welte et al., 2006) sowie der häufigste bakterielle Erreger der Otitis media und des Fiebers ohne Fokus bei Säuglingen und Kleinkindern (Huppertz, 2003).

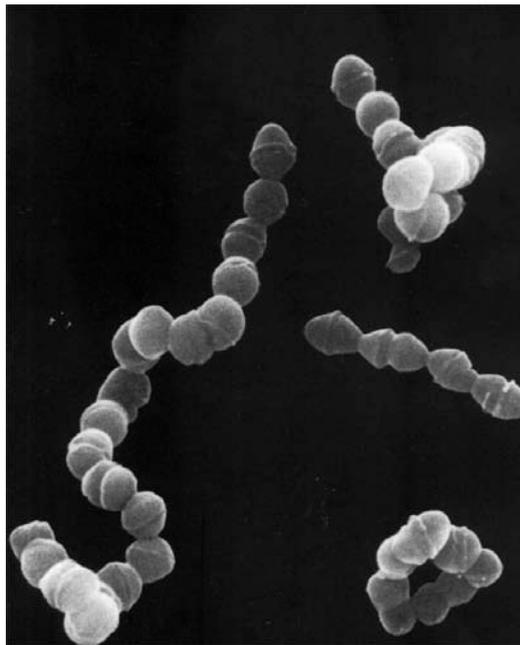
Pneumokokken sind fakultativ pathogene Keime der oberen Luftwege. Nach Übertragung durch Tröpfcheninfektion kolonisieren sie den Nasopharynx durch Adhäsion an zelluläre Bestandteile. Bei 50% aller Kinder und 5% aller Erwachsenen werden Pneumokokken im Nasopharynxabstrich nachgewiesen (Cardozo et al., 2006). Obwohl diese Besiedlung meistens asymptomatisch ist, kann es durch Mikroaspiration

## EINLEITUNG

---

der Bakterien während der ersten Wochen nach Infektion zu der Entwicklung einer Pneumonie kommen (Catterall, 1999).

Die effektivste Prävention der invasiven Pneumokokkeninfektion ist die Impfung. Primäres Ziel einer Impfung gegen Pneumokokken ist es, die Morbidität und die daraus resultierenden Folgen wie Hospitalisierung, Behinderung und Tod zu reduzieren. Eine Impfeempfehlung besteht für Personen über 60 Jahre und Risikopatienten mit chronischen Lungen-, Herz- und Lebererkrankungen, Diabetes mellitus, vor Splenektomie und bei immunsuprimierten Patienten. Die Pneumokokkenvakzine wird aus Kapselpolysacchariden von 23 verschiedenen Serotypen hergestellt, welche für ca. 90% aller Erkrankungen verantwortlich sind (Epidemiologisches Bulletin 10/2009, [www.rki.de](http://www.rki.de)).



**Abb. 3: Elektronmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae***

Die Abbildung zeigt die elektronmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pneumoniae* [www.uni-tuebingen.de/modeling/images/strep.gif](http://www.uni-tuebingen.de/modeling/images/strep.gif)

Die STIKO empfiehlt seit 2006 eine generelle Impfung gegen Pneumokokken für alle Kinder bis 24 Monate. Der Impfstoff ist ein 7-valenter Konjugatimpfstoff. Die Abdeckung

der Serotypen durch den Impfstoff liegt bei Kleinkindern bei 67%, in der Altersgruppe unter 2 Jahren bei 72% (Epidemiologisches Bulletin 31/2006, [www.rki.de](http://www.rki.de)).

### **Virulenzfaktoren**

Es existieren bekapselte und unbekapselte Stämme, allerdings sind bisher nur bekapselte aus klinischem Material isoliert worden (Catterall, 1999). Im direkten Kontakt mit Zellen verliert *Streptococcus pneumoniae* die Kapsel (Hammerschmidt et al, 2005). Anhand der bis heute isolierten Kapselantigene können Pneumokokken in ca. 90 Serotypen eingeteilt werden. Jedoch werden 90% der Pneumonien von nur 23 Serotypen verursacht (Kalin, 1998).

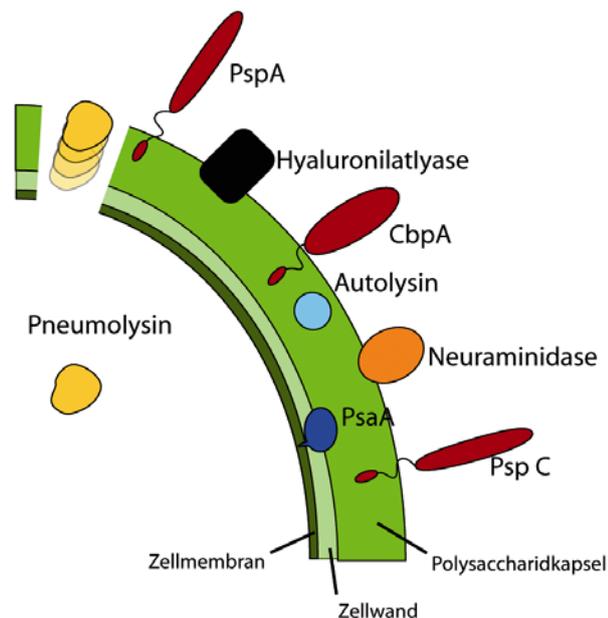
Die Polysaccharidkapsel stellt den wichtigsten Virulenzfaktor dar. Die 200 bis 400 nm dicke Schicht verhindert die Opsonierung und Phagozytose durch die Blockade der Interaktion von Bakterium und Komplementsystem (Kadioglu et al., 2008).

Neben der Kapsel wirken Zellwandkomponenten wie Peptidoglykan, Teichon- und Lipoteichonsäuren via Komplementsystem entzündungsfördernd und induzieren die Freisetzung von Zytokinen (Hausdorff et al., 2005).

Viele Proteine und Enzyme von gram-positiven Bakterien spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen. In den letzten 20 Jahren wurde die Wichtigkeit von Proteinen für die Virulenz von *S. pneumoniae* deutlich. Möglicherweise stellen Antikörper gegen Virulenzfaktoren den Schlüssel für die Entwicklung neuer und effektiverer Impfungen dar. Eine Reihe von Proteinen, wie Pneumolysin, Pneumokokken-Oberflächenprotein A, Pneumokokken-Oberflächenantigen A, Hyaluronsäure, Autolysin, cholinbindendes Protein A und Neuraminidase werden intensiv untersucht (Catterall, 1999, Jedrzejak, 2001).

Die Virulenz und die verschiedenen Funktionen von Pneumolysin sind ein wichtiger Bestandteil der Pneumokokkeninfektion. Es handelt sich um ein 52 kDa lösliches Protein, das in allen isolierten Pneumokokkenstämmen zu finden ist. Im Gegensatz zu anderen Pneumokokken-Antigenen, wird das zytosolische Enzym erst freigesetzt, nachdem die Zellwand durch Autolysin lysiert wird. Auf diese Weise bildet Pneumolysin Poren in der Zellmembran infizierter Zellen und zerstört sie (Paton et al., 1993). Bei

niedrigeren Konzentrationen ist es für viele Zellen toxisch und aktiviert das Komplementsystem. Ferner kann es zu einer Hemmung der Clearance der oberen Atemwege durch eine Inhibition der ziliären Aktivität der Bronchialepithelzellen führen (Feldman et al., 1991; Cockeran et al., 2001).



**Abb. 4: Schematische Darstellung wichtiger Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae***

Diese Abbildung zeigt einige der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*. Sie beinhaltet Polysaccharidkapsel, Pneumolysin und mehrere Oberflächenstrukturen (hier gezeigt: engl.: „choline binding protein A“ (CbpA), „pneumococcal surface protein A“ (PspA), „pneumococcal surface protein C“ (PspC), „pneumococcal surface antigen A“ (PsaA)). Die Abbildung wurde modifiziert nach Jedrzejewski (Jedrzejewski, 2001).

### 1.3 Pulmonale Abwehrmechanismen

Die Lunge steht in einer einzigartigen Beziehung zur Umwelt. Obwohl ihre Hauptfunktion der Gasaustausch ist, stellt sie durch den ständigen Kontakt mit Pathogenen eine wichtige Rolle als Schutzbarriere dar. Sie ist deswegen mit einer Reihe von Abwehrmechanismen ausgestattet. Dazu zählen mechanische Barrieren wie die dichotome Aufzweigung der Bronchien, der Hustenreflex, die mukoziliäre Clearance und die Schleimproduktion (Mason und Nelson, 2005; Strieter et al., 2003). Kommen Mikroorganismen in Kontakt mit dem Immunsystem, können eine antigen-unspezifische

Immunität, das angeborene Immunsystem, und eine antigen-spezifische Immunität, das erworbene oder adaptive Immunsystem, auf die Pathogene reagieren (Martin und Frevert, 2005).

Beim angeborenen Immunsystem handelt es sich um einen schnellen Abwehrmechanismus. Nachdem es lange Zeit als vollkommen unspezifisch betrachtet wurde, zeigen neue Studien auch seine Spezifität. Beispiel hierfür ist die Fähigkeit, Mikroorganismen durch die molekulären Muster an ihrer Oberfläche zu erkennen und zu eliminieren.

Es werden humorale Faktoren und unspezifische Abwehrzellen unterschieden. Humorale Faktoren sind u.a. das Komplementsystem, die Akute-Phase-Proteine und die Zytokine. Bei den Abwehrzellen handelt es sich um Makrophagen, Granulozyten und Natural-Killer-Lymphozyten (Medzhitov und Janeway, 1998).

Das Komplementsystem wird von mehr als dreißig Serum- und Membranproteinen gebildet, die nach einer Aktivierungskaskade Mikroorganismen opsonieren und lysieren können. Den wichtigsten Aktivierungsmechanismus des Komplementsystems bei einer Pneumokokkeninfektion stellt der klassische Weg durch Antikörper-Antigen-Komplexbildung dar (Paterson und Mitchell, 2006). In diesem Fall binden IgM Antikörper an Teichoinsäure in der Zellmembran. Des Weiteren kann *S. pneumoniae* auf Grund seiner Kapsel durch das Komplementsystem opsoniert, aber nicht lysiert werden (Brown et al., 2002).

Eine Schlüsselkomponente des angeborenen Immunsystems sind die sogenannten „**pattern recognition receptors**“ (PRR). Diese Rezeptoren sind in der Lage, hochkonservierte molekuläre Muster eindringender Mikroben zu erkennen. Sie können membranär, intrazellulär oder löslich sein und setzen die Erkennung und Immunantwort gegenüber Bakterien in Gang. Die zu erkennenden mikrobiellen Bestandteile werden **pathogen-associated molecular patterns** (PAMPs) genannt (Janeway and Medzhitov, 2002).

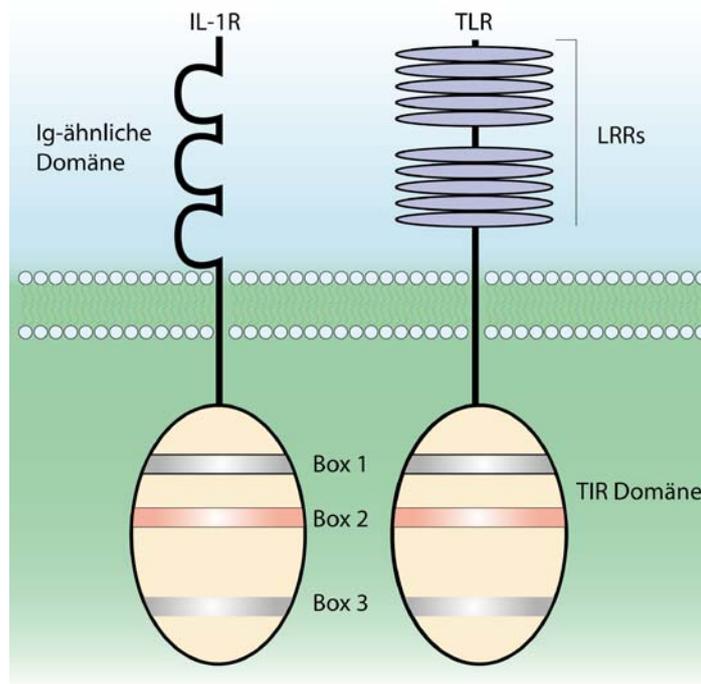
Unter den wichtigsten PRR finden sich die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLR). Die Entdeckung der TLR Familie begann mit der Identifizierung von Toll, einem für die dorsoventrale Polarisierung der Embryogenese entscheidenden Gen in Insekten

(Hashimoto et al., 1988). Anschließend zeigte sich, dass Toll ein essentieller Rezeptor für die angeborene Immunantwort bei Pilzinfektionen in *Drosophila melanogaster* darstellte (Lemaitre et al., 1996). Die in den letzten Jahren identifizierten humanen Toll-Homologen regulieren durch die Aktivierung von Signalkaskaden die Expression von Genen der Immunantwort (Takeda und Akira, 2005).

Toll-like Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne leuzinreicher Wiederholungen, sowie einer zytoplasmatischen Domäne, die wegen ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor als TIR- (Toll/IL-1-Rezeptor) Domäne bezeichnet wird. Die Lokalisation der unterschiedlichen TLRs steht im direkten Zusammenhang mit den molekulären Mustern der Liganden. TLR 1, TLR 2, TLR 4 und TLR 6 befinden sich an der Zelloberfläche und werden nach Aktivierung durch die spezifischen Liganden zu Phagosomen rekrutiert. Weitere Toll-like Rezeptoren werden nicht an der Zelloberfläche exprimiert. Darunter befinden sich zum Beispiel diejenigen, die in der Erkennung von Nukleinsäure-ähnlichen Strukturen involviert sind (Akira und Takeda, 2004).

Für die Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* wurden bis jetzt mehrere TLRs verantwortlich gemacht. Offenbar erkennen TLR 1/2- und TLR 2/6-Komplexe die Lipoteichonsäure und das Zellwandpeptidoglykan von *Streptococcus pneumoniae* (Schroder et al., 2003; Schmeck et al., 2006). Pneumolysin steuert seine proinflammatorische Wirkung durch Bindung an TLR 4 (Malley et al., 2003). Ebenso ist TLR 9 an der Erkennung der unmethylierten CpG-Dinukleotide von Pneumokokken beteiligt (Albiger et al., 2007).

Neben den membranständigen TLRs existieren intrazelluläre PRRs, die Nod-Proteine (nukleotide-binding oligomerization domain). Sie können nicht nur intrazelluläre Erreger, sondern auch bakterielle Bestandteile erkennen. Sie enthalten eine zentrale Nukleotid-bindende Domäne (Nod), eine N-terminale Effektor-bindende Domäne, sowie eine C-terminale Ligand-bindende Domäne (Leucin-rich repeats, LRRs) (Inohara et al., 2005). Die Nod-Familie besteht aus mehr als 20 Proteinen, wobei in den menschlichen Lungenepithelzellen zwei von den meist untersuchten löslichen PRRs vorhanden sind: Nod1 und Nod2. Beide können von Peptidoglykanbestandteilen gram-positiver und gram-negativer Bakterien aktiviert werden.



**Abb. 5: TLR Struktur**

Toll-like Rezeptoren (TLR) und Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R) weisen eine konservierte zytosmatische Domäne auf, die Toll /IL-1 Rezeptor Domäne (TIR). Sie zeichnet sich aus durch den Besitz von drei homologen Bereichen, bekannt als Box 1, 2 und 3. Trotz der Ähnlichkeit der zytosmatischen Domänen unterscheiden sich die extrazellulären Regionen stark. Während die TLRs über leuzinreiche Wiederholungen (LRR) verfügen, hat IL-1R drei immunoglobulinähnlichen Domänen (Akira und Takeda, 2004).

Die Infektion von Lungenepithelzellen mit *S. pneumoniae* bewirkt *in vitro* und bei infizierten Lungen von Mäusen eine Zunahme der Expression von Nod1 und Nod2. Darüber hinaus werden intrazelluläre Pneumokokken von Nod2, jedoch nicht von Nod1, erkannt (Opitz et al., 2004).

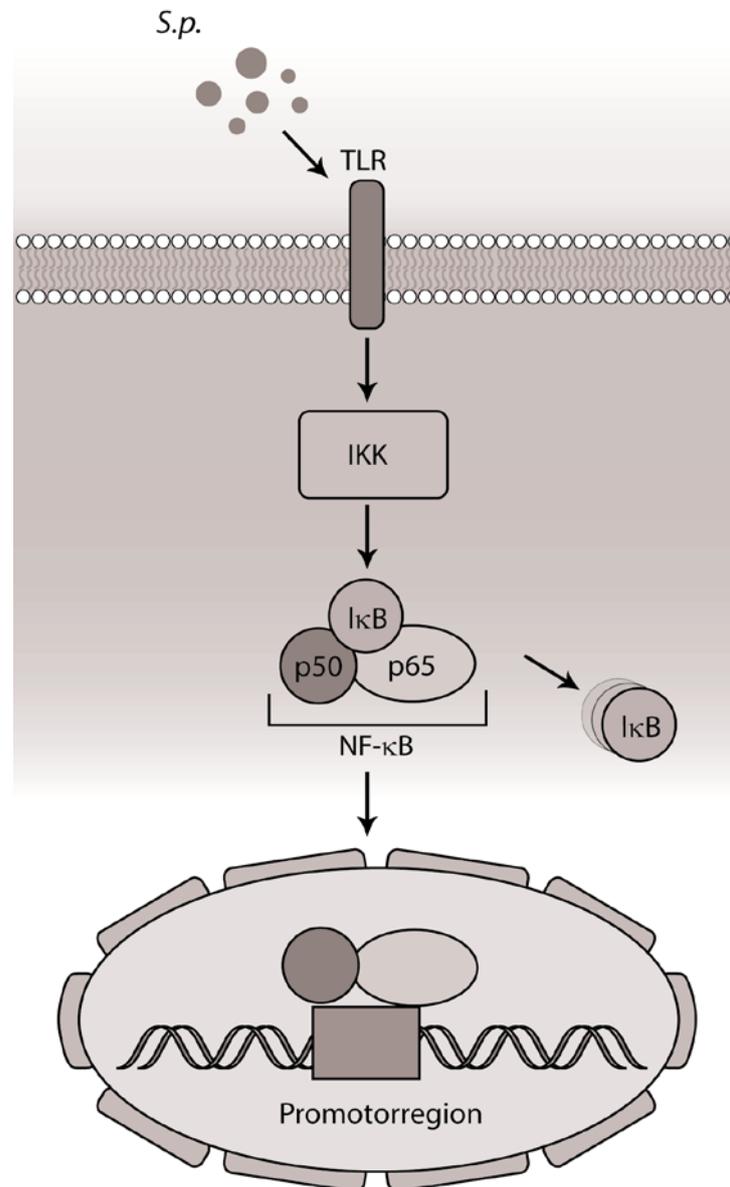
Das Surfactant ist eine Mischung von Lipiden und Proteinen, das einen Kollaps der Alveolen während der Expiration verhindert. Die **Surfactant Proteine (SP)** SP-A und SP-D werden von Alveolarzellen Typ 2 sezerniert. Sie sind lösliche PRRs und stellen so einen wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort in der Lunge dar (Crouch und Wright, 2001). Liegt ein Surfactantmangel vor, wie es bei SP-D Knockout-Mäusen der Fall ist, kommt es nach Kolonisation der oberen Atemwege mit *Streptococcus*

*pneumoniae* zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen der oberen und unteren Atemwege (Jounblat et al., 2005). Die Phagozytose von *Streptococcus pneumoniae* in Alveolarmakrophagen von Mäusen wird durch SP-A begünstigt (Kuronuma et al., 2004).

Die Erkennung von PAMPs durch membranständige und lösliche PRR aktiviert ein Netzwerk von Signaltransduktionswegen. Die Hauptrolle spielt hier die Stimulation der nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) -abhängigen Transkription. Zur Familie der NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktoren gehören NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. Sie befinden sich in inaktiver Form im Zytosol als an I $\kappa$ B-Moleküle (Inhibitor-Proteine von NF- $\kappa$ B) gebundene Homo- oder Heterodimere. Die Aktivierung des TLR und die darauf folgende Bildung eines Proteinkomplexes führt zu einer Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Moleküle durch die I $\kappa$ B-Kinasen (IKK). I $\kappa$ B wird degradiert und es kommt zu einer NF- $\kappa$ B Translokation in den Nukleus. Hier kann die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription starten (Greene und McElvaney, 2005; Akira und Takeda, 2004; Bonizzi und Karin, 2004).

Ein anderer wichtiger Signalweg beinhaltet **Mitogen-aktivierte Protein Kinasen** (MAPK) wie die **extracellular signal-regulated Kinase** (ERK), die **c-Jun N-terminal Kinase** (JNK) und die p38 MAPK (Hippenstiel et al., 2006).

Es gibt Hinweise, dass neben den eben genannten Signalwegen, Tyrosin-Kinasen (Ulanova et al., 2005) oder Protein Kinase C (Hippenstiel et al., 1998) eine weitere wichtige Rolle in der Zellaktivierung spielen.



**Abb. 6: NF-κB Signalkaskade**

Die Abbildung zeigt die Aktivierung des NF-κB Weges anhand des klassischen NF-κB Heterodimeres p50/p65. Inaktive NF-κB-Dimere sind im Zytosol an verschiedenen Isoformen der Inhibitor-Proteine der IκB-Familie gebunden. Nach Erkennung von mikrobiellen Bestandteilen durch TLR wird die NF-κB Signalkaskade aktiviert. Die Bildung eines Proteinkomplexes führt zu einer Phosphorylierung der IκB-Moleküle durch die IκB-Kinasen (IKK). Die Bindung von IκB an NF-κB löst sich, die IκB-Moleküle werden degradiert, und die NF-κB Heterodimere translozieren in den Nukleus. Hier kann die NF-κB-abhängige Gentranskription starten. Die Abbildung wurde nach Akira und Takeda modifiziert (Akira und Takeda, 2004).

### 1.4 Zytokine

Die Lunge ist wegen ihres engen Kontaktes mit der Umwelt auf eine strenge Kontrolle und Koordination von inflammatorischen und immunologischen Prozessen angewiesen. Zu den wichtigsten Regulationsmechanismen zählen die Zytokine (Strieter, 2003).

Zytokine sind 8-26 kD große Signalmoleküle. Sie werden von den Zellen des Immunsystems nach Kontakt mit einem Erreger freigesetzt und können ihre Wirkung autokrin, parakrin und endokrin entfalten. Sie steuern auf diese Weise Migration, Differenzierung, Wachstum und Zelltod während der Immunantwort (Toews, 2001). Chemokine sind chemotaktische Zytokine.

Je nachdem wie die Zytokine die Immunantwort beeinflussen, können sie proinflammatorisch oder antiinflammatorisch wirken. Die proinflammatorischen Zytokine, z.B. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-8 und GM-CSF, fördern die Entzündung durch die Einwanderung von Leukozyten und die Expression von Adhäsionsmolekülen. Antiinflammatorische Zytokine dämpfen die Entzündungsreaktion ein und verhindern so eine übermäßige Zerstörung von Gewebe. Beispiel hierfür sind IL-10 und IL-4. Gerät die Interaktion zwischen beiden Gruppen aus dem Gleichgewicht, kann die Gewebsschädigung außer Kontrolle geraten und sogar zu multiplen Organversagen und Sepsis führen (Netea et al., 2003).

#### 1.4.1 Interleukin-8

Bei humanem Interleukin-8 (IL-8) handelt es sich um ein kleines Protein von nur 72 Aminosäuren, das in der Lage ist, durch seine Temperatur-, Säure- und Proteolysestabilität im Entzündungsherd noch Tage nach Beginn der Immunantwort seine Wirkung zu entfalten (Remick, 2005). IL-8 spielt mit seiner starken chemotaktischen Wirkung eine zentrale Rolle im Entzündungsprozess. Dieses proinflammatorische Chemokin wird von den unterschiedlichsten Zellen exprimiert (Hoffmann et al., 2002). In der Lunge sind Makrophagen, Alveolarepithelzellen, Bronchialepithelzellen und Lungenfibroblasten in der Lage, IL-8 zu sezernieren (Delclaux und Azoulay, 2003). IL-8 zeichnet sich durch die besondere Eigenschaft aus, bei einer Reihe verschiedener Stimuli, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ , bakteriellen und viralen

Produkten und Zellstress, von einem niedrigen Grundspiegel zu deutlich höheren Werten anzusteigen (Baggiolini et al., 1994). Der Signalweg der IL-8 Aktivierung beinhaltet NF- $\kappa$ B- und JNK-abhängige Transkription, sowie eine spätere p38 MAPK Aktivierung.

IL-8 trägt während der Pneumokokkenpneumonie wesentlich zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge bei. Die Stimulation mit Pneumokokken induziert NF- $\kappa$ B-abhängig die Expression von IL-8 und die Aktivierung der p38 MAPK in humanen Bronchialepithelzellen (Schmeck et al., 2004).

### 1.4.2 Interleukin-6

Das Chemokin Interleukin-6 (IL-6) spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort, der Bildung von Akute-Phase-Proteinen und der Hämatopoese. Es wird von T- und B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Endothel- und Epithelzellen sezerniert. Bakterienendotoxine, virale Produkte, somatischer Stress und eine Reihe von Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , können die Freisetzung von IL-6 steigern (Nishimoto und Kishimoto, 2006).

Eine Störung in der IL-6 Regulation wird bei autoimmunen und entzündlichen Krankheiten wie Lupus erythematoses, Arthritis rheumatoidea und Morbus Crohn (Kishimoto, 2006) beobachtet. Verschiedene klinische Studien beschreiben bei Morbus Castleman, einer Erkrankung durch eine IL-6 Regulationsstörung, den günstigen Einfluß einer medikamentösen Blockade mit anti-IL-6 Rezeptorantikörpern auf den Krankheitsverlauf. IL-6 besitzt zudem eine prognostische Bedeutung in Trauma und Sepsis (Novotny et al., 2005).

## 1.5 Prostaglandinstoffwechsel

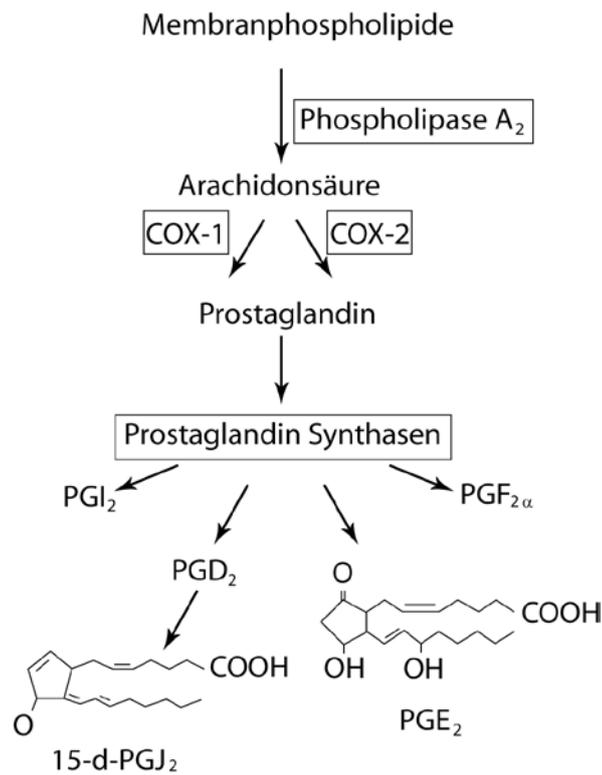
Prostaglandine sind kleine Lipidmoleküle, welche die Prozesse der Nierenfunktion, Thrombozytenaggregation, Neurotransmitterfreisetzung und der Immunantwort regulieren. Prostaglandine werden schnell sezerniert und wirken an der Stelle der Freisetzung durch Bindung an hochspezifische Rezeptoren in der Plasmamembran. Der

Prostaglandinspiegel ist normalerweise niedrig, kann aber bei Entzündungsprozessen schon vor der Rekrutierung von Leukozyten steigen (Harris et al., 2002).

Als Reaktion auf einen adäquaten Stimulus wird aus den Membranphospholipiden durch die Phospholipase A<sub>2</sub> Arachidonsäure freigesetzt. Sie wird von den Zyklooxygenaseenzymen COX-1 und COX-2 zu Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgewandelt. Die Zyklooxygenase 1 (COX-1) wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert und ihre Konzentration nimmt nur bei bestimmten Stimuli wie bakteriellem Lipopolysaccharid zu. Ganz anders stellt sich die Expression der Zyklooxygenase 2 (COX-2) dar. Bei unstimulierten Zellen wird eine niedrige Expression beobachtet und bei einer Entzündung wird die COX-2 stark induziert (Tilley et al., 2001). Zellspezifische Prostaglandin-Synthasen wandeln PGH<sub>2</sub> in die unterschiedlichen Prostaglandine PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> α, PGI<sub>2</sub> und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) um (Harris et al., 2002).

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) wird von vielen Zellen wie Fibroblasten, Makrophagen und manchen malignen Zellen produziert (Park et al., 2006).

Die Bindung an spezifische nukleäre und membranäre Rezeptoren aktiviert über G-Proteine Signalwege der Protein Kinase C, Adenylatzyklase und Protein Kinase A. PGE<sub>2</sub> moduliert die Proliferation, die Apoptose und die Zytokinfreisetzung von B-Lymphozyten. Bei B-Lymphozyten hemmt PGE<sub>2</sub> die Proliferation und Aktivität von unreifen Zellen, ihre Apoptose wird beschleunigt. Reife B-Lymphozyten werden ihrerseits wenig oder gar nicht beeinflusst (Harris et al., 2002). Anders als in vielen anderen Organen hemmt PGE<sub>2</sub> in der Lunge die Immunantwort und beugt so einem Gewebesuntergang vor.



**Abb. 7: Signalweg der Prostaglandinfreisetzung**

Die Arachidonsäure wird aus Membranphospholipiden durch die Phospholipase A<sub>2</sub> freigesetzt. Die Cyclooxygenaseenzyme (COX-1 und COX-2) bilden Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) aus der Arachidonsäure. Prostaglandin H<sub>2</sub> wird durch Prostaglandin-Synthasen in PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> und PGF<sub>2</sub> umgewandelt. Modifiziert nach Harris (Harris et al., 2002)

### 1.6 Protein Kinase C

Seit Entdeckung der Protein Kinase C im Jahr 1977 rückt sie immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Studien (Nishizuka, 1988).

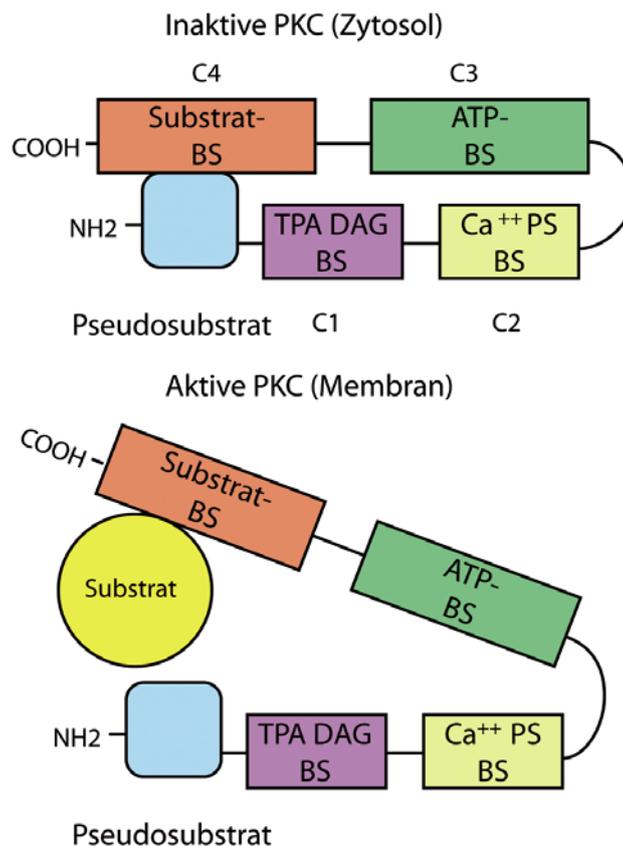
Die Protein Kinase C ist ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion bei einer Reihe physiologischer Prozesse, wie Wachstum, Differenzierung, neurologischer Entwicklung, synaptischer Signalweiterleitung, axonaler Regeneration, Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur, endokriner und exokriner Sekretion. Des Weiteren ist die PKC in zahlreichen pathologischen Prozessen involviert. Bei einer Schädigung der Lunge reguliert sie Zellantworten, wie Endothelpermeabilität, Zellkontraktion, Migration, Proliferation, Apoptose, Mukussekretion und Genexpression (Siflinger-Birnboim und Johnson, 2003).

#### 1.6.1 Struktur

Die Protein Kinase C gehört zur Familie der Serin/Threonin Kinasen. Sie besteht aus einem einzigen Polypeptidstrang mit einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Sie setzt sich aus vier konservierten Domänen (C1- C4) und fünf variablen Domänen zusammen (Coussens et al., 1986).

C1 und C2 stellen die regulatorischen Bereiche dar. C1 beinhaltet zwei Cystein-reiche Sequenzen, die als Bindungsstellen für Diacylglycerol (DAG) und Phorbolster identifiziert wurden. N-terminal zur C1-Domäne befindet sich eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz. Die C2-Domäne enthält Bindungsstellen für saure Lipide und in manchen Subtypen auch für Kalzium. Die C3 und C4 Domänen sind die katalytischen Domänen, sie besitzen Bindungsstellen für ATP und PKC Substrate.

Im inaktiven Zustand der PKC bindet das Pseudosubstrat an die Substratbindungsstellen in C4 und blockiert den Zugang für das eigentliche Zielmolekül. Durch eine Konformationsänderung bei der Aktivierung des Enzyms wird das Pseudosubstrat aus der Bindungsstelle verdrängt, die dadurch für andere Substrate frei wird (Newton, 1995).



**Abb. 8: Struktur und Aktivierung der Protein Kinase C**

Der Polypeptidstrang der PKC besteht aus vier konservierten Bereichen C1-C4 und einer Pseudosubstratsequenz. Er beinhaltet Bindungsstellen (BS) für Substrate, Kalzium, ATP, 2-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), Diacylglycerol (DAG), und Phosphatidylserine (PS). Im inaktiven Zustand bindet das Pseudosubstrat an der Substratbindungsstelle. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung und die Bindungsstelle wird frei. Diese Abbildung wurde leicht modifiziert nach Musashi (Musashi et al., 2000).

### 1.6.2 Isoformen

Die Protein Kinase C wurde auf Grund ihrer Struktur und Fähigkeit Cofaktoren zu binden in drei Gruppen klassifiziert: klassische, neue und atypische PKCs. Während die regulatorische Untereinheit sehr variabel ist, unterscheidet sich die katalytische Domäne der Isoformen kaum. Bis jetzt wurden mindestens elf Isoformen identifiziert (Nishizuka, 1988).

Die klassischen Protein Kinasen C (cPKC) mit den Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta_I$ ,  $\beta_{II}$  und  $\gamma$  werden von Kalzium, Diacylglycerol und Phosphatidylserin aktiviert. Sie wurden als erstes entdeckt und sind die bisher am besten untersuchten.

Die neuen PKC Isoformen (nPKC)  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$  sind den klassischen PKCs in der Struktur sehr ähnlich. Ein Mangel an bestimmten Aminosäuren in C2 führt zu einer Veränderung in den Bindungsstellen für Kalzium. In diesem Fall erfolgt die Aktivierung nur über Diacylglycerol und Phosphatidylserin.

Zu den atypischen Protein Kinasen (aPKC) zählen die Isoformen  $\zeta$ ,  $\lambda$  und  $\iota$ . Durch eine veränderte C2 Untereinheit und eine C1 Region ohne Bindungsstellen für Kalzium oder Diacylglycerol unterscheiden sie sich deutlich von den anderen. Ihre Aktivität wird durch Phosphatidylserin gesteuert (Newton, 1995; Siflinger-Birnboim und Johnson, 2003; Spitaler und Cantrell, 2004).

### 1.6.3 Aktivierungsweg

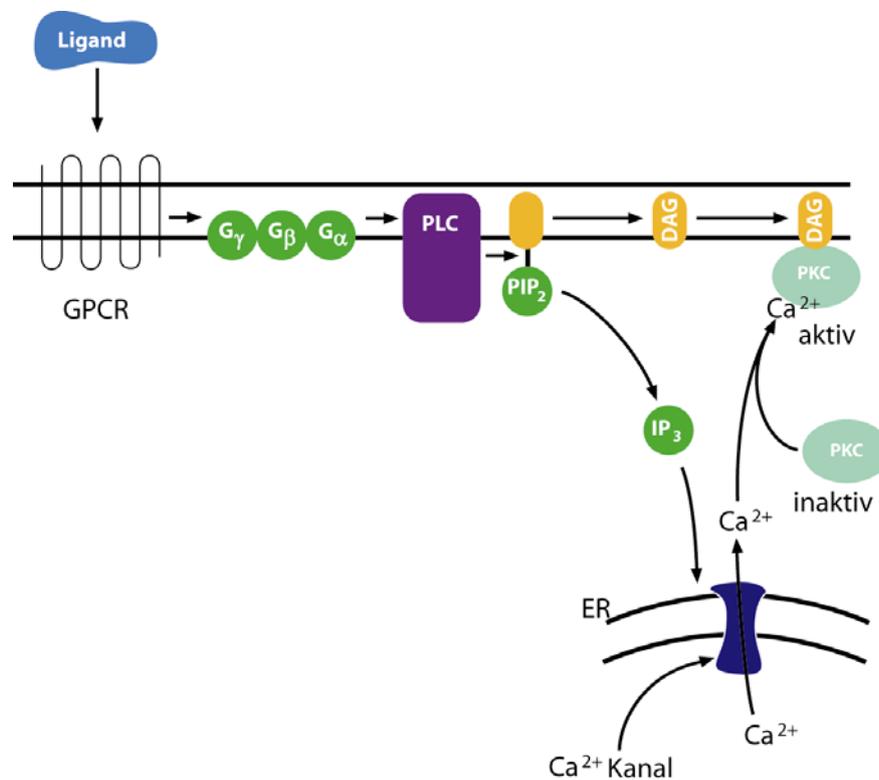
Die Aktivierung der Protein Kinase C wird durch zwei aufeinanderfolgende Mechanismen reguliert: 1) Phosphorylierung durch die PDK-1 (3-phosphoinositid-dependent kinase) und 2) Bindung des Second Messenger Diacylglycerol. Jeder dieser Mechanismen reguliert die Struktur, die intrazelluläre Lokalisation und die Funktion der PKC.

Der erste Schritt im Aktivierungsweg der PKC ist die Phosphorylierung der katalytischen Domäne des neu synthetisierten Proteins durch die PDK-1.

Der zweite Schritt wird durch Bindung von Liganden an Rezeptoren der Zellmembran initiiert. Die Aktivierung der membranständigen Phospholipase C führt zur Hydrolyse von Phosphoinositol- 4, 5-Biphosphat ( $PIP_2$ ) zu Inositol- 1, 4, 5-Triphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2- Diacylglycerol. Die Bindung von  $IP_3$  an spezifische Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums führt zu einer Kalziumfreisetzung ins Zytosol. Durch die Interaktion von Kalzium und der C2 Untereinheit kommt es zu einer Konformationsänderung und Translokation an die Zellmembran, an der sich DAG, der endogene Aktivator der PKC, befindetet. Das Pseudosubstrat wird aus der

Substratbindungsstelle in C4 verdrängt. Die PKC ist nun bereit, Serin-/Threonin Reste von unterschiedlichen Substraten zu phosphorylieren (Hug und Sarre, 1993; Tan und Parker, 2003; Dempsey et al., 2000).

Die Distribution der PKC wird von der Interaktion mit verschiedenen akzessorischen Proteinen gesteuert. Das Muster der intrazellulären Verteilung variiert zwischen unterschiedlichen Zelltypen. Da die PKC nach der Aktivierung häufig zur Zellmembran transloziert, wird dies als Zeichen der Aktivierung gesehen. Die Translokation an andere Zellkompartimente, wie z.B. den Zellkern, wurde bereits nachgewiesen (Wagner et al., 2000).



**Abb. 9: Signalweg der Protein Kinase C Aktivierung**

Nach Erkennung von Liganden durch einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) erfolgt die Phosphorylierung der membranständigen Phospholipase C (PLC). Sie spaltet dann das membranständige Phosphoinositol-4, 5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositol-1, 4, 5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> transloziert zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und bindet an spezifische Rezeptoren, worauf Kalzium-Ionen frei werden. Diese binden an die zytosolische Protein Kinase C (PKC) und induzieren die Translokation zur Zellmembran. Das noch inaktive Enzym bindet an das membranständige DAG und wird aktiviert. Diese Abbildung wurde leicht modifiziert aus der Promega Internetpräsenz [www.promega.com/guides/sigtrans\\_guide/SigTransFinal\\_LoRes.pdf](http://www.promega.com/guides/sigtrans_guide/SigTransFinal_LoRes.pdf) übernommen.

### 1.6.4 Substrate

Wie andere Serin-/Threonin Kinasen katalysiert die PKC den Transfer eines Phosphats aus dem ATP zu einer freien Hydroxylgruppe an Serin- oder Threoninreste von Substraten (Liu, 1996). Eine Reihe von PKC Substraten wurde schon beschrieben. Sie können in drei Gruppen unterteilt werden: 1) Proteine der Signaltransduktionswege (T-Zell- und Insulin Rezeptoren), 2) Proteine der Metabolitwege (Kanäle und Pumpen) und 3) Proteine der Genexpression (Transkription und Translationsfaktoren).

Unter den wichtigsten Substraten befinden sich Neuromodulin, MARCKS, Katecholamin- und Acetylcholinrezeptoren, Wachstumsfaktoren und Protoonkogene.

Das MARCKS (**m**yristolated **a**lanine-rich **C** kinase **s**ubstrat) wird als Marker der PKC-Aktivierung gesehen, da es sich um eines der wichtigsten und am häufigsten vorkommenden Substrate handelt. Es spielt eine Rolle bei der von Wachstumsfaktoren-abhängigen Mitogenese, bei der Neurosekretion und bei der Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Hug und Sarre, 1993).

### **2 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen untersucht werden:

- Werden Protein Kinase C Isoformen bei der *Streptococcus pneumoniae*-Infektion von BEAS-2B Zellen aktiviert?
- Welche Bedeutung hat die Protein Kinase C für die Expression und Freisetzung von Zytokinen?
- Welche Bedeutung hat die Protein Kinase C für den Prostaglandinstoffwechsel?
- Spielt die Aktivierung der Phospholipase C eine Rolle in der Aktivierung der Protein Kinase C bei Pneumokokkeninfektion?
- Wird die Bindung von NF- $\kappa$ B an den *i18* Promotor durch die Protein Kinase C reguliert?
- Beeinflusst die Hemmung der Protein Kinase C  $\epsilon$  die IL-8 Freisetzung?

### 3 Material

#### 3.1 Zellkultur

Bei den BEAS-2B-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte humane Bronchial-Epithelzelllinie. Die Ursprungszellen wurden durch Autopsie einer gesunden Spenderlunge gewonnen, mit einem Adenovirushybrid 12-SV40 transfiziert und im Anschluss geklont (Reddel et al, 1988). Sie wurden uns freundlicherweise von C. Harris, NIH, Bethesda, MD zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 1: Zellkulturmedien**

Wachstumsmedium	Zusammensetzung	Hersteller
Keratinocyte SFM	500 ml	Gibco
Epithelial Growth Factor	2,50 µg	Gibco
Bovine pituitary extract	25 mg	Gibco
Glutamin 200 mM 100 x	5 ml	Gibco
Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250 µl	Sigma
Retinolsäure (1 mg/ml)	50 µl	Sigma

**Tabelle 2: Coating-Lösung**

Coating-Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Keratinocyte SFM	100 ml	Gibco
Bovines Serumalbumin 100 mg/ml	1 ml	Sigma
Fibronectin 1 mg/ml	1 ml	Sigma
Vitronectin 50 µg/ml	100 µl	Sigma

#### 3.2 Bakterienkultur

Der *Streptococcus pneumoniae* R6x Stamm (Tiraby und Fox, 1973) ist eine unbekapselte Mutante des Rockefeller Stammes R36A, welche aus dem D39 wt (Serotyp 2) generiert und uns freundlicherweise von Prof. Dr. S. Hammerschmidt (Universität Greifswald) zur Verfügung gestellt wurde.

## MATERIAL

---

**Tabelle 3: Bakterienkulturmedien**

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Anzuchtbouillon</b>		
Todd Hewitt Broth	30 g	BD Mikrobiologie
Hefeextrakt	5 g	Sigma
A. bidest. ad	1000 ml	
<b>Kryomedium</b>		
Anzuchtbouillon	80 %	
Glycerol 99 %ig	20 %	Sigma

### 3.3 Puffer- und Gelzusammensetzung

**Tabelle 4: PCR Puffer und Gele**

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Lysepuffer</b>		
RLT	1 ml	Qiagen, Hilden
Mercaptoethanol	0,01 %	Sigma, München
<b>TAE Puffer, pH 8,0</b>		
Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig 100 %ig	1,14 ml	Merck
EDTA 0,5 M	2 ml	Roth
A. bidest. ad	1000 ml	
<b>Elektrophoresegel</b>		
Agarose	1,5 %	Promega
TAE Puffer	100 ml	

**Tabelle 5: Western Blot Puffer**

Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Phosphoproteinwaschpuffer</b>		
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 200 mM	5 ml	Sigma
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 150 mM	50 ml	Sigma
NaF 1 M	50 ml	Sigma
Dulbeccos PBS 1 x	500 ml	PAA

## MATERIAL

<b>Lyse-Puffer (Gesamtproteinextraktion)</b>		
Tris-HCl pH 7,4	50 mM	Sigma
EDTA	0,25 mM	Roth
PMSF	1 mM	Sigma
Nonidet P-40	1 %	Fluka
Phosphoproteinwaschpuffer	1 ml	
<b>Lysepuffer (Zytosolfraktion)</b>		
NaCl 1,5 M	0,1 M	Roth
Triton 10 %	1 %	Boehringer
HEPES 500 mM	10 mM	
EDTA 250 mM	2 mM	Roth, Karlsruhe
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 200 mM	4 mM	Sigma
NaF 1M	40 mM	Sigma
PMSF 100 mM	1 mM	Sigma
Aqua bidest	ad 10 ml	
<b>Blotpuffer</b>		
Tris-Base	3 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merck
Methanol	20 %	Merck
A. bidest. ad	1000 ml	
<b>Blockpuffer</b>		
Odyssey Blocking Buffer	50 %	LI-COR
Dulbeccos PBS 1 x	50 %	PAA

**Tabelle 6: Western Blot Gele**

Gel	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Sammelgel</b>		
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	2,50 µl	Sigma
SDS 10 %	100 µl	Serva
40 %iges Bis-Acrylamid	1,33 ml	Serva
TEMED	10 µl	R&D Systems
Ammoniumpersulfat 10 %ig	50 µl	Serva
A. bidest. ad	10 ml	

## MATERIAL

<b>Trenngel 10 %ig</b>		
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,50 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	100 µl	Serva
40 %ige Bis-Acrylamid	3,35 ml	Serva
TEMED	5 µl	R&D Systems
APS 10 %ig	3,35 ml	Serva
A. bidest. ad	10 ml	

**Tabelle 7: IL-8 und IL-6 ELISA Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Carbonatpuffer 0,1 M pH 9,5</b>		
NaHCO <sub>3</sub>	4,20 g	Merck
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,78 g	Merck
A. bidest. ad	500 ml	
<b>Blockpuffer</b>		
Dulbeccos PBS 1 x	45 ml	PAA
FCS	5 ml	Gibco
<b>Stopplösung 2 NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	27,47 ml	Merck
A. bidest. ad	500 ml	

**Tabelle 8: CHIP Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>CHIP RIPA Puffer</b>		
Tris HCL pH 7,5	10 mM	
NaCl	150 mM	Roth
Nonidet P-40	1 %	Fluka
Desoxycholat	1 %	
SDS	0,1 %	Serva
EDTA	1 mM	Roth
<b>DNA-Ladepuffer</b>		
Glycerol	5 ml	
EDTA 0,5 M	1 ml	Roth

## MATERIAL

Orange G 2 %	1 ml	Sigma
SDS 10 %	100 µl	Serva
A. bidest.	2,9 ml	
<b>High Salt Puffer</b>		
NaCl	2 M	Roth
Tris pH 7,5	10 mM	
Nonidet P-40	1 %	Fluka
Desoxycholat	0.5 %	
EDTA	1 mM	Roth
<b>TE-Puffer</b>		
Tris pH 7,5	10 mM	
EDTA	1 mM	Roth

**Tabelle 9: Reaktionsgemischansätze für PCR**

PCR	Substanz	Menge	Firma
<b>RT-PCR</b>	5xAMV Puffer	4 µl	
	Nukleotide, 100 mM (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	2 µl	Promega
	Hexamerprimer	1 µl	
	Rnasin (Gebrauchskonzentration: 40 U/µl)	0,75 µl	Promega
	H <sub>2</sub> O	variabel	
	AMV-Reverse Transkriptase 1 U/µl	0,75 µl	Promega
<b>PCR</b>	10xRed Taq Puffer	2,5 µl	
	Nukleotide, 10 mM (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	0,5 µl	Promega
	Vorwärtsprimer, 0,5 µg/µl	0,25 µl	
	Rückwärtsprimer, 0,5 µg/µl	0,25 µl	
	H <sub>2</sub> O	15,5 µl	
	Red Taq Polymerase, 1 U/µl	0,75 µl	Sigma
<b>ChIP-PCR</b>	10x PAN Taq Puffer	5 µl	PAN
	Nukleotide, 100 mM (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	1 µl	Promega
	50xMg <sub>2</sub> Cl	4 µl	PAN
	Vorwärtsprimer, 10 mM	3 µl	TIB Molbiol
	Rückwärtsprimer, 10 mM	3 µl	TIB Molbiol
	H <sub>2</sub> O	31,5 µl	

## MATERIAL

	PAN Taq Polymerase, 1 U/ $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	PAN
--	----------------------------------	-------------	-----

### 3.4 Chemikalien

#### 3.4.1 Kits

RNeasy Mini Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, U.S.A
Human IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, San Diego, U.S.A
Prostaglandin E <sub>2</sub> High Sensitivity Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, U.S.A
PKC Kinase Activity Assay Kit	Stressgen Bioreagents, Canada

#### 3.4.2 Substanzen

**Tabelle 10: Inhibitoren und Aktivatoren**

Reagenz	Ziel	Konzentration	Firma
PKC Inhibitor 20-28, Cell permeable Myristoylated	PKC $\alpha$ Inhibitor	1,10 $\mu$ M	Calbiochem
Gö 6976	PKC $\alpha$ und $\beta$ Inhibitor	1,10 $\mu$ M	Calbiochem
PMA	PKC Aktivator	160 nM	Calbiochem
Protein Kinase $\epsilon$ Translocation Inhibition Peptide	PKC $\epsilon$	10 $\mu$ M	Calbiochem
BAPTA	Kalzium-Chelator	100, 200 $\mu$ M	Alexis
EGTA	Kalzium-Chelator	5,10 $\mu$ M	Sigma
A23187	Kalzium-Ionophore	10 $\mu$ M	BioVision
U 73122	PLC Inhibitor	5, 10 $\mu$ M	Tocris

**Tabelle 11: Primärantikörper Western Blot**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Molekulargewicht	Hersteller
ERK 2 (D-2) sc-1647	Maus	1:500	42 kDa	Santa Cruz
COX-2 (C-20) sc-1745	Ziege	1:1000	72 kDa	Santa Cruz
PKC $\alpha$ (C-20) sc-208	Kaninchen	1:1000	83 kDa	Santa Cruz
PKC $\epsilon$ (C-15) sc-214	Kaninchen	1:1000	82 kDa	Santa Cruz

## MATERIAL

**Tabelle 12: Sekundärantikörper Western Blot**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti Kaninchen IRDye 800 IgG	Ziege	1:2000	Rockland
anti Mause Cy 5.5 IgG	Ziege	1:2000	Rockland
anti Ziege IRDye 800 IgG	Esel	1:2000	Licor

**Tabelle 13: Antikörper für CHIP**

Antikörper	Spezies	Firma
NF-κB p65 (C-20) sc-372	Kaninchen	Santa Cruz
POL II (N-20) sc-899	Kaninchen	Santa Cruz

**Tabelle 14: Primer**

Primer	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz	Annealing	Zyklen	Firma
GAPDH	5'-CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA-3'	5'-TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC-3'	60 °C	30	TIB Molbiol
IL-8	5'-CTA GGA CAA GAG CCA GGA AGA- 3'	5'-AAC CCT CTG CAC CCA GTT TTC-3'	60 °C	30	TIB Molbiol
Promotor IL-8	5'-AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG-3'	5'-TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCCTAG-3'	60 °C	33	TIB Mobiol

### 3.5 Geräte

AxioCam MRm Kamera	Zeiss
Agarosegeldokumentation	Olympus Digitalkamera
ELISA-reader MR 5000	Dynatech, England
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR, Bad Homburg
pH-Meter	Knick GmbH & Co, Berlin
Spektralphotometer	UVIKON, Kontron; Basel
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Hettich, Berlin
Ultraschallgeräte	Bandelin

### 3.6 Verbrauchsmaterial

Hybond-ECL Membran	Amersham, Braunschweig
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kunststoffküvetten	Serva
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Hannover
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim
Röhrchen (12 und 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturflaschen (T75)	Falcon, Heidelberg

### 3.7 Software

Bio-Imaging-Control-Software Argus X1 Version 2 Biostep GmbH

Infrared Odyssey Imaging System Application Software Version 1.2

GraphPad Prism, Version 4.02

### 4 Methoden

#### 4.1 Zellkultur

Die Kultivierung der BEAS-2B-Zellen erfolgte in T75-Flaschen, 24- und 6-Napf Schalen bei 37 °C und einer 5 %igen CO<sub>2</sub>-Sättigung. Als Kulturmedium für diese Zellen wurde ein Wachstumsmedium verwendet. Die Kulturgefäße wurden mit einer Coating-Lösung für mindestens 30 Minuten vorbehandelt, um den Zellen bessere Adhäsionsmöglichkeiten zu schaffen. Nach Ausbildung eines Monolayers wurden die Zellen mit 5 ml PBS/- gewaschen und mit ca. 2 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden gelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und bei 172 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 200 µl Trypsininhibitor 30 mg/ml resuspendiert, in 40 ml Wachstumsmedium aufgenommen und zur weiteren Zellkultivierung in Zellkulturflaschen überführt. Das Zellkulturmedium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt.

#### 4.2 Bakterienkultur

Zur Gewinnung der Stöcke wurden die Pneumokokken auf Columbiaagar-Platten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Einzelne stehende Kolonien wurden auf neue Columbiaagar-Platten überführt und erneut inkubiert. Am folgenden Tag wurden alle gewachsenen Kolonien in 1 ml Kryomedium enthaltendes Kryoröhrchen eingebracht und bei – 80 °C gelagert.

*S. pneumoniae* wurde zur Anzucht in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank bei 37 °C mit 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Ein Tag vor der Stimulation wurden die Pneumokokken auf Columbiaagar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 %igem CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Am Stimulationstag wurden einzelne stehende Kolonien in eine vorgewärmte Anzuchtsbouillon überführt, so dass eine Pneumokokkenkonzentration zwischen 3 bis 6 x 10<sup>7</sup> cfu/ml als optimale Starterkonzentration eingestellt war. Die Konzentration wurde mittels eines Spektralphotometers bei einer optischen Dichte von 600 nm ermittelt (OD<sub>600</sub> 0,03 - 0,06 entspricht 3 bis 6 x 10<sup>7</sup> cfu/ml). Die Pneumokokken wurden inkubiert bis eine Konzentration von 2 bis 4 x 10<sup>8</sup> cfu/ml (OD<sub>600</sub> 0,2 - 0,4) erreicht wurde. Bei dieser

Konzentration befinden sich die Pneumokokken in einer mittleren logarithmischen Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen.

Zur Stimulation der Zellen mit den Pneumokokken wurden diese in 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 1800 g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Bakterienpellet in dem BEAS-2B Wachstumsmedium so resuspendiert, dass eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  cfu/ml erreicht wurde. Alle Versuche wurden mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  cfu/ml durchgeführt.

### **4.3 Molekularbiologische Methoden**

#### 4.3.1 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin Immunopräzipitation ermöglicht eine direkte Untersuchung der Auswirkungen einer Stimulation von Signaltransduktionswegen, auf die Aktivierung bestimmter Promotoren. Am Versuchstag wurden die Zellen für eine Stunde mit dem PKC Inhibitor 20-28 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M vorbehandelt und später mit *Streptococcus pneumoniae* für einen Zeitraum von 90 Minuten infiziert. Das Medium wurde nach Ablauf der Inkubationszeit abgesaugt und die Zellen für eine Minute mit 1 %igem Formaldehyd in PBS fixiert, wodurch der Transkriptionsprozess an einem bestimmten Punkt angehalten wurde. Die fixierten Zellen wurden mit einer 0,25 M Glycin-PBS Lösung gewaschen und in PBS aufgenommen. Nach einmaligem Waschen des Zellpellets mit PBS (5 Minuten Zentrifugation bei 4 °C, 1.200 rpm), wurde dieses in 2 ml ChIP-RIPA Puffer mit 1 %igem Aprotinin resuspendiert und zur Fragmentierung der DNA auf Eis geschallt (jeweils 4 Mal eine Minute Schallen, eine Minute Pause, bei 50 %iger Schallintensität). Das Lysat wurde für 20 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand für die sich anschließenden Immunopräzipitationen aliquotiert. Für die Immunopräzipitationen wurden 250  $\mu$ l des Lysats mit 4  $\mu$ l des gegen den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor gerichteten Antikörpers über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am Folgetag wurden 60  $\mu$ l ChIP-RIPA Puffer und je 20  $\mu$ l Protein A und G Agarose zum Separieren der Antikörper-Transkriptionsfaktor Komplexe dazu gegeben und eine Stunde bei 4 °C geschüttelt. Daraufhin wurde die Agarose durch ein einminütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 13.000 rpm pelletiert und der Überstand entfernt. Es folgten mehrere Waschschrte: zweimaliges Waschen mit je 1 ml ChIP-

RIPA Puffer, einmaliges Waschen mit High-Salt Puffer, einmaliges Waschen mit ChIP-RIPA Puffer bei 4 °C und abschließend einmaliges Waschen mit TE-Puffer bei Raumtemperatur. Durch die Veränderung der Salzkonzentrationen in den Waschpuffern wurde ein Großteil der Verunreinigungen und unspezifischen Bindungen entfernt, so dass bei der folgenden 15-minütigen Elution mit 551 EB -Puffer bei 30 °C und 1.200 rpm, Antikörper-Agarose- und Transkriptionsfaktor-DNA-Komplex von einander gelöst wurden. Agarose und Antikörper wurden für eine Minute bei Raumtemperatur und 13.000 rpm pelletiert und 50 µl des Überstandes, in dem die gewonnene DNA gelöst war, mit 150µl TE -Puffer und 0,5 %iger RNase A eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert und mit 2,5 %iger Proteinase K versetzt. Anschließend wurden die Proteine und RNA für 12 Stunden in einem Thermocycler verdaut (6 Stunden bei 37 °C, 6 Stunden bei 65 °C). Die an die spezifischen Antikörper gebundene DNA wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) nach Empfehlung des Herstellers aufgereinigt und in einer Promotor-Primer-PCR amplifiziert.

### 4.3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pro Napf einer 6-Loch Platte wurden 175 µl 1 % Mercaptoethanol-haltiger RLT-Puffer aus dem RNeasy-Mini-Kit (*Qiagen*) auf die Zellen gegeben und diese mit einem Gummischaber von der Oberfläche gelöst. Die Isolierung der RNA aus dem im RLT-Puffer aufgenommenen Zelllysat wurde nach Empfehlung des Herstellers mittels RNeasy-Mini-Kit (*Qiagen*) durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dabei wurden die Proben 1:100 in RNase freiem Wasser (RNeasy-Mini-Kit *Qiagen*) verdünnt. Es wurden Präzisionsküvetten aus Quarzglas, mit einer Schichtdicke von 10 mm, verwendet. Eine OD 260 von 1 entspricht 40 µg/ml RNA. Für die Reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde für jede Probe RNA eingesetzt, mit destilliertem Wasser auf 11,5 µl aufgefüllt und 5 Minuten bei 70 °C denaturiert. Daraufhin wurden je 8,5 µl des MasterMix für RT -PCR zugegeben und für eine Stunde bei 42 °C, dem Arbeitsoptimum der AMV-Reversen Transkriptase, inkubiert. Abschließend wurden die Proben zur Inaktivierung des Enzyms für 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Nach erfolgter RT-PCR wurden die Proben mit 80 µl destilliertem Wasser versetzt und bei -20 °C gelagert oder sofort hinsichtlich der Menge an IL-8,

## METHODEN

---

IL-6, COX-2 und GAPDH in einer Standard-PCR untersucht. Pro Ansatz wurde dazu 3 µl der cDNA entnommen und mit 27 µl PCR Mastermix versetzt.

**Tabelle 15: PCR-Cycler-Programme**

Programm	Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>ChIP</b>	Denaturierung	94 °C	7 min	1
	Denaturierung	95 °C	20 min	-
	Annealing	variabel	20 min	variabel
	Elongation	72 °C	20 min	-
	Elongation	72 °C	7 min	1
<b>RT-PCR</b>	Denaturierung	70 °C	5 min	1
	Transkription	42 °C	1 h	1
	Denaturierung	95 °C	5 min	1
<b>PCR</b>	Denaturierung	95 °C	3 min	1
	Denaturierung	95 °C	1 min	-
	Annealing	variabel	1 min	variabel
	Elongation	72 °C	1 min	-
	Elongation	72 °C	5 min	1

### 4.3.3 Western Blot

#### 4.3.3.1 Gesamtproteinextraktion

Nach erfolgter Stimulation der BEAS-2B-Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit je 2 ml eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Es folgten Zellyse und Abschaben der Zellen auf Eis mit 100 µl Lysepuffer. Die Proben wurden 10 Minuten zentrifugiert (4 °C, 13.000 rpm), um die lösliche Proteinfraction zu gewinnen. Die Überstände wurden abgenommen und eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### 4.3.3.2 Zytosol-Membran Fraktionierung

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Überstände abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, 5 Minuten in 300 µl Lysepuffer auf Eis inkubiert und daraufhin abgeschabt. Die Lysate wurden zehn Mal durch eine 21 G Nadel gepresst und 30

Minuten bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion im Überstand wurde entnommen. Das Pellet wurde daraufhin in 200 µl Lysepuffer und 1 % SDS resuspendiert und zweimal 20 Sekunden in einem Wasserbad mit Ultraschall behandelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm und 4 °C befanden sich die Membranproteine im Überstand. Die Lagerung der Proben nach der Extraktion erfolgte bei -20 °C.

### *4.3.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BioRad Proteinassay nach Empfehlung des Herstellers. Das Bradford-Reagenz wurde 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt, die Proteinproben dann im Verhältnis 1:200 zugegeben und die optische Dichte bei 595 nm bestimmt.

### *4.3.3.4 SDS-PAGE*

Die Proteinproben wurden 1:1 in Mercaptoethanol-haltigen 1x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 Minuten bei 95 °C unter Schütteln denaturiert. Die Proteinauftrennung erfolgte in einem 10 %igem Trenngel und 13 %igem Sammelgel bei 100 mV für zwei Stunden. Es wurden 80 µg oder 100 µg Protein aufgetragen.

### *4.3.3.5 Western Blot*

Nach der SDS-Gel-Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bei 100 V für eine Stunde auf Eis. Nach der dann folgenden zweistündigen Fixierung der Proteine mit Blockadepuffer wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper, der sich gegen das gesuchte Protein richtet, schüttelnd inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden herausgewaschen (3 x 5 Minuten mit PBS) und die Membran dann für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser richtete sich wiederum gegen das Spendetier des ersten Antikörpers und war mit einem Infrarotfarbstoff markiert. Nach erneutem Waschen (3 x 5 Minuten mit PBS und 0,1 %

Tween 20 und 1 x 5 Minuten mit PBS) erfolgte die Detektion des markierten Proteins im Odyssey Infrared Imager.

### 4.3.4 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das eine enzymatische Farbreaktion mit einer spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper verknüpft. Dabei wird zunächst das Substrat an die vorbehandelte Oberfläche des Reaktionsgefäßes gebunden und im darauf folgenden Schritt ein dagegen gerichteter enzymgekoppelter Antikörper zugegeben. Nach der Beifügung des enzymespezifischen Substrats zum Reaktionsgemisch, beginnt dessen Umsetzung zu einem farblich differenzierten Produkt, dessen optische Dichte nach dem Abstoppen der Farbreaktion mit Schwefelsäure bei 450 nm ( $\lambda$  Korrektur bei 570 nm) gemessen werden kann. Der ELISA wurde mittels Detection Kits durchgeführt. Antikörper und Enzymreagenz wurden in Carbonatpuffer, die zu untersuchenden Proben in Blockadepuffer verdünnt oder unverdünnt eingesetzt. Die BEAS-2B-Zellen sind in einer 24-Napfplatte gewachsen. Eine halbe Stunde vor der 16-stündigen Infektion mit *S. pneumoniae* wurden die Zellen mit den verschiedenen Inhibitoren vorbehandelt. Am Folgetag wurden die zellfreien Überstände entnommen und untersucht. Spezielle 96-Napfplatten wurden für 12 Stunden mit einem gegen das zu untersuchende Zytokin gerichteten Capture-Antikörper in 0,1 M Carbonatpuffer inkubiert (Verdünnung 1:250). Vor Versuchsbeginn wurde die 96-Napfplatte nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für eine Stunde bei Raumtemperatur mit jeweils 200 Blockadepuffer inkubiert. Jeweils 100  $\mu$ l der Proben wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Platte aufgetragen. Die Standards wurden in Blockadepuffer verdünnt und mit abfallender Konzentration je 100  $\mu$ l als Doppelwerte auf die Platte gegeben. Für den IL-8-ELISA wurden eingesetzt: 200 pg/ml, 100 pg/ml, 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,3 pg/ml, 3,1 pg/ml. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte fünf Mal mit Waschpuffer gewaschen und der gegen die Ziel-Zytokine gerichtete enzymgebundene Detektionsantikörper (Verdünnung 1:250 in Blockadepuffer) für eine Stunde zugegeben. Die Platte wurde dann sieben Mal mit Waschpuffer gewaschen und mit Enzymsubstrat für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Farbreaktion mit 50  $\mu$ l 2NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die optische Dichte bei 450 nm gemessen.

### 4.3.5 PKC-Aktivitätsassay

Diese Methode ermöglicht eine Analyse der PKC-Aktivität in löslichen Zellfraktionen und basiert auf dem Prinzip eines ELISA. Dabei werden spezifische synthetische Peptide als Substrate für die Protein Kinase C genutzt und nach der Phosphorylierung durch polyklonale Antikörper erkannt. Die vom Hersteller gelieferten Mikrotiterplatten wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 150-Verdünnungspuffer vorinkubiert und dieser dann vollständig abgesaugt. Jeweils 30 µl der Proben und der Kontrollen (PKC-Aktivitätskontrolle, Verdünnungspuffer) wurden in die jeweiligen Näpfe der Mikrotiterplatte gegeben und 10 µl ATP in Verdünnungspuffer (Konzentration: 1 mg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 90 Minuten bei 30 °C wurde der Inhalt entleert und die Platte auf einem sauberen Tuch durch Klopfen getrocknet. Nun wurden 40 µl phosphospezifischer Substratantikörper (Konzentration: 1 µg/ml) dazugegeben und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde dann vier Mal mit 1x Waschpuffer gewaschen und auf einem sauberen Tuch trocken geklopft. Es folgte die Zugabe von 40 µl Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (Konzentration: 1 mg/ml) für die Dauer von 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Platte wurde erneut vier Mal mit 1x Waschpuffer gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit je 60 µl Tetramethylbenzidine (TMB)-Substrat inkubiert. Nach dem Anhalten der Reaktion mit 20 µl Säure erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 450 nm.

### 4.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit Standardabweichungen dargestellt. Alle verwendeten Abbildungen fassen drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm PRISM 5.0 (Graph Pad Prism ®) verwendet.

### 5 Ergebnisse

#### 5.1 Die Aktivierung der Protein Kinase C durch Pneumokokken

Die PKC-Aktivierung spielt eine wichtige Rolle in der Signalkaskade der Immunantwort bei der Infektion von humanen Bronchialepithelzellen. Während ihre Auswirkungen bei der Infektion mit *Legionella pneumophila* bereits untersucht sind (N'Guessan *et al.*, 2007), ist ihre Funktion bei einer Infektion mit *S. pneumoniae* weitgehend unbekannt.

Um festzustellen, ob eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* die PKC bei BEAS-2B-Zellen aktiviert, wurden die Zellen in einer Zeitreihe mit der unbekapselten *S. pneumoniae* Mutante R6x infiziert. Die Aktivität wurde im PKC-Aktivitäts-Assay ermittelt. Als Kontrolle wurden die BEAS-2B-Zellen mit 0,5 µg/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) für 120 Minuten inkubiert.

Wie Abbildung 10 A zeigt, kam es nach der Infektion zu einem deutlichen zeitabhängigen Anstieg der PKC-Aktivität. Der maximale Aktivierungsanstieg zeigte sich bereits 30 Minuten nach Stimulation.

Im PKC-Aktivitäts-Assay konnte die Aktivierung der elf unterschiedlichen Isoformen nicht abgegrenzt werden. Aus diesem Grund wurde mittels Western Blot die Translokation der PKC aus dem Zytosol in die Membran als Maß der Aktivierung von PKC Isoformen untersucht.

Die BEAS-2B-Zellen wurden für 15, 30, 60 und 120 Minuten mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Als Positivkontrolle für die PKC-Aktivierung diente auch hier PMA. Durch Membran-Zytosol-Fraktionierung erfolgte die Trennung der Proteine. Sie wurden später im Western Blot mit spezifischen Antikörpern untersucht. Im Gegensatz zu unstimulierten Zellen, bei denen die Membranfraktion der PKC  $\alpha$  und  $\varepsilon$  minimal ausfiel, fand sich bei den infizierten Zellen eine deutliche Bande für die PKC  $\alpha$  und PKC  $\varepsilon$ . Eine Translokation von PKC  $\alpha$  und PKC  $\varepsilon$  in die Zellmembran wurde nach 30 Minuten beobachtet (Abb.10 B). Die Konzentration in der Membranfraktion erreichte nach einer Stunde wieder den Ausgangswert.

Die Bilder in Abbildung C wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Gregor Reither am EMBL-Institut in Heidelberg zur Verfügung gestellt.

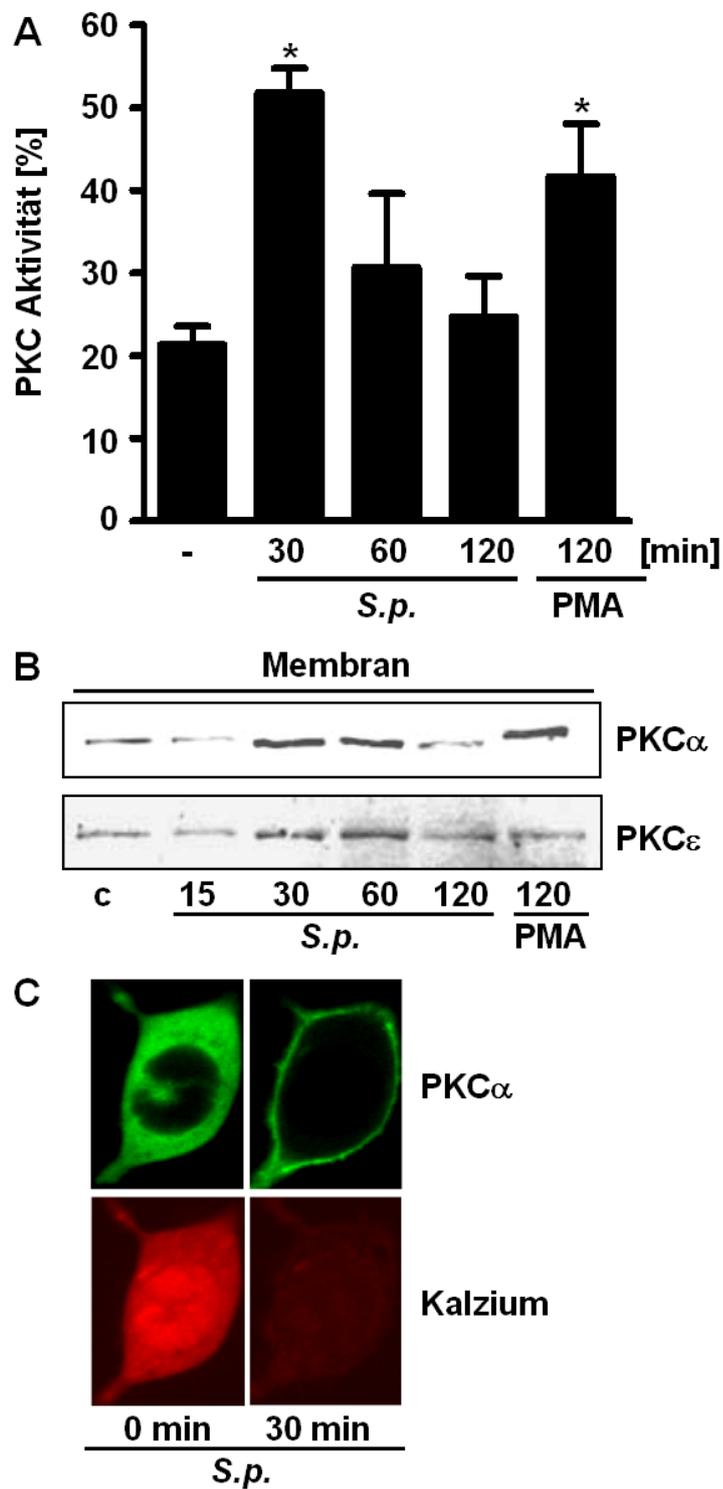


Abb. 10: PKC-Aktivität und Translokation in BEAS-2B-Zellen nach *Streptococcus pneumoniae*-Infektion. A) PKC-Aktivitäts-Assay B) Western Blot C) Konfokal Mikroskopie

A) BEAS-2B-Zellen wurden für 30, 60 und 120 Minuten mit *Streptococcus pneumoniae* (S.p.)  $R6 \times 10^7$  cfu/ml oder mit 0,5 µg/ml PMA für 120 Minuten stimuliert, lysiert und die Überstände im PKC-Aktivitäts-Assay untersucht. Ein deutlicher Anstieg der PKC-Aktivität wurde nach 30 Minuten beobachtet. Signifikante Unterschiede  $p < 0,05$  im Vergleich zum Leerwert wurden mit \* markiert. Die Abbildung ist das Resultat von 3 unabhängigen Versuchen. B) Die Translokation von PKC  $\alpha$  und  $\epsilon$  zur Zellmembran bei der Infektion von BEAS-2B-Zellen mit *Streptococcus pneumoniae*  $10^7$  cfu/ml für 15, 30, 60, 120 Minuten wurde mittels Western Blot analysiert. Die Nitrozellulosemembran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen die PKC entwickelt. Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen. C) HEK293 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für humanes TLR2 und eine GFP-markierte PKC  $\alpha$  kotransfiziert, mit dem Kalzium-abhängigen Farbstoff FuraRed beladen und danach für 30 Minuten mit *S. pneumoniae* (S.p.)  $R6 \times 10^6$  cfu/ml infiziert und konfokal mikroskopiert. Die oberen beiden Abbildungen zeigen die Pneumokokken-abhängige Translokation der GFP-markierten PKC $\alpha$  vom Zytosol an die Zellmembran. Die unteren beiden Abbildungen zeigen das Verblässen des FuraRed Farbstoffes durch einen Anstieg der zytosolischen Kalzium-Konzentration nach Pneumokokkeninfektion. Dargestellt sind repräsentative Bilder von 3 unabhängigen Experimenten. In Kontrolleexperimenten wurden HEK293 Zellen statt des TLR2-Plasmides mit einem Leerplasmid transfiziert. Hier zeigten sich nach Pneumokokkeninfektion keine PKC  $\alpha$ -Translokation und kein Anstieg der Kalzium-Konzentration. Diese Experimente wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Gregor Reither am EMBL-Institut in Heidelberg durchgeführt und die Bilder zur Verfügung gestellt.

### **5.2 Die Inhibition der PKC $\alpha$ und $\beta$ blockiert die Pneumokokken-induzierte Interleukin-8 Transkription und Freisetzung in humanen Bronchialepithelzellen**

Die Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bewirkt einen Anstieg der IL-8 Produktion in Bronchialepithelzellen. Der Signalmechanismus der IL-8 Freisetzung bei einer Pneumokokkeninfektion ist in den letzten Jahren zunehmend erkannt worden. Trotzdem ist der Einfluss der PKC-Aktivierung auf die Immunantwort weitgehend unklar.

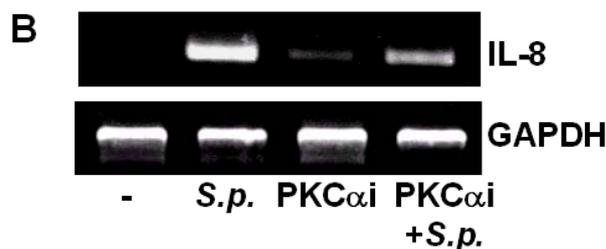
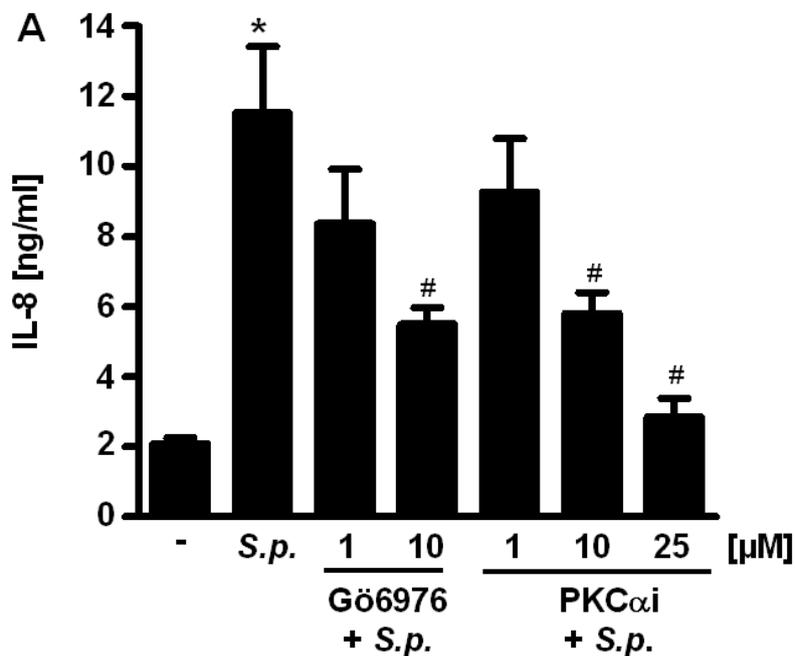
Der Zusammenhang der IL-8 Transkription mit der Aktivität der PKC nach Pneumokokkeninfektion wurde mit Hilfe spezifischer Inhibitoren untersucht und mittels PCR dargestellt. Die BEAS-2B-Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit dem PKC Inhibitor Gö 6976, einem Inhibitor der katalytischen Domänen von PKC  $\alpha$  und  $\beta$ , und mit dem PKC Inhibitor PKC  $\alpha$  20-28, einem Isoform-spezifischen Inhibitor, welcher die katalytische Domäne von PKC  $\alpha$  adressiert, vorinkubiert.

## ERGEBNISSE

Nach einer Vorinkubation von 60 Minuten mit den spezifischen Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 wurden die Zellen mit *Streptococcus pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) 16 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Überstände mittels ELISA bearbeitet (Abb. 11 A).

Vor Infektion der BEAS-2B-Zellen mit *Streptococcus pneumoniae* R6x für 240 Minuten wurden sie mit dem PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin erfolgte die Untersuchung der Proben mittels PCR. Zur Überprüfung der Gesamtmenge an mRNA wurden parallel PCR-Amplifikationen mit **G**lycerinaldehyd-3-**P**hospat **D**ehydrogenase (GAPDH) durchgeführt (Abb. 11 B).

Die Inhibitorbehandlung bewirkte dosisabhängig eine Reduktion der IL-8 Transkription und Freisetzung nach *in vitro* Infektion von Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus pneumoniae*.



**Abb. 11: Transkription und Freisetzung von IL-8 nach Hemmung der PKC Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  mit spezifischen Inhibitoren in BEAS-2B-Zellen nach *Streptococcus pneumoniae*-Infektion. A) IL-8 ELISA. B) IL-8 PCR.**

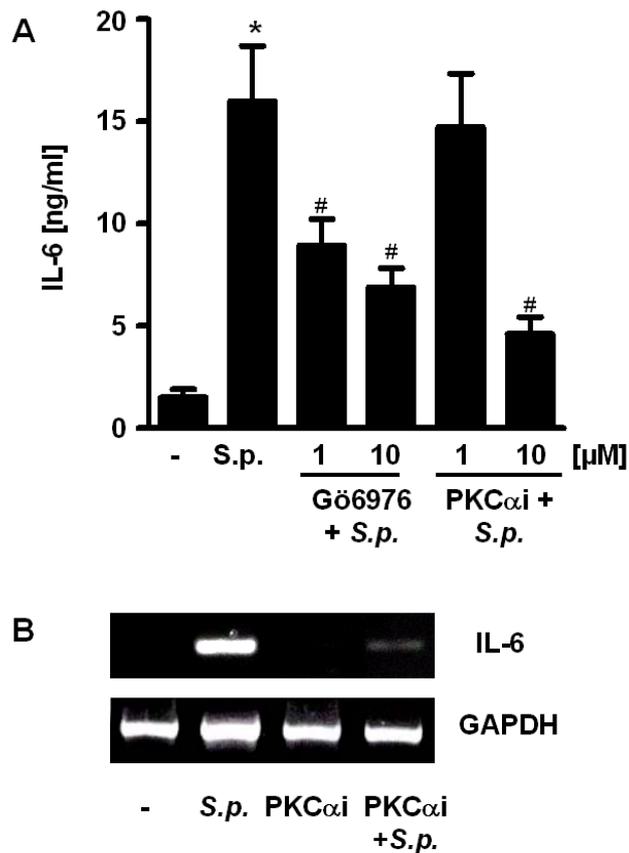
A) BEAS-2B-Zellen wurden 60 Minuten mit den spezifischen Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 (PKC $\alpha$ i) in einer Dosis von 1, 10 und 25  $\mu$ M vorinkubiert und dann für 16 Stunden mit *Streptococcus pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert (\*  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, #  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). B) Die IL-8 Transkription 4 Stunden nach Infektion von BEAS-2B-Zellen mit Pneumokokken R6x Mutante in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml wurde mittels PCR ermittelt. Der spezifische PKC  $\alpha$  Inhibitor 20-28 wurde 30 Minuten vorinkubiert. Als Kontrolle der gleichmäßigen mRNA Menge wurde zeitgleich eine GAPDH PCR angesetzt. Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

### **5.3 Die Inhibition der PKC blockiert die Freisetzung von IL-6 nach Pneumokokkeninfektion humaner Bronchialepithelzellen**

Die IL-6 Freisetzung hat eine bedeutsame Wirkung in der Induktion der Akute-Phase-Reaktion. Bei der Entzündungsreaktion von Bronchialepithelzellen wird PKC-abhängig IL-6 freigesetzt.

Es wurde untersucht, ob es ein Zusammenhang zwischen der PKC-Aktivität und der IL-6 Freisetzung nach 16-stündiger Infektion humaner Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken vorliegt. Für diesen Zweck wurden die Zellen mit den spezifischen Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 eine Stunde vorinkubiert.

Des Weiteren wurde die Translokation von IL-6 nach Infektion mit Pneumokokken bei Inhibition der PKC Isoform  $\alpha$  analysiert. Vor der Infektion wurden die Zellen mit dem PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss die BEAS-2B-Zellen mit *Streptococcus pneumoniae* R6x für 240 Minuten infiziert. Die Untersuchung der Proben fand mittels PCR statt. Zur Überprüfung der Gesamtmenge an mRNA wurden parallel PCR-Amplifikationen mit **G**lyceraldehyd-3-**P**hosphat **D**ehydrogenase (GAPDH) durchgeführt (Abb. 12 B).



**Abb. 12: Einfluss der Inhibition der PKC auf die IL-6 Freisetzung in *S. pneumoniae*-stimulierten Bronchialepithelzellen. A) IL-6 ELISA. B) IL-6 PCR.**

A) BEAS-2B-Zellen wurden eine Stunde mit den spezifischen Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 (PKC $\alpha$ i) in einer Dosis von 1 und 10  $\mu$ M vorinkubiert und dann für 16 Stunden mit *Streptococcus pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert (\*  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, #  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). B) Die Transkription von IL-6 nach 4-stündiger Infektion von BEAS-2B-Zellen mit Pneumokokken R6x Mutante in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml wurde mittels PCR ermittelt. Der spezifische PKC  $\alpha$  Inhibitor 20-28 wurde 30 Minuten vorinkubiert. Als Kontrolle erfolgte die Co-Amplifikation von GAPDH. Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

#### 5.4 Rolle der PKC in der Freisetzung von PGE<sub>2</sub> und COX-2 nach Infektion von Bronchialepithelzellen durch Pneumokokken

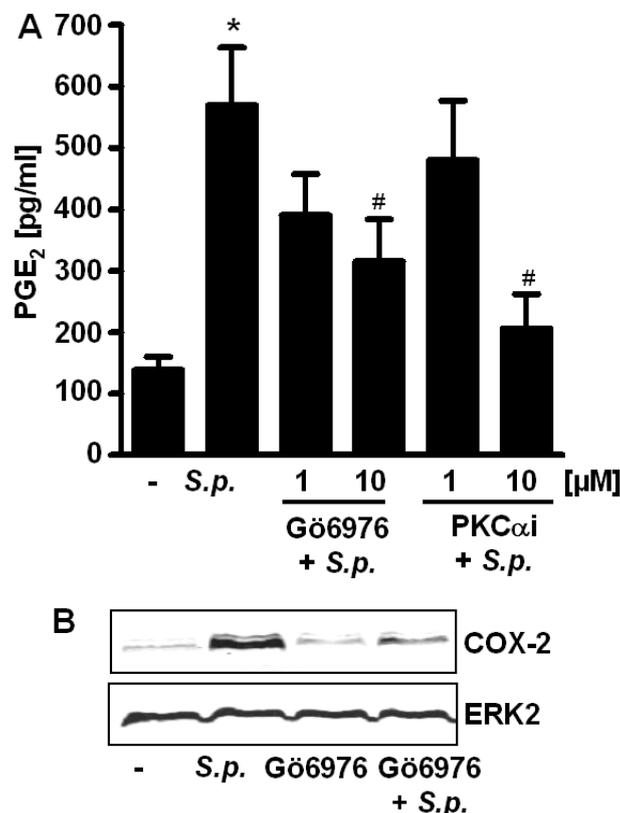
Prostaglandine sind für Entzündungsprozesse entscheidend, weswegen überprüft wurde, ob die PKC bei der Infektion von Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus*

## ERGEBNISSE

*pneumoniae* den Prostaglandinstoffwechsel beeinflusst. Die Expression von COX-2 in Bronchialepithelzellen, wie in der Lunge von Mäusen, nimmt nach einer Infektion mit Pneumokokken zu. Aus diesem Grund wurde die Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Zyklooxygenase 2 (COX-2) als Parameter gewählt.

Zur Kontrolle der Konzentrationsveränderungen von PGE<sub>2</sub> bei Verwendung von PKC Inhibitoren diente als Methode ELISA. Für die Darstellung der PGE<sub>2</sub> Freisetzung wurden die Bronchialepithelzellen vor der Pneumokokkenstimulation mit den spezifischen PKC Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 in Konzentrationen von 1 und 10  $\mu$ M eine Stunde vorinkubiert. Die Überstände wurden mit dem Prostaglandin E<sub>2</sub> High Sensitivity Immunoassay quantifiziert (Abb. 13 A).

Mit Hilfe von Gö 6976 wurden die PKC Isoformen inhibiert und die COX-2 Expression 4 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* R6x 10<sup>7</sup> cfu/ml im Western Blot ermittelt. Als Kontrolle für den gleichmäßigen Auftrag der Proteinmengen wurde die Nitrozellulosemembran zusätzlich mit einem Antikörper gegen die nicht phosphorylierte Form der extrazellulär regulierten Protein Kinase 2 (ERK2) inkubiert. Sie liegt konstitutiv in den Zellen vor (Abb.13 B).



**Abb. 13: Die Inhibition der PKC hemmt die Pneumokokken-induzierte PGE<sub>2</sub> und COX-2 Freisetzung in Bronchialepithelzellen. A) PGE<sub>2</sub> ELISA. B) Western Blot.**

A) Die BEAS-2B-Zellen wurden eine Stunde nach Vorbehandlung mit den spezifischen Inhibitoren Gö 6976 und PKC Inhibitor  $\alpha$  20-28 (PKC $\alpha$ i) in einer Dosis von 1 und 10  $\mu$ M mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Nach 16 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mit dem Prostaglandin E<sub>2</sub> High Sensitivity Immunoassay Kit quantifiziert (\*  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, #  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). B) Die Bronchialepithelzellen BEAS-2B wurden 30 Minuten vor der Infektion mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) mit 10  $\mu$ M des PKC  $\alpha$  und  $\beta$  Gö 6976 vorinkubiert. Nach 4 Stunden wurden die Zellysate im Western Blot auf die COX-2 Freisetzung untersucht. Die Darstellung von ERK2 dient der Kontrolle gleichmäßiger Proteinmengen. Die hier gezeigten Grafiken zeigen eine Zusammenfassung von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

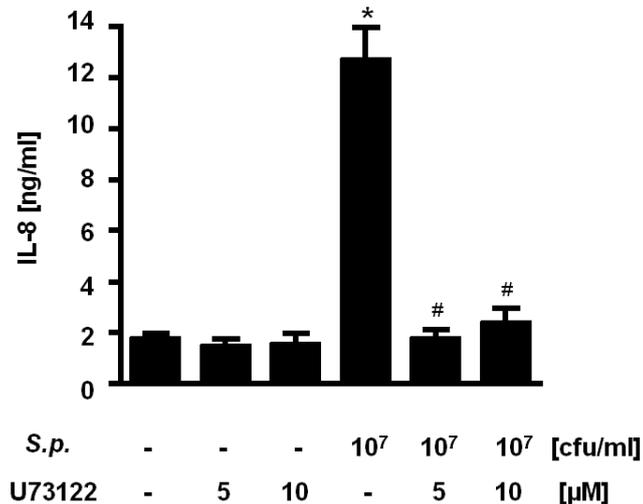
### **5.5 Bedeutung der Phospholipase C bei der IL-8 Freisetzung nach Pneumokokkeninfektion von Bronchialepithelzellen**

Die Hydrolyse vom Phosphatidylinositol 4,5- Biphosphat (PIP<sub>2</sub>) durch die spezifische Phospholipase C (PLC) ist einer der Schlüsselmechanismen in der Regulation von zahlreichen Zellfunktionen. Aus dieser Reaktion gehen zwei intrazelluläre Botenstoffe hervor: Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>). Sie lösen die Aktivierung der Protein Kinase C und die intrazelluläre Kalziumfreisetzung aus.

In Abb. 10 und 11 wurde die Rolle der PKC in der Freisetzung von IL-8 nach Infektion von Bronchialepithelzellen durch *S. pneumoniae* gezeigt. Angesichts dessen, dass die PLC und die PKC in einem engen Zusammenhang stehen, wird an dieser Stelle untersucht, welche Auswirkung die Inhibition der PLC auf die IL-8 Freisetzung hat.

Hierzu wurden Bronchialepithelzellen eine Stunde vor Stimulation mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) mit einem spezifischen PLC Inhibitor, U73122 (1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-Methoxyestra-1,3,5-(10)-trien-17-yl]amino]hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione) in einer Konzentration von 5 und 10  $\mu$ M, vorinkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde die IL-8 Konzentration in den Überständen mittels ELISA bestimmt (Abb. 14).

Die Inhibition der PLC durch den spezifischen Inhibitor U73122 führt bei der Stimulation von Bronchialepithelzellen BEAS-2B-Zellen mit *S. pneumoniae* R6x zu einer signifikanten Reduktion der IL-8 Freisetzung.



**Abb. 14: Die Inhibition der PLC bewirkt eine Abnahme in der IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken.**

BEAS-2B-Zellen wurden mit dem PLC Inhibitor U73122 in einer Konzentration von 5 und 10 μM für eine Stunde vorinkubiert. Nach Stimulation mit *S. pneumoniae* R6x (10<sup>7</sup> cfu/ml) wurden die Überstände mit ELISA quantifiziert (\* p<0,05 signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, # p<0,05 signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

### 5.6 Einfluss von Kalzium auf die IL-8 Freisetzung bei der Infektion Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken

Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) ist ein ubiquitäres intrazelluläres Signalmolekül. Es kontrolliert unterschiedliche Zellprozesse wie Sekretion, Kontraktion und Zellproliferation.

Das durch die Aktivierung der PLC freigesetzte Inositol- 1,4,5- Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) agiert wie ein intrazellulärer sekundärer Botenstoff. Seine Wirkung wird nach Bindung an spezialisierte tetramerische IP<sub>3</sub> Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen

Retikulums (ER) entfaltet. Die Folge ist eine Kalziumfreisetzung durch Öffnung von Kanälen des ER.

Es ist bereits bekannt, dass die Zunahme des intrazellulären Kalziumspiegels die Expression von IL-8 in Mastzellen und neutrophilen Granulozyten steigert. Hier wurde überprüft, ob eine Veränderung des intrazellulären Kalziumspiegels eine Auswirkung auf die IL-8 Produktion in humanen Bronchialepithelzellen hat.

Zwei Inhibitoren wurden eingesetzt: EGTA (**E**thylenglycol- bis 4 (8-aminoethyl ether) **N,N'** tetraacetic acid), ein spezifischer extrazellulärer Kalziumchelator, und BAPTA (1,2-**bis**-(2-**a**minophenoxyethane)-**N,N,N',N'**-tetraacetic acid), ein spezifischer intrazellulärer Kalziumchelator. BAPTA wurde in einer Konzentration von 5 und 10  $\mu\text{M}$  und EGTA in einer Konzentration von 100 und 200  $\mu\text{M}$  angesetzt. Die BEAS-2B-Zellen wurden 30 Minuten mit den Inhibitoren vorinkubiert.

Um den Einfluss eines Anstiegs des intrazellulären Kalziums auf die IL-8 Produktion in humanen Bronchialepithelzellen zu prüfen, wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  des Kalzium-Ionophor A23187 für 16 Stunden inkubiert. A23187 ruft eine gesteigerte Kalziumpermeabilität der Zellmembran hervor und ermöglicht einen Kalziumanstieg im Zytosol.

Unter Verwendung von Enzym-gekoppelten Immunoassays (ELISA) wurde die IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen BEAS-2B mit *S. pneumoniae* R6x  $10^7$  cfu/ml nachgewiesen. Die Überstände wurden nach 16 Stunden Stimulation gewonnen.

Die Bindung von Kalzium an intrazelluläre Chelatoren verursacht eine Abnahme der IL-8 Freisetzung nach Infektion von BEAS-2B-Zellen mit Pneumokokken. Andererseits konnte der extrazelluläre Kalziumchelator EGTA die IL-8 Freisetzung nicht beeinflussen (Abb. 15).

Ein vermehrter Kalziumeinstrom durch Kalzium-Ionophor A23187 in die humanen Bronchialepithelzellen verursacht eine Zunahme der IL-8 Freisetzung.

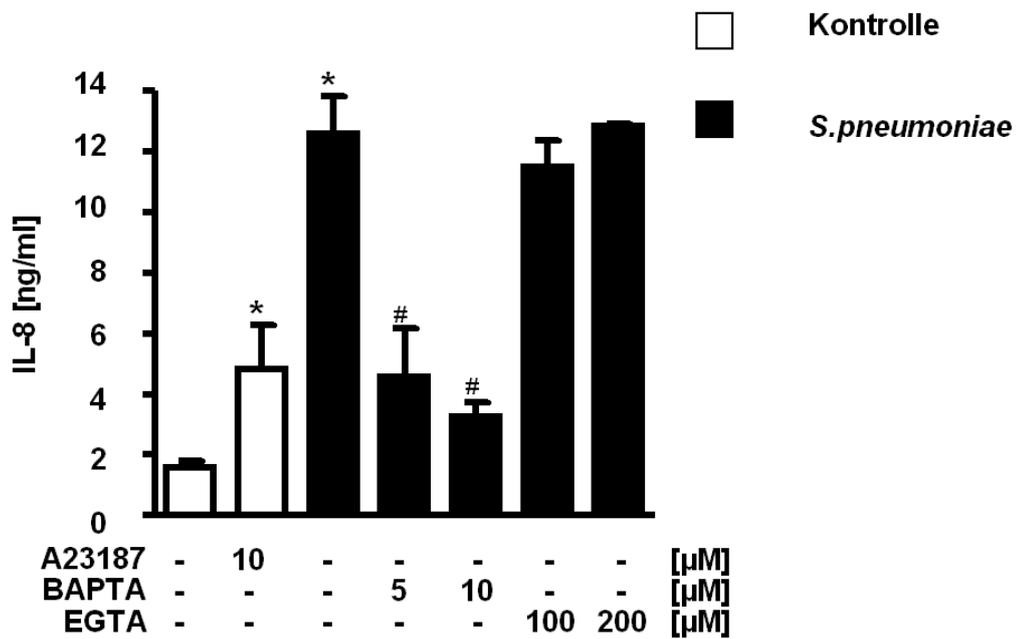


Abb. 15: Einfluss von Kalzium auf die IL-8 Freisetzung nach *S. pneumoniae*-Infektion von Bronchialepithelzellen.

Die BEAS-2B-Zellen wurden nach 30 Minuten Vorinkubation mit den Inhibitoren BAPTA (5 und 10  $\mu\text{M}$ ) und EGTA (100 und 200  $\mu\text{M}$ ) mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Die IL-8 Quantifizierung der Überstände wurde nach 16 Stunden mittels ELISA kontrolliert (\*  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, #  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

### 5.7 Bedeutung der PKC $\alpha$ für die Bindung von NF- $\kappa$ B am *il8* Promotor nach Pneumokokkeninfektion von BEAS-2B-Zellen

NF- $\kappa$ B ist ein potenter Transkriptionsfaktor für zahlreiche Entzündungsmediatoren. Er besteht aus unterschiedlich zusammengesetzten Hetero- oder Homodimeren aus Mitgliedern der Rel-Familie. Bisher sind 5 Rel Proteine bekannt: p50, p52, c-Rel, RelA (p65) und RelB. In unstimulierten Zellen liegen NF- $\kappa$ B Heterodimere als inaktiver Komplex im Zytoplasma vor. Nach Stimulation translozieren die freien Dimere in den Nukleus und binden an den Promotorregionen von Zytokinen.

## ERGEBNISSE

An dieser Stelle wurde untersucht, in wie weit nach einer Pneumokokkeninfektion der BEAS-2B-Zellen die Inhibition der PKC  $\alpha$  die Bindung von p65 (RelA) an den *i18* Promotor beeinflusst.

Dafür wurden die Bronchialepithelzellen BEAS-2B mit der Mutante *S. pneumoniae* R6x in einer Konzentration von  $10^7$  cfu/ml infiziert. Als spezifischer Inhibitor wurden 10  $\mu$ M von dem PKC  $\alpha$  Inhibitor 20-28 eingesetzt, mit dem die Zellen 30 Minuten vorinkubiert wurden. Nach 90 Minuten wurden die spezifischen DNA-Promotorbereiche, an denen p65 (RelA) gebunden hatte, mittels Chromatin Immunopräzipitation aufgereinigt und mit der PCR amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle der Aktivierung wurde die Bindung der RNA Polymerase II (Pol II) an den *i18* Promotor bestimmt. Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an Gesamt-DNA amplifiziert (Input).

Aus Abb. 16 wird deutlich, dass die Inhibition der PKC  $\alpha$  eine negative Auswirkung auf die Bindung von der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65/RelA und RNA Polymerase II an den *i18* Promotor nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken hat.

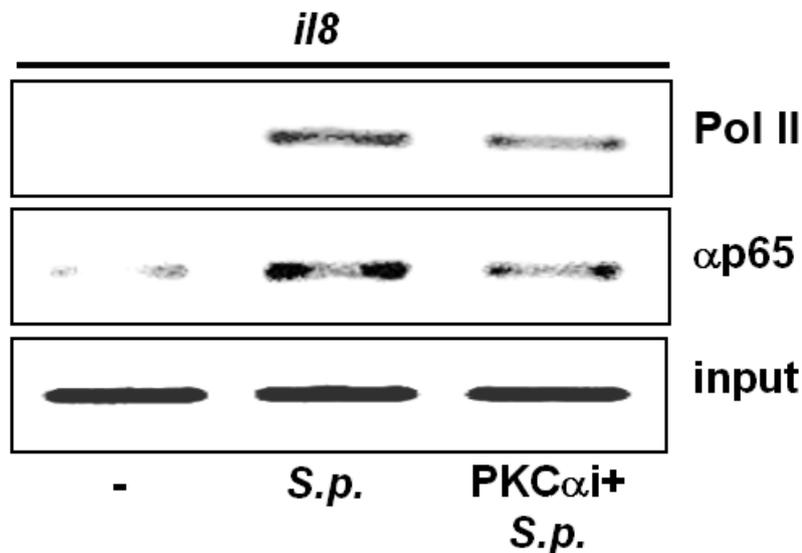


Abb. 16: Bindung von NF- $\kappa$ B an den *i18* Promotor nach Infektion der BEAS-2B-Zellen mit Pneumokokken.

## ERGEBNISSE

BEAS-2B-Zellen wurden mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Als Inhibitor wurde der spezifische PKC  $\alpha$  Inhibitor 20-28 in einer Konzentration von 10  $\mu$ M 30 Minuten vorinkubiert. Mit Hilfe von Chromatin Immunopräzipitation wurden nach 90 Minuten Inkubation die DNA-Bereiche, an denen p65/RelA gebunden hatte, aufgereinigt und später mittels PCR amplifiziert. Um die Aktivierung der BEAS-2B-Zellen zu kontrollieren, wurde die Bindung der RNA Polymerase II (Pol II) an den *i18* Promotor bestimmt. Außerdem wurde als Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen die Gesamt-DNA amplifiziert (Input). Die hier gezeigten Grafik ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

### 5.8 Bedeutung der PKC $\epsilon$ für die IL-8 Freisetzung nach Infektion von BEAS-2B-Zellen mit *Streptococcus pneumoniae*

Die Auswirkung der Inhibition der PKC  $\epsilon$  auf die IL-8 Freisetzung wurde mittels ELISA quantifiziert. Humane Bronchialepithelzellen wurden nach einstündiger Vorbehandlung mit einem PKC  $\epsilon$  Inhibitor mit *Streptococcus pneumoniae* R6x  $10^7$  cfu/ml infiziert. Nach 16 Stunden wurden die Überstände abgenommen und im ELISA untersucht (Abb.17)

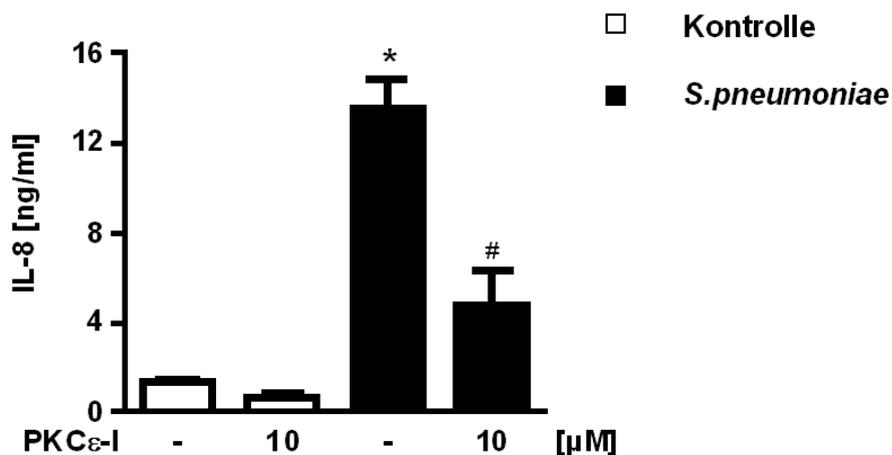


Abb. 17: Hemmung der IL-8 Freisetzung nach Inhibition der PKC  $\epsilon$  nach Pneumokokkeninfektion humaner Bronchialepithelzellen.

## ERGEBNISSE

---

Die Konzentration von IL-8 wurde 16 Stunden nach *Streptococcus pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) Infektion mittels ELISA quantifiziert. Die PKC  $\epsilon$  Aktivität wurde mit dem spezifischen Inhibitor PKC  $\epsilon$  Translocation Inhibitor Peptide gehemmt indem die Zellen eine Stunde vorinkubiert wurden (\*  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zum Leerwert, #  $p < 0,05$  signifikante Veränderung der IL-8 Konzentration im Vergleich zu den Pneumokokken-infizierten Zellen). Die Grafik fasst drei unabhängig durchgeführte Versuche zusammen.

Die Inhibition der PKC  $\epsilon$  erzielte eine starke Hemmung der IL-8 Freisetzung bei BEAS-2B-Zellen nach Infektion mit Pneumokokken.

### 6 Diskussion

Mehr als ein Jahrhundert nach seiner Entdeckung spielt *Streptococcus pneumoniae* immer noch eine äußerst große klinische Rolle. Die Aktivierung von Lungen-Epithelzellen durch *Streptococcus pneumoniae* war deswegen in den letzten Jahren im Fokus verschiedener Arbeiten (Schroder et al., 2003; Schmeck et al., 2006; Opitz et al., 2004). Die Rolle der PKC in der Pneumokokkeninfektion blieb allerdings unklar.

Die vorliegende Untersuchung demonstriert die Wichtigkeit der PKC-Aktivierung in der Infektion von Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus pneumoniae*. Die Aktivierung der PKC reguliert die Expression und Freisetzung von Zytokinen und Prostaglandinen, essentiellen Bestandteilen der Entzündungsreaktion während der Pneumokokkenpneumonie.

#### 6.1 Aktivierung der Protein Kinase C bei Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

Die Familie der Protein Kinase C ist bei einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion. In der Lunge ist sie unter anderem für die Regulation endothelialer Permeabilität (Aschner et al., 1997; Lynch et al., 1990, Siflinger-Birnboim et al., 1992), Apoptose und Zellproliferation essentiell (Dempsey et al., 2000).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation von Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus pneumoniae* zeitabhängig zur Aktivierung der Protein Kinase C Isoformen  $\alpha$  und  $\varepsilon$  kommt.

Die Funktion einzelner PKC Isoformen während der Pathogenabwehr ist wenig erforscht. Eine Translokation bestimmter PKC Isoformen in die Zellmembran als Zeichen der Aktivierung konnte bereits nach Stimulation dendritischer Zellen mit LPS, einem integralen Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, beobachtet werden (Aksoy et al., 2002).

Die PKC Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$  II,  $\varepsilon$  und  $\delta$  spielen ferner eine wichtige Rolle in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 nach Stimulation mit dem PKC-Aktivator PMA (Kontny et al., 1999).

Die Beteiligung der PKC-Aktivierung in bakteriellen Infektionen wurde bereits nachgewiesen. *In vitro*-Studien zeigten, dass sie Bestandteil des Signalweges zur Expression von COX-2 in Zellen nach Infektion mit *Helicobacter pylori* (Chang et al., 2004) und *Staphylococcus aureus* ist (Lin et al., 2001). Außerdem bewirkt die Infektion von Alveolar-Epithelzellen mit *Legionella pneumophila* eine zeitabhängige Aktivierung und Translokation der PKC zur Zellmembran (N'Guessan et al., 2007).

Die Protein Kinase C spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Infektion von Säugetierzellen durch diverse Viren. Untersuchungen zeigten den Zusammenhang der Fusion von Syncytial-Viren (San Juan Vergara et al., 2004) und Influenza-Viren (Root et al., 2000) an Lungen-Epithelzellen und der PKC-Aktivierung. Des Weiteren reguliert die PKC die Funktion von Makrophagen während der Abwehrreaktion auf eine Infektion mit intrazellulären Erregern (St-Denis et al., 1999).

### 6.2 Protein Kinase C und IL-8 Expression

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Infektionsherd ist Teil der Immunantwort nach Kontakt mit Erregern. Die chemotaktische Wirkung von IL-8 auf neutrophile Granulozyten ruft eine vermehrte Migration ins Gewebe und eine verstärkte Degranulation hervor (Mukaida, 2003; Huber et al., 1991). Die schwere lebensbedrohliche Funktionsstörung der Lunge, ARDS, führt zu einer massiven Einwanderung von Granulozyten und geht mit erhöhten IL-8 Konzentrationen in der bronchioalveolären Lavage einher (Donnelly et al., 1993).

Die zentrale Rolle von IL-8 in der Pathogenese einer *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie ist bereits bekannt. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der PKC  $\alpha$  und  $\varepsilon$  eine reduzierte IL-8 Freisetzung zufolge hat und dass eine verminderte Bindung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 (RelA) am *il8* Promotor nach Inaktivierung der PKC  $\alpha$  nach Pneumokokkeninfektion von Bronchialepithelzellen stattfindet.

IL-8 wird beinahe in allen Zellen des menschlichen Körpers produziert. Lungen-Epithelzellen sind durch eine gesteigerte IL-8 Freisetzung in der Lage, auf verschiedene Erreger und toxische Substanzen zu reagieren. Eine Reihe viraler Infektionen, wie Influenza A (Julkunen et al., 2000) und Rhinoviren Infektion (Griego et al., 2000) oder bakterielle Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* (Yang et al., 2003), *Haemophilus influenzae* (Clemans et al., 2000), *Moraxella catarrhalis* (Slevogt et al., 2006), *Legionella pneumophila* (Schmeck et al., 2007) und *Streptococcus pneumoniae* (Schmeck et al., 2004) führen zu einer gesteigerten IL-8 Sekretion. Die Stimulation des Lungenepithels mit Asbest (Wang et al., 2006) und Zigarretenrauchextrakt (Glader et al., 2006) kann die IL-8 Freisetzung gleichermaßen beeinflussen.

Untersuchungen bezüglich des Einflusses von IL-8 auf die Infektion mit *S. pneumoniae* zeigten, dass die Stimulation von Alveolar-Epithelzellen mit CpB (Madsen et al., 2000) ebenso wie die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit Pneumolysin (Cockeran et al., 2001) zu einer Zunahme der IL-8 Sekretion führen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Hemmung der PKC  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\epsilon$  in mit *S. pneumoniae*-infizierten Bronchialepithelzellen zu einer verminderten IL-8 Expression. Die hier verwendete PCR-Methode ermöglicht über den Anstieg der Zytokinexpression nur eine qualitative Aussage. Deswegen wurden die Proben auf Proteinebene mit ELISA untersucht, um die Aussage zu präzisieren.

Ein weiterführender Versuch mittels Chromatin Immunopräzipitation zeigte, dass eine verminderte Bindung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 (RelA) am *il8* Promotor nach Inaktivierung der PKC  $\alpha$  stattfindet.

Nach Erkennung bakterieller Bestandteile von *Streptococcus pneumoniae* durch die membranständigen Rezeptoren TLR1 /2, TLR 4 (Schmeck et al., 2006) oder durch den intrazellulären Rezeptor Nod2 (Opitz et al., 2004) werden spezifische Signalwege aktiviert. Der *il8* Promoter besitzt Bindesequenzen für zahlreiche Transkriptionsfaktoren. Zu den wichtigsten zählen AP-1 und NF- $\kappa$ B (Holtmann et al., 1999).

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, zentraler Regulator der Expression von proinflammatorischen Genen, wird aktiviert und transloziert in den Kern. Für die Pneumokokken- induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige IL-8 Transkription ist nicht nur diese

Bindung am Promotor sondern auch die Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B Serinresten in Abhängigkeit von der p38 MAPK und Rac1 notwendig. AP-1 wird durch JNK phosphoryliert und aktiviert. Daraufhin reguliert er so zusammen mit NF- $\kappa$ B die IL-8 Expression (Schmeck et al., 2006). Die Tatsache das die Pneumokokken- induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige IL-8 Transkription, nicht nur von dessen Bindung am Promotor sondern auch von der Phosphorylierung der Serinreste durch p38 MAPK und Rac1 abhängig ist, macht die Komplexität der Zellaktivierung deutlich.

Bei Rac1 handelt es sich um eines von elf bei Säugetieren bekannten Rho Proteinen. Rho Proteine sind vor allem in der Regulation von Signalaktivierungswegen beteiligt. Sie gehören der Ras Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine an. Ihre Funktion ist die Regulation der Signaltransduktion und die Organisation von Mikrofilamenten (Ridley, 2006). Die Inhibition von Rac1 reduziert die IL-8 Freisetzung und die Rekrutierung der phosphorylierten NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 an den *i18* Promotor nach Infektion von Lungen-Epithelzellen mit Pneumokokken (Schmeck et al., 2006). Intakte kleine GTP-bindende Rho-Proteine sind Voraussetzung für die PMA oder LPS induzierte PKC-Aktivierung und Translokation in Endothelial- oder Bronchialepithelzellen (Hippenstiel et al., 1998). Castrillo et al. zeigte, dass die Protein Kinase C den Inhibitor von NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B, phosphorylieren und dadurch die Kerntranslokation und Aktivierung von NF- $\kappa$ B induzieren kann.

Bezüglich der hier verwendeten Methoden ist zu sagen, dass die Protein Kinase C in den vorliegenden Untersuchungen mit chemischen Inhibitoren gehemmt wurde. Die Mehrzahl der bis jetzt verfügbaren PKC Inhibitoren ist nicht in der Lage spezifisch zwischen den einzelnen Isoformen der PKC zu unterscheiden, weil diese sich funktionell und strukturell nur geringfügig unterscheiden. Diese Inhibitoren zielen auf die katalytische Domäne der Protein Kinase ab. Werden bestimmte Konzentrationen überschritten, so können die Inhibitoren mehrere Isoformen hemmen. Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen lagen zwar im Bereich der vom Hersteller zugesicherten spezifischen Wirkungsweise; eine Restunsicherheit bleibt dennoch bestehen. Geringere Proteinkonzentrationen infolge von zytotoxischen Effekten durch Einsatz von PKC Inhibitoren wurden im Vorfeld durch Laktatdehydrogenasemessungen in Zellüberständen ausgeschlossen. Um die durch die PKC Inhibition gewonnene Aussage

zu komplettieren, müsste man Zellen mit antisense RNA gegen PKC  $\alpha$  transfizieren, um diese Unsicherheit zu minimieren. Allerdings müsste auf Grund der schlechten Transfektionseffizienz der BEAS-2B-Zellen eine andere Zelllinie verwendet werden.

Ein großer Vorteil von BEAS-2B-Zellen besteht darin, dass immortalisierte Zelllinien längerfristig konstante zelluläre Eigenschaften ausprägen (Reedel et al., 1988). Jedoch unterscheiden sich die Eigenschaften von denen der Ursprungszellen. Um die in diesen Zellen gemachten Beobachtungen zu verifizieren, sollten zentrale Versuche in primären Bronchialepithelzellen wiederholt werden. Doch da die Gewinnung und Anzucht dieser Zellen große Schwierigkeiten bereitet, werden die meisten *in vitro*-Studien mit etablierten Zelllinien durchgeführt. Um die Relevanz der Ergebnisse zu bestätigen, könnten *in vivo* Untersuchungen mit PKC-defizienten Mäusen angeschlossen werden.

### 6.3 Protein Kinase C und IL-6 Freisetzung

Das pleiotropische Zytokin IL-6 ist für die Regulation der Immunantwort, die Entzündungsreaktion und die Hämatopoese von großer Bedeutung (Nishimoto und Kishimoto, 2006). Hier induzierte *Streptococcus pneumoniae* eine IL-6 Freisetzung in BEAS-2B-Zellen.

Untersuchungen bezüglich der Rolle von IL-6 belegen dessen Wichtigkeit bei der Akute-Phase-Reaktion und der Elimination von Bakterien während einer Infektion (Schaaf et al., 2005). IL-6 verzögert die Apoptose von neutrophilen Granulozyten und fördert ihre zytotoxischen Eigenschaften (Biffi et al., 1996). Ebenso sind verschiedene Antworten des Immunsystems IL-6 abhängig. Beispiel hierfür sind die T-Zell Proliferation, die Reifung von antigen-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten und die B-Zell Stimulation (Barton, 1997).

Während eines Entzündungsprozesses der Lunge wird IL-6 produziert. Der Einfluss isolierter Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*, wie Pneumolysin (Rijneveld et al., 2002) und Kapselpolysaccharide (Jagger et al., 2002), auf die IL-6 Freisetzung wurde nachgewiesen. Im Maus-Pneumokokkenpneumonie-Modell wurde eine vermehrte Freisetzung von IL-6 in der Lunge (Bergeron et al., 1998) sowie bei Infektion von IL6- Knockout Mäusen eine höhere Mortalität (van der Poll et al., 1997) nachgewiesen.

Ferner wurden in einer klinischen Studie an Patienten mit einseitiger Pneumonie höhere IL-6 Spiegel in der bronchioalveolären Lavage der erkrankten Lunge gefunden (Dehoux et al., 1994).

Nach der Infektion humaner Bronchialepithelzellen mit *S. pneumoniae* konnte eine Abhängigkeit der IL-6 Freisetzung von der PKC-Aktivität beobachtet werden.

Die hier beobachtete PKC-abhängige IL-6 Freisetzung bei Pneumokokkeninfektion korreliert mit Untersuchungen bei anderen Bakterieninfektionen, wie *Salmonella typhi* (Wang et al., 2005) und *Pseudomonas aeruginosa* (Boudreau et al., 2002).

Zahlreiche Untersuchungen legen den Zusammenhang von IL-6 und PKC nahe. Die Funktion der PKC bezüglich IL-6 ist gewebetypspezifisch (Gross, 1993). Bei Fibroblasten wird zum Beispiel die IL-6 Freisetzung unter hydrostatischem Druck durch die PKC reguliert (Koyama und Aizawa, 2002). Die Abhängigkeit der IL-6 Sekretion von der PKC-Aktivierung wurde in Bronchialepithelzellen nach Stimulation mit Staub aus Schwein- (Romberger et al., 2002) und Rindermastbetrieben (Wyatt et al., 2007), sowie mit TNF- $\alpha$  (Graness et al., 2002) bereits nachgewiesen.

### **6.4 Einfluss von Kalzium und Phospholipase C auf die IL-8 Freisetzung**

Die Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> durch die spezifische Phospholipase C ist eine von den ersten Schlüsselmechanismen in der Regulation verschiedener Zellfunktionen. Als Produkt entstehen zwei intrazelluläre Botenstoffe, Diacylglycerol und IP<sub>3</sub>. Letzteres bewirkt durch Öffnung spezifischer Kanäle des endoplasmatischen Retikulums eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung (Rhee und Bae, 1997).

Weil Diacylglycerol und Kalzium wichtige Bestandteile des Aktivierungsweges der klassischen Protein Kinase C darstellen, wurde zunächst getestet, ob die Hemmung der PLC mit U73122, einem membranpermeablen Inhibitor der PLC, zu einer Abnahme der IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken führte. Dies konnte gezeigt werden.

Die Aktivierung der Phospholipase C und die Protein Kinase C in der Zytokinfreisetzung wurden vielfach in Verbindung gebracht. Die Komplexität der Signalwege in

unterschiedlichen Zellen lässt aber keine generelle Aussage zu. So führt die Stimulation von Alveolarmakrophagen mit dem Endotoxin LPS PLC-abhängig, aber PKC-unabhängig, zur Freisetzung von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-8 und zur NF- $\kappa$ B Bindung an den Promotor (Carter et al., 1998). Andererseits ist die TNF- $\alpha$  Freisetzung in Alveolarmakrophagen PKC-abhängig (Tschaikowsky, 1994).

Die Selektivität der Inhibition von PLC-abhängigen Signalwegen durch U73122 wurde bereits in humanen Thrombozyten (Lockhart und McNicol, 1999) und neutrophilen Granulozyten (Wang, 1996) gezeigt. *In vivo* führte die Inhibition der PLC mit U73122 zur Hemmung der Ödembildung, der Makrophagen- und Lymphozytenakkumulation und Infiltration, sowie der PGE<sub>2</sub> Freisetzung in verschiedenen Tiermodellen. Auf diese Weise konnte ihre Aktivierung mit diversen akuten und chronischen Entzündungsreaktionen in Zusammenhang gebracht werden (Hou et al., 2004).

Während infektiöser Erkrankungen spielen die Aktivierung der PLC und die Zunahme des intrazellulären Kalziums eine wichtige Rolle. Das hitzestabile Enterotoxin von *E.coli* (Bhattacharya und Chakrabarti, 1998) und *Yersenia enterocolitica* (Saha et al., 2005) ruft eine Phospholipase C- und IP<sub>3</sub>-abhängige Zunahme des intrazellulären Kalziums in intestinalen Epithelzellen von Ratten hervor.

Die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration ist wichtig für zelluläre Funktionen. Zellen verwenden für die Erzeugung von Signalen zwei Kalziumquellen: Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und Kalziumeinstrom durch die Plasmamembran (Bootman und Berridge, 1995).

Es ist bereits bekannt, dass die Zunahme des intrazellulären Kalziumspiegels die Freisetzung von IL-8 in Mastzellen (Kim et al., 2005) und neutrophilen Granulozyten (Kuhns et al., 1998) steigert. Nun wurde hier überprüft, ob eine Veränderung des intrazellulären Kalziumspiegels eine Auswirkung auf die IL-8 Produktion in humanen Bronchialepithelzellen hat. Die Bindung von Kalzium an intrazelluläre Chelatoren verursacht eine Abnahme der IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken. Andererseits konnte der extrazelluläre Kalziumchelator EGTA die IL-8 Freisetzung nicht beeinflussen. Eine Untersuchung von Sakamoto et al. zeigte, dass die IL-8 Freisetzung auch nach Exposition von

Bronchialepithelzellen gegenüber EHC-93 Feinstaubpartikeln nach dem Einsatz intrazellulärer Kalziumchelatoren vermindert war.

Zusammenfassend führte sowohl die Hemmung der PLC als auch des intrazellulären Kalziumanstieges zu einer verminderten IL-8 Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken.

### 6.5 Protein Kinase C und Prostaglandinstoffwechsel

Lipidmetabolite aus Arachidonsäure, wie Prostaglandine und Leukotriene, sind wichtige Mediatoren des angeborenen Immunsystems. PGE<sub>2</sub> ist ein potentes proinflammatorisches Prostaglandin und wird am Entzündungsherd produziert. In der Lunge limitiert es im Gegensatz zu anderen Organen die Entzündungsreaktion und beeinflusst Gewebereparaturprozesse (Harris et al., 2002; Vancheri et al., 2004).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die COX-2 Expression sowie die PGE<sub>2</sub> Freisetzung nach Infektion von Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus pneumoniae* Protein Kinase C abhängig sind.

Der geschwindigkeitslimitierende Schritt in der Prostaglandinsynthese wird von den COX-Enzymen katalysiert. Während COX-1 konstitutionell in den meisten Zellen produziert wird, ist die COX-2 Expression normalerweise sehr niedrig exprimiert und wird durch unterschiedlichste Stimuli stark induziert (Uchiya und Nikai , 2004).

Eine Infektion bewirkt eine Zunahme der Prostaglandinfreisetzung. Es konnte bereits eine Pneumokokken-induzierte COX-2 Expression und PGE<sub>2</sub> Freisetzung in humanen Bronchialepithelzellen beobachtet werden. Auch eine Induktion der COX-2 *in vivo* bei Mäusen wurde nachgewiesen (N'Guessan et al., 2006).

Die Beobachtung, dass *Chlamydia pneumoniae* (Jahn et al., 2000), RS-Viren (Richardson et al., 2005) und Influenza-Viren (Mizumura et al., 2003) auch die COX-2 Expression in Lungen-Epithelzellen induzieren, bringt die potentielle Rolle der COX-2 in der Infektion der Lunge zum Ausdruck.

Eine PKC-abhängige COX-2 Expression und PGE<sub>2</sub> Freisetzung in Lungen-Epithelzellen konnte neben *S. pneumoniae* auch für andere bakterielle Erreger wie *Legionella*

*pneumophila* (N'Guessan et al., 2007), für bakterielle Bestandteile wie *Staphylococcus aureus* Lipoteichonsäure (Lin et al., 2001), sowie für die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  (Chen et al., 2000), gezeigt werden. Diese Beobachtung scheint in anderen Zelllinien ähnlich zu sein. So berichtete Deva et al. eine PKC-abhängige COX-2 Freisetzung in den Epithelzellen vom HeLa Typ nach *Candida albicans*-Infektion (Deva et al., 2003).

### 6.6 Ausblick

Die Pneumokokkenpneumonie verursacht Millionen von Todesfällen jährlich. Die ständige Zunahme von Resistenzen in der Antibiotikatherapie und die steigende Zahl anfälliger Menschen machen die Suche nach neuen Therapieansätzen unabdingbar.

Während der Infektion der Lunge bildet das Lungenepithel die erste Barriere für invadierende Pathogene. Neben dieser wichtigen Rolle als mechanische Barriere, reguliert und aktiviert es die Immunantwort in der Lunge durch die Sekretion von Zytokinen und antimikrobiellen Substanzen (Hippenstiel et al., 2007).

Die Expression und Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren steht am Ende einer Reihe von Signalkaskaden nach Kontakt mit Pathogenen. Daher waren die zentralen Mechanismen der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und dem Lungenepithel in den letzten Jahren Schwerpunkt mehrerer Arbeiten.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Infektion von Bronchialepithelzellen mit Pneumokokken zur Aktivierung der Protein Kinase C führt.

Es wurde auch gezeigt, dass die Pneumokokken-induzierten IL-8-, IL-6- und COX-2-Sekretionen PKC-abhängig sind.

Mit der Beobachtung, dass die Inhibition der PKC eine verminderte Bindung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 (Rel A) am *IL8* Promotor bewirkt, ist eine mechanistische Einordnung der PKC möglich. Sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit, als auch Untersuchungen bezüglich der Aktivierung verschiedenerer Kinasen, wie p38 MAPK und JNK, betonen die Relevanz der Pneumokokken-induzierten NF- $\kappa$ B-abhängigen IL-8 Expression.

## DISKUSSION

---

Unklar bleibt jedoch, zu welchem Anteil diese Signalwege die IL-8 Freisetzung beeinflussen. Die detaillierte Interaktion dieser Kinasen könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

Das genauere Verständnis des Signalweges der Zellantwort auf Pneumokokken ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

### 7 Zusammenfassung

#### **Bedeutung der Protein Kinase C für die Pneumokokken-induzierte Aktivierung bronchialer Epithelzellen**

Die Pneumonie ist die Haupttodesursache durch Infektionskrankheiten in den Industrieländern. *Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Das vermehrte Auftreten Antibiotika-resistenter Stämme erfordert die Entwicklung alternativer Therapiestrategien. Die besondere Bedeutung der Immunantwort in der Pathogenese der Pneumonie macht die Erforschung der molekularen Mechanismen der Zellaktivierung zu einem vielversprechenden Ansatz.

Die Bronchialepithelzellen stellen eine erste Barriere gegen Pathogene dar und setzen die Kaskade der Immunantwort in Gang. Nach der Erkennung von *S. pneumoniae* durch Toll-like Rezeptoren (TLR) wird IL-8, ein bedeutendes Zytokin der Immunantwort, vermehrt freigesetzt. Die Expression von IL-8 wird von verschiedenen Kinasen und durch Bindung des Transkriptionsfaktors nukleären Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) am *il8* Promotor reguliert.

Da eine Beteiligung der Protein Kinase C (PKC) bei der Expression von Zytokinen in bakteriellen Infektionen bereits bekannt ist, hat die vorliegende Arbeit das Ziel die Rolle der PKC in der Zellaktivierung nach Pneumokokkeninfektion zu identifizieren.

Die Stimulation mit Pneumokokken induzierte die Aktivierung der PKC in der humanen Bronchial-Epithelzelllinie BEAS-2B. Die Untersuchung einzelner PKC Isoformen im Western Blot zeigte eine Translokation von PKC  $\alpha$  und  $\epsilon$  zur Membran als Zeichen der Aktivierung. Des Weiteren resultierte die Hemmung der PKC  $\alpha$  mit den spezifischen Inhibitoren PKC Inhibitor 20-28 und Gö 6976 in einer signifikanten Abnahme der IL-8 und der IL-6 Freisetzung und verminderte die COX-2 Expression und die PGE2 Freisetzung. Außerdem führte die Hemmung von zwei stromabwärts gelegenen Faktoren der PKC-Aktivierung, Phospholipase C und Kalzium, mit spezifischen Inhibitoren zu einer verminderten IL-8 Freisetzung. Experimente mittels Chromatin Immunopräzipitation zeigten, dass die Inhibition der PKC mit dem spezifischen PKC

## ZUSAMMENFASSUNG

---

Inhibitor 20-28 die Bindung der NF- $\kappa$ B Untereinheit p65 (RelA) und der RNA Polymerase II (Pol II) an den *i18* Promotor vermindert.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die Aktivierung der Protein Kinase C durch *Streptococcus pneumoniae* in humanen Bronchialepithelzellen an der Freisetzung von Zytokinen und dem Prostaglandinstoffwechsel beteiligt ist. Die Pneumokokken-induzierte IL-8 Freisetzung erfolgt durch die Modulation des NF- $\kappa$ B (p65) und der Pol II.

### 8 Literatur

Akira, S., und Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* 4, 499-511.

Aksoy, E., Amraoui, Z., Goriely, S., Goldman, M. und Willems, F. (2002). Critical role of protein kinase C epsilon for lipopolysaccharide-induced IL-12 synthesis in monocyte-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology* 32, 3040-3049.

Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A. et al. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cellular Microbiology* 9, 633-644.

Aschner, J.L., Lum, H., Fletcher, P.W. und Malik, A.B. (1997). Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *Journal of Cellular Physiology* 173, 387-396.

Austrian, R. (1999). The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *The Journal of Infectious Diseases* 179 Suppl 2, 338-341.

Baggiolini, M., Moser, B., und Clark-Lewis, I. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines. The Giles Filley Lecture. *Chest* 105, 95-98.

Bartlett, J.G., Breiman, R.F., Mandell, L.A., and File, T.M., Jr. (1998). Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. The Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 26, 811-838.

Barton, B.E. (1997). IL-6: insights into novel biological activities. *Clinical Immunology and Immunopathology* 85, 16-20.

Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.M., Simard, M., Olivier, M. und Bergeron, M.G. (1998). Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infection and Immunity* 66, 912-922.

Bhattacharya, J. und Chakrabarti, M.K. (1998). Rise of intracellular free calcium levels with activation of inositol triphosphate in a human colonic carcinoma cell line (COLO 205) by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta* 1403, 1-4.

## LITERATUR

---

Biffi, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A. und Barnett, C.C., Jr. (1996). Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *The Journal of Trauma* 40, 575-579.

Bonizzi, G. und Karin, M. (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in Immunology* 25, 280-288.

Bootman, M.D. und Berridge, M.J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83, 675-678.

Boudreau, R.T., Garduno, R. und Lin, T.J. (2002). Protein phosphatase 2A and protein kinase Calpha are physically associated and are involved in *Pseudomonas aeruginosa*-induced interleukin 6 production by mast cells. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 5322-5329.

Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M. et al. (2002). The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16969-16974.

Buttery, J. und Moxon, E.R. (2002). Capsulate bacteria and the lung. *British Medical Bulletin* 61, 63-80.

Cardozo, D.M., Nascimento-Carvalho, C.M., Souza, F.R. und Silva, N.M. (2006). Nasopharyngeal colonization and penicillin resistance among pneumococcal strains: a worldwide 2004 update. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 10, 293-304.

Carter, A.B., Monick, M.M. und Hunninghake, G.W. (1998). Lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation and cytokine release in human alveolar macrophages is PKC-independent and TK- and PC-PLC-dependent. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 18, 384-391.

Castrillo, A., Pennington, D.J., Otto, F., Parker, P.J., Owen, M.J. und Bosca, L. (2001). Protein kinase C epsilon is required for macrophage activation and defense against bacterial infection. *The Journal of Experimental Medicine* 194, 1231-1242.

Catterall, J.R. (1999). *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 54, 929-937.

Chang, Y.J., Wu, M.S., Lin, J.T. et al. (2004). Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappa B activation. *Molecular Pharmacology* 66, 1465-1477.

## LITERATUR

---

Chen, C.C., Sun, Y.T., Chen, J.J. und Chiu, K.T. (2000). TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *The Journal of Immunology* 165, 2719-2728.

Clemans, D.L., Bauer, R.J., Hanson, J.A. et al. (2000). Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable Haemophilus influenzae. *Infection and Immunity* 68, 4430-4440.

Cockeran, R., Steel, H.C., Mitchell, T.J., Feldman, C. und Anderson, R. (2001). Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E(2) and leukotriene B(4) by human neutrophils. *Infection and Immunity* 69, 3494-3496.

Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L. et al (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* 233, 859-866.

Crouch, E. und Wright, J.R. (2001). Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annual Review of Physiology* 63, 521-554.

Dehoux, M.S., Boutten, A., Ostinelli, J. et al. (1994). Compartmentalized cytokine production within the human lung in unilateral pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150, 710-716.

Delclaux, C. und Azoulay, E. (2003). Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *The European Respiratory Journal* 42, 10-14.

Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D. et al. (2000). Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *American Journal of Physiology* 279, 429-438.

Deva, R., Shankaranarayanan, P., Ciccoli, R. und Nigam, S. (2003). Candida albicans induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *The Journal of Immunology* 171, 3047-3055.

Donnelly, S.C., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. et al. (1993). Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet* 341, 643-647.

## LITERATUR

---

Ewig, S., Torres, A. und Woodhead, M. (2006). Assessment of pneumonia severity: a European perspective. *European Respiratory Journal* 27, 6-8.

Feldman, C., Munro, N.C., Jeffery, P.K. *et al.* (1991). Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 5, 416-423.

Finch, R. (2001). Community-acquired pneumonia: the evolving challenge. *Clinical Microbiology and Infection* 7 *Suppl* 3, 30-38.

Garibaldi, R.A. (1985). Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. Incidence, etiology, and impact. *The American Journal of Medicine* 78, 32-37.

Glader, P., Moller, S., Lilja, J., Wieslander, E., Lofdahl, C.G. und von Wachenfeldt, K. (2006). Cigarette smoke extract modulates respiratory defence mechanisms through effects on T-cells and airway epithelial cells. *Respiratory medicine* 100, 818-827.

Graness, A., Chwieralski, C.E., Reinhold, D., Thim, L. und Hoffmann, W. (2002). Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 18440-18446.

Greene, C.M. und McElvaney, N.G. (2005). Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 53, 418-427.

Griego, S.D., Weston, C.B., Adams, J.L., Tal-Singer, R. und Dillon, S.B. (2000). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in rhinovirus-induced cytokine production by bronchial epithelial cells. *The Journal of Immunology* 165, 5211-5220.

Gross, V., Zhang, B., Geng, Y., Villiger, P.M. und Lotz, M. (1993). Regulation of interleukin-6 (IL-6) expression: evidence for a tissue-specific role of protein kinase C. *Journal of Clinical Immunology* 13, 310-320.

Grossman, R.F., Rotschafer, J.C. und Tan, J.S. (2005). Antimicrobial treatment of lower respiratory tract infections in the hospital setting. *The American Journal of Medicine* 118 *Suppl* 7A, 29-38.

## LITERATUR

---

Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, und Rohde M. (2005) Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infection and Immunology*; 73, 4653-4667.

Harris, S.G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. und Phipps, R.P. (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in Immunology* 23, 144-150.

Hashimoto, C., Hudson, K.L. und Anderson, K.V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.

Hausdorff, W.P., Feikin, D.R. und Klugman, K.P. (2005). Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *The Lancet infectious diseases* 5, 83-93.

Hippenstiel, S., Kratz, T., Krull, M., Seybold, J., von Eichel-Streiber, C. und Suttorp, N. (1998). Rho protein inhibition blocks protein kinase C translocation and activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 245, 830-834.

Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B. und Suttorp, N. (2006). Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia-molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respiratory Research* 7, 97.

Hippenstiel, S., Witzenrath, M., Opitz, B., Schutte, H., Rosseau, S. und Suttorp, N. (2007). New aspects of the pathophysiology of pneumonia. *Der Internist* 48, 459-467.

Hoffken, G. und Niederman, M.S. (2002). Nosocomial pneumonia: the importance of a de-escalating strategy for antibiotic treatment of pneumonia in the ICU. *Chest* 122, 2183-2196.

Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H. und Kracht, M. (2002). Multiple control of interleukin-8 gene expression. *Journal of Leukocyte Biology* 72, 847-855.

Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P. et al. (1999). Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Molecular and Cellular Biology* 19, 6742-6753.

Hou, C., Kirchner, T., Singer, M., Matheis, M., Argentieri, D. und Cavender, D. (2004). In vivo activity of a phospholipase C inhibitor, 1-(6-((17 $\beta$ -3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl)-1H-pyrrole -

## LITERATUR

---

2,5-dione (U73122), in acute and chronic inflammatory reactions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309, 697-704.

Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., 3<sup>rd</sup> und Weiss, S.J. (1991). Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254, 99-102.

Hug, H. und Sarre, T.F. (1993). Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *The Biochemical Journal* 291, 329-343.

Hunterman I. und Lorenz J. (2006). Ambulant Erworbene Pneumonie (AEP)-Community Acquired Pneumonia. (CAPNETZ).

Huppertz H.I. (2003) Erkrankungen durch Pneumokokken. *Monatsschr Kinderheilkd* 151:384–390

Inohara, Chamaillard, McDonald, C. und Nunez, G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annual Review of Biochemistry* 74, 355-383.

Jagger, M.P., Huo, Z. und Riches, P.G. (2002). Inflammatory cytokine (interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha) release in a human whole blood system in response to *Streptococcus pneumoniae* serotype 14 and its capsular polysaccharide. *Clinical and Experimental Immunology* 130, 467-474.

Jahn, H.U., Krull, M., Wuppermann, F.N. et al. (2000). Infection and activation of airway epithelial cells by *Chlamydia pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases* 182, 1678-1687.

Janeway, C.A., Jr. und Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.

Janssens, J.P. (2005). Pneumonia in the elderly (geriatric) population. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11, 226-230.

Jedrzejewski, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 187-207.

Jounblat, R., Clark, H., Eggleton, P., Hawgood, S., Andrew, P.W. und Kadioglu, A. (2005). The role of surfactant protein D in the colonisation of the respiratory tract and onset of bacteraemia during pneumococcal pneumonia. *Respiratory Research* 6, 126.

## LITERATUR

---

Julkunen, I., Melen, K., Nyqvist, M., Pirhonen, J., Sareneva, T. und Matikainen, S. (2000). Inflammatory responses in influenza A virus infection. *Vaccine 19 Suppl 1*, 32-37.

Kadioglu, A. und Andrew, P.W. (2004). The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immunology 25*, 143-149.

Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. und Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews 6*, 288-301.

Kalin, M. (1998). Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax 53*, 159-162.

Kim, M.S., Lim, W.K., Park, R.K. et al. (2005). Involvement of mitogen-activated protein kinase and NF-kappa B activation in Ca<sup>2+</sup>-induced IL-8 production in human mast cells. *Cytokine 32*, 226-233.

Kishimoto, T. (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Research and Therapy 8 Suppl 2*, 2.

Kontny, E., Ziolkowska, M., Ryzewska, A. und Maslinski, W. (1999). Protein kinase c-dependent pathway is critical for the production of pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha, IL-1beta, IL-6). *Cytokine 11*, 839-848.

Koyama, S. und Aizawa, M. (2002). PKC-dependent IL-6 production and inhibition of IL-8 production by PKC activation in normal human skin fibroblasts under extremely high hydrostatic pressure. *Extremophiles 6*, 413-418.

Kuhns, D.B., Young, H.A., Gallin, E.K. und Gallin, J.I. (1998). Ca<sup>2+</sup>-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils. *The Journal of Immunology 161*, 4332-4339.

Kuronuma, K., Sano, H., Kato, K. et al. (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. *The Journal of Biological Chemistry 279*, 21421-21430.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. und Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell 86*, 973-983.

## LITERATUR

---

Lin, C.H., Kuan, I.H., Lee, H.M. et al. (2001). Induction of cyclooxygenase-2 protein by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* in human pulmonary epithelial cells: involvement of a nuclear factor-kappa B-dependent pathway. *British Journal of Pharmacology* 134, 543-552.

Liu, J.P. (1996). Protein kinase C and its substrates. *Molecular and cellular endocrinology* 116, 1-29.

Lockhart, L.K. und McNicol, A. (1999). The phospholipase C inhibitor U73122 inhibits phorbol ester-induced platelet activation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289, 721-728.

Lynch, J.J., Ferro, T.J., Blumenstock, F.A., Brockenauer, A.M. und Malik, A.B. (1990). Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *The Journal of Clinical Investigation* 85, 1991-1998.

Lynch, J.P., 3rd (2001). Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 119, 373-384.

Madsen, M., Lebenthal, Y., Cheng, Q., Smith, B.L. und Hostetter, M.K. (2000). A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 1330-1336.

Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C. et al. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 1966-1971.

Martin, T.R. und Frevert, C.W. (2005). Innate immunity in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2, 403-411.

Mason, C.M. und Nelson, S. (2005). Pulmonary host defenses and factors predisposing to lung infection. *Clinics in Chest Medicine* 26, 11-17.

Masterton, R., Craven, D., Rello, J. et al. (2007). Hospital-acquired pneumonia guidelines in Europe: a review of their status and future development. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60, 206-213.

Medzhitov, R. und Janeway, C.A., Jr. (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Seminars in Immunology* 10, 351-353.

## LITERATUR

---

Mizumura, K., Hashimoto, S., Maruoka, S. et al. (2003). Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells. *Clinical and Experimental Allergy* 33, 1244-1251.

Mukaida, N. (2003). Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *American Journal of Physiology* 284, 566-577.

Musashi, M., Ota, S. und Shiroshita, N. (2000). The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *International Journal of Hematology* 72, 12-19.

N'Guessan, P.D., Etouem, M.O., Schmeck, B. et al. (2007). Legionella pneumophila-induced PKC $\alpha$ -, MAPK-, and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *American Journal of Physiology* 292, 267-277.

N'Guessan, P.D., Hippenstiel, S., Etouem, M.O. et al. (2006). Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *American Journal of Physiology* 290, 1131-1138.

Netea, M.G., van der Meer, J.W., van Deuren, M. und Kullberg, B.J. (2003). Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends in Immunology* 24, 254-258.

Newton, A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 28495-28498.

Nicolau, D. (2002). Clinical and economic implications of antimicrobial resistance for the management of community-acquired respiratory tract infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 50 Suppl S1, 61-70.

Nishimoto, N. und Kishimoto, T. (2006). Interleukin 6: from bench to bedside. *Nature Clinical Practice* 2, 619-626.

Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

Novotny, A., Emmanuel, K., Bartels, H., Siewert, J.R. und Holzmann, B. (2005). Indicators for early prediction of outcome in sepsis. *Der Chirurg* 76, 837-844.

## LITERATUR

---

Opitz, B., Puschel, A., Schmeck, B. et al. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 36426-36432.

Park, J.Y., Pillinger, M.H. und Abramson, S.B. (2006). Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clinical Immunology* 119, 229-240.

Paterson, G.K. und Mitchell, T.J. (2006). Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* 152, 285-293.

Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. und Mitchell, T.J. (1993). Molecular Analysis of the Pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annual Review of Microbiology* 47, 89-115.

Reddel, R.R., Ke, Y., Gerwin, B.I. et al. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research* 48, 1904-1909.

Reinert, R.R., Rodloff, A.C., Halle, E. et al. (2004). Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Germany and activity of the Ketolide Telithromycin: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). *Chemotherapy* 50, 143-151.

Remick, D.G. (2005). Interleukin-8. *Critical Care Medicine* 33, 466-467.

Rhee, S.G. und Bae, Y.S. (1997). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 15045-15048.

Richardson, J.Y., Ottolini, M.G., Pletneva, L. et al. (2005). Respiratory syncytial virus (RSV) infection induces cyclooxygenase 2: a potential target for RSV therapy. *The Journal of Immunology* 174, 4356-4364.

Ridley, A.J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology* 16, 522-529.

Rijneveld, A.W., van den Dobbelsteen, G.P., Florquin, S. et al. (2002). Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *The Journal of Infectious Diseases* 185, 123-126.

## LITERATUR

---

Romberger, D.J., Bodlak, V., Von Essen, S.G., Mathisen, T. und Wyatt, T.A. (2002). Hog barn dust extract stimulates IL-8 and IL-6 release in human bronchial epithelial cells via PKC activation. *Journal of Applied Physiology* 93, 289-296.

Root, C.N., Wills, E.G., McNair, L.L. und Whittaker, G.R. (2000). Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *The Journal of General Virology* 81, 2697-2705.

Rosseau, S. und Suttorp, N. (2000). Community-acquired infections of the respiratory tract and lung parenchyma. Clinical and experimental aspects. *Der Internist* 41, 1158-1169.

Saha, S., Gupta, D.D. und Chakrabarti, M.K. (2005). Involvement of phospholipase C in *Yersinia enterocolitica* heat stable enterotoxin (Y-STa) mediated rise in intracellular calcium level in rat intestinal epithelial cells. *Toxicon* 45, 361-367.

Sakamoto, N., Hayashi, S., Gosselink, J. et al. (2007). Calcium dependent and independent cytokine synthesis by air pollution particle-exposed human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 225, 134-141.

Salyers AA und Whitt DD (1994) *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*

San-Juan-Vergara, H., Peeples, M.E., Lockey, R.F. und Mohapatra, S.S. (2004). Protein kinase C- $\alpha$  activity is required for respiratory syncytial virus fusion to human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology* 78, 13717-13726.

Schaaf, B., Rupp, J., Muller-Steinhardt, M. et al. (2005). The interleukin-6 -174 promoter polymorphism is associated with extrapulmonary bacterial dissemination in *Streptococcus pneumoniae* infection. *Cytokine* 31, 324-328.

Schmeck, B., Huber, S., Moog, K. et al. (2006a). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *American Journal of Physiology* 290, 730-L737.

Schmeck, B., Moog, K., Zahlten, J. et al. (2006b). *Streptococcus pneumoniae* induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respiratory Research* 7, 98.

Schmeck, B., N'Guessan, P.D., Ollomang, M. et al. (2007). *Legionella pneumophila*-induced NF- $\kappa$ B- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *European Respiratory Journal* 29, 25-33.

## LITERATUR

---

Schmeck, B., Zahlten, J., Moog, K. *et al.* (2004). Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 53241-53247.

Schroder, N.W., Morath, S., Alexander, C. *et al.* (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 15587-15594.

Siflinger-Birnboim, A., Goligorsky, M.S., Del Vecchio, P.J. und Malik, A.B. (1992). Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Laboratory Investigation* 67, 24-30.

Siflinger-Birnboim, A. und Johnson, A. (2003). Protein kinase C modulates pulmonary endothelial permeability: a paradigm for acute lung injury. *American Journal of Physiology* 284, 435-451.

Slevogt, H., Schmeck, B., Jonat, C. *et al.* (2006). Moraxella catarrhalis induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via MAPK and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *American Journal of Physiology* 290, 818-826.

Spitaler, M. und Cantrell, D.A. (2004). Protein kinase C and beyond. *Nature Immunology* 5, 785-790.

St-Denis, A., Caouras, V., Gervais, F. und Descoteaux, A. (1999). Role of protein kinase C-alpha in the control of infection by intracellular pathogens in macrophages. *The Journal of Immunology* 163, 5505-5511.

Strieter, R.M., Belperio, J.A. und Keane, M.P. (2003). Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16, 193-198.

Takeda, K. und Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology* 17, 1-14.

Tan, S.L. und Parker, P.J. (2003). Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling. *The Biochemical Journal* 376, 545-552.

Tilley, S.L., Coffman, T.M. und Koller, B.H. (2001). Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation* 108, 15-23.

## LITERATUR

---

Tiraby, J.G. und Fox, M.S. (1973). Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70, 3541-3545.

Toews, G.B. (2001). Cytokines and the lung. *The European Respiratory Journal* 34, 3-17.

Tschaikowsky, K. (1994). Protein kinase C inhibitors suppress LPS-induced TNF production in alveolar macrophages and in whole blood: the role of encapsulation into liposomes. *Biochimica et biophysica acta* 1222, 113-121.

Uchiya, K. und Nikai, T. (2004). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection induces cyclooxygenase 2 expression in macrophages: involvement of *Salmonella* pathogenicity island 2. *Infection and Immunity* 72, 6860-6869.

Ulanova, M., Puttagunta, L., Marcet-Palacios, M. et al. (2005). Syk tyrosine kinase participates in beta1-integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology* 288, 497-507.

van der Poll, T., Keogh, C.V., Guirao, X., Buurman, W.A., Kopf, M. und Lowry, S.F. (1997). Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases* 176, 439-444.

Vancheri, C., Mastruzzo, C., Sortino, M.A. und Crimi, N. (2004). The lung as a privileged site for the beneficial actions of PGE<sub>2</sub>. *Trends in Immunology* 25, 40-46.

Wagner, S., Harteneck, C., Hucho, F. und Buchner, K. (2000). Analysis of the subcellular distribution of protein kinase C $\alpha$  using PKC-GFP fusion proteins. *Experimental Cell Research* 258, 204-214.

Wang, F., Zhang, X.L., Zhou, Y., Ye, L., Qi, Z. und Wu, J. (2005). Type IVB pilated *Salmonella typhi* enhance IL-6 and NF- $\kappa$ B production in human monocytic THP-1 cells through activation of protein kinase C. *Immunobiology* 210, 283-293.

Wang, J.P. (1996). U-73122, an aminosteroid phospholipase C inhibitor, may also block Ca<sup>2+</sup> influx through phospholipase C-independent mechanism in neutrophil activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 353, 599-605.

## LITERATUR

---

Wang, X., Wu, Y., Stonehuerner, J.G. et al. (2006). Oxidant generation promotes iron sequestration in BEAS-2B cells exposed to asbestos. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 34, 286-292.

Welte, T., Marre, R und Suttorp, N. (2004). Competence network "community acquired pneumonia" (CAPNETZ). A first interim report. *Der Internist* 45, 393-401.

Welte, T., Marre, R. und Suttorp, N. (2006). What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?. *Medizinische Klinik* 101, 313-320.

Woodhead, M. (2002). Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *The European Respiratory Journal* 36, 20-27.

Wyatt, T.A., Slager, R.E., Devasure, J. et al. (2007). Feedlot dust stimulation of interleukin-6 and -8 requires protein kinase Cepsilon in human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology* 293, 1163-1170.

Yang, J., Hooper, W.C., Phillips, D.J., Tondella, M.L. und Talkington, D.F. (2003). Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Chlamydia pneumoniae* infection. *Infection and Immunity* 71, 614-620.

## **9 Anhang**

### **9.1 Danksagung**

Im besonderen möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Bernd Schmeck und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Hippenstiel für die hervorragende Betreuung meine Arbeit und die vielen wertvollen Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Suttorp danke ich, dass er mir die Gelegenheit gab, in seiner Arbeitsgruppe tätig zu werden.

Der gesamten Arbeitsgruppe, besonders Dr. Philippe Dje N´Guessan und Kremena Vardarova, danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre. Die Unterstützung durch Jaqueline Hellwig war mir eine sehr große Hilfe.

Mein besonderer Dank geht an meine Freunde und meine deutsch-chilenische Familie für die wichtige Unterstützung.

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

## **9.2 Selbständigkeitserklärung**

Ich, Claudia Elizabeth Vallebella Pastén, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Bedeutung der Protein Kinase C für die Pneumokokken-induzierte Aktivierung bronchialer Epithelzellen“ selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Auch in Teilen ist sie keine Kopie andere Arbeiten.

Wellington, den 04. Dezember 2009