

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Bedeutung von TLR-2 und TLR-4 und der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B  
und AP-1 für die *S. pneumoniae*-induzierte Aktivierung pulmonaler  
Epithelzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kerstin Moog

aus Vacha

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. N. Suttorp

2. Prof. Dr. med. T. Welte

3. Prof. Dr. med. R. R. Schumann

Datum der Promotion: 01.06.2008

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>VERZEICHNISSE</b> .....	<b>6</b>
1.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	6
1.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	6
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>11</b>
2.1	<i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> .....	11
2.1.1	<i>Allgemeines</i> .....	11
2.1.2	<i>Der Erreger und seine Virulenzfaktoren</i> .....	12
2.1.3	<i>Die Pneumokokkenpneumonie</i> .....	14
2.2	DAS IMMUNSYSTEM .....	16
2.2.1	<i>Allgemeines</i> .....	16
2.2.2	<i>Die angeborene Immunantwort</i> .....	17
2.2.3	<i>Pathogen-assoziierte Molekulare Muster (PAMPs)</i> .....	18
2.2.4	<i>Mustererkennende Rezeptoren</i> .....	19
2.2.5	<i>Toll-like Rezeptoren (TLRs)</i> .....	19
2.2.6	<i>Die Erkennung von Pneumokokken</i> .....	23
2.2.7	<i>Zytokine und Chemokine</i> .....	24
2.2.8	<i>Granulozyten-Makrophagen-Colony stimulierender Faktor (GM-CSF)</i> .....	25
2.3	DIE INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION .....	26
2.3.1	<i>Der Toll-like Rezeptor (TLR)-Signalweg</i> .....	26
2.3.2	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinasen</i> .....	29
2.3.2.1	<i>p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i> .....	31
2.3.3	<i>Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B (NF-κB)</i> .....	32
2.3.4	<i>Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1)</i> .....	35
<b>3</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>38</b>
4.1	MATERIAL .....	38
4.1.1	<i>Materialien für das Arbeiten mit Bakterien</i> .....	38
4.1.1.1	<i>Medien für die Bakterienkultur</i> .....	38
4.1.1.2	<i>Weitere benötigte Materialien für das Arbeiten mit Bakterien</i> .....	39
4.1.2	<i>Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen</i> .....	40
4.1.3	<i>Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten</i> .....	40
4.1.4	<i>Stimulanzien, Inhibitoren und Enzyme</i> .....	42
4.1.5	<i>Puffer, Lösungen und Gele</i> .....	42
4.1.6	<i>Primer, Oligonukleotide und Antikörper</i> .....	45
4.1.7	<i>Geräte</i> .....	46
4.1.8	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	46

4.2	METHODEN .....	48
4.2.1	<i>Pneumokokkenkultur und -stimulation</i> .....	48
4.2.1.1	Pneumokokkenstämme.....	48
4.2.1.2	Pneumokokkenkultur und -stimulation .....	48
4.2.2	<i>BEAS-2B-Kultur und -Stimulation</i> .....	49
4.2.3	<i>HEK293-Zellkultur und -Stimulation</i> .....	50
4.2.4	<i>CHO-3E10-Kultur und -Stimulation</i> .....	50
4.2.5	<i>Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i> .....	51
4.2.5.1	Prinzip .....	51
4.2.5.2	RNA-Isolierung und Reverse-Transkription-Reaktion .....	51
4.2.5.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	52
4.2.5.4	Elektrophorese .....	53
4.2.6	<i>ELISA</i> .....	53
4.2.6.1	GM-CSF-ELISA.....	53
4.2.6.2	IL-8-ELISA.....	54
4.2.7	<i>Bio-Plex™ Cytokine Assay</i> .....	54
4.2.8	<i>HEK293-Überexpressions-Experimente</i> .....	55
4.2.8.1	Plasmid-DNA-Transformation und -Isolierung.....	55
4.2.8.2	HEK293-Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitationsmethode .....	56
4.2.8.3	Luciferase- und $\beta$ -Galaktosidase-Bestimmung.....	56
4.2.8.4	HEK293-Transfektion mittels SuperFect® .....	57
4.2.9	<i>FACS- Analyse</i> .....	57
4.2.10	<i>Pneumolysin-Polymyxin-Test</i> .....	58
4.2.11	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)</i> .....	58
4.2.11.1	Prinzip des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) .....	58
4.2.11.2	Gewinnung der nukleären Proteine.....	59
4.2.11.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	59
4.2.11.4	Hybridisierung der Oligonukleotide .....	59
4.2.11.5	Electrophoretic Mobility Shift Assay .....	60
4.2.12	<i>Statistik</i> .....	60
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>61</b>
5.1	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT DIE GM-CSF-EXPRESSION IN MÄUSELUNGEN.....	61
5.2	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT DIE EXPRESSION VON GM-CSF IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	62
5.3	PNEUMOLYSIN INDUZIERT DIE EXPRESSION VON GM-CSF IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	63
5.4	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE ZEITABHÄNGIG IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	65
5.5	DIE PNEUMOKOKKENINDUZIERTE GM-CSF-EXPRESSION WIRD ÜBER TLR-2, DIE PNEUMOLYSININDUZIERTE GM-CSF-EXPRESSION ÜBER TLR-4 VERMITTELT.....	66
5.6	DIE BEDEUTUNG DES KANONISCHEN NF-KB-WEGES.....	73

5.7	DIE INHIBITION DER P38-MAP-KINASE BLOCKIERT DIE <i>S. PNEUMONIAE</i> -INDUZIERTE GM-CSF-EXPRESSION IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN.....	74
5.8	<i>S. PNEUMONIAE</i> AKTIVIERT DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR AP-1 IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN.....	75
5.9	DIE DURCH <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERTE IL-8-EXPRESSION IST AP-1-ABHÄNGIG.....	76
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>79</b>
6.1	<i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT DIE SEKRETION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE.....	79
6.2	DIE ROLLE DER <i>TOLL-LIKE</i> REZEPTOREN IN DER ERKENNUNG VON <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	84
6.3	DURCH <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERTE SIGNALTRANSDUKTIONSKASKADEN.....	89
6.3.1	<i>Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Expression ist NF-κB-abhängig.....</i>	89
6.3.2	<i>Die p38-MAPK ist involviert in die S. pneumoniae-induzierte GM-CSF-Expression.....</i>	91
6.3.3	<i>S. pneumoniae aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1.....</i>	93
6.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	95
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>120</b>
9.1	DANKSAGUNG.....	120
9.2	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	121
9.3	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	122
9.4	LEBENS LAUF.....	123

# 1 Verzeichnisse

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

### Kapitel 2: Einleitung

Abbildung 2-1:	Schematische Darstellung der <i>Toll</i> -IL-1R Superfamilie	20
Abbildung 2-2:	TLRs und ihre Liganden	23
Abbildung 2-3:	Der <i>Toll-like</i> Rezeptor (TLR)-Signalweg	28
Abbildung 2-4:	Die Bausteine der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Signaltransduktionswege	30

### Kapitel 5: Ergebnisse

Abbildung 5-1:	Die Zunahme der GM-CSF-Expression in Mäuselungen nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion	62
Abbildung 5-2:	Die Induktion von GM-CSF in BEAS-2B-Zellen durch <i>S. pneumoniae</i>	63
Abbildung 5-3:	Die Induktion von GM-CSF in BEAS-2B-Zellen durch Pneumolysin	64
Abbildung 5-4:	<i>S. pneumoniae</i> induziert die Freisetzung verschiedener Zytokine in humanen Bronchialepithelzellen	66
Abbildung 5-5:	Die dosisabhängige Induktion der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität durch <i>S. pneumoniae</i>	67
Abbildung 5-6:	Die dosisabhängige Induktion der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität durch Pneumolysin ist <i>h</i> TLR4-abhängig	70
Abbildung 5-7:	Pneumolysin stimuliert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über <i>h</i> TLR-4-Rezeptoren	72
Abbildung 5-8:	Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Freisetzung in bronchialen Epithelzellen ist IKK-abhängig	73
Abbildung 5-9:	Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Expression wird durch p38 MAPK-inhibition blockiert	75
Abbildung 5-10:	Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch <i>S. pneumoniae</i> in BEAS-2B-Zellen	76
Abbildung 5-11:	Die Induktion der IL-8-Freisetzung durch <i>S. pneumoniae</i> ist AP-1-abhängig	77

## 1.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatureinheit Grad Celsius
μ	Mikro
a. bidest	doppelt destilliertes Wasser
a. tridest	dreifach destilliertes Wasser
AP-1	Aktivator Protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	„adult respiratory distress syndrom“ Atemnotsyndrom des Erwachsenen
ASK	„apoptosis signal-regulating kinase“ Apoptose Signal-regulierende Kinase
ATF	„activating transcription faktor“, aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BEAS-2B	humane Bronchial-Epithelzelllinie
bzw.	beziehungsweise
CAP	„community acquired pneumonia“, ambulant erworbene Pneumonie
Cbp	„choline-binding-protein“, Cholin-bindendes Protein
CD	„cluster of differentiation“, Differenzierungsfaktor
CHO	„Chinese hamster ovary cells“ Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
COX	Cyclooxygenase
cfu	colony forming units; Kolonie bildende Einheiten
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	Dulbeccos modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleotide
ds	„double-stranded“, doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	„Ethyldiamintetraacid“; Ethyldiamintetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“, Elektrophorese-Essay
engl.	englisch
ERK	„extracellular regulated-signal kinase“, extrazellulär regulierte Kinase
FACS	„fluorescence-activated cell sorter“, Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	„fetal calve serum“; fötales Kälberserum
g/g	Erdbeschleunigung/Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierender Faktor
h/h	human/Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEK	„human embryonal kidney cell“ humane embryonale Nierenzelllinie
IκB	„inhibitor of κB“; Inhibitor von κB
IKK	„inhibitor of κB“-Kinase
IKK-NBD	IKK-„Nemo binding Domain“, IKK-„Nemo-bindende Domäne“
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK	„IL-1R-associated kinase“, IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
JDP	„Jun-dimerising partners“, Jun-dimerisierende Partner
JNK	„c-Jun NH <sub>2</sub> terminal kinase“; c-Jun NH <sub>2</sub> -terminale Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani, Bakterienmedium
LBP	„lipopolysaccharide-binding protein“, LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
m	milli
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MAPKAP	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase



MHC	„major histocompatibility complex“
min	Minute
MKP	MAP Kinase Phosphatase
mol	$6 \times 10^{23}$ Moleküle
mRNA	„messenger RNA“
MSK	„mitogen and stress-activated kinase“; Mitogen- und Stress-aktivierte Kinase
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“, myeloider Differenzierungsfaktor 88
n	Nano
NCTC	„National Collection of Type Cultures“
NEMO	„NF- $\kappa$ B essential modifier“, wesentlicher NF- $\kappa$ B-Regulator
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B“, Nukleärer Faktor $\kappa$ B
Nod	„nucleotide-binding oligomerization domain protein“, Nukleotidbindende Oligomerisations-Domänen-Protein
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“, Pathogen-assoziierte molekulare Muster
p	Piko
PBS	„phosphate-buffered saline“, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerase-Kettenreaktion
PGN	Peptidoglykan
ply	Pneumolysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRAK	p38-regulierte/aktivierte Kinase
PRR	„pattern-recognition receptor“, mustererkennender Rezeptor
PspA	„pneumococcal surface protein A“ Pneumokokken-Oberflächeprotein A
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RLT	PCR-Lysepuffer
RLU	„relative light units“; Relative Lichteinheiten
RNA	„Ribonucleinacid“; Ribonukleinsäure
RSV	„Respiratory Syncytial Virus“
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. pneumoniae</i> ; <i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

SDS	Natriumdodecylsulfat
SFM	„Serum Free Medium“; Serum freies Medium
TAB	„TAK1-binding protein“; TAK1-bindendes Protein
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK-1	„transforming growth factor $\beta$ activated kinase 1“; TGF $\beta$ -aktivierte Kinase
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylethyldiamin
TGE	Tris-Base/Glycin/EDTA
TGF-1 $\beta$	„transforming growth factor-1 $\beta$ “
TIR	<i>Toll</i> -/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF $\alpha$	„tumor necrosis factor alpha“, Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAF	„tumor necrosis factor receptor-associated factor“ Tumornekrosefaktor-Rezeptorassoziierter Faktor
TRE	TPA-responsives Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
VCAM-1	„vascular cell adhesion molecule-1“, Vasculäres Zelladhäsionsmolekül-1

## 2 Einleitung

Die ambulant erworbene Pneumonie ist die weltweit am häufigsten registrierte Infektionskrankheit (Huntemann und Lorenz, 2004). In 25-45 % der Fälle konnte *S. pneumoniae* als auslösender Erreger isoliert werden. Die Erforschung der Interaktion zwischen diesem Bakterium und dem Wirtsorganismus, kann, in Anbetracht zunehmender Erregerresistenzen und unvollkommener Vakzinierungsstrategien, eine Grundlage für die Entwicklung rationaler, innovativer Therapieprinzipien liefern. Wesentliche Fortschritte wurden dabei durch die Entdeckung der Erregererkennung durch Rezeptoren der angeborenen Immunität, der *Toll-like* Rezeptoren, erreicht. Auch die Bestimmung der Funktion bakterieller Virulenzfaktoren brachte wichtige Erkenntnisse. Trotzdem bestehen noch immer erhebliche Wissenslücken hinsichtlich der Wirt-Erreger-Interaktion, die es zu schließen gilt. So ist die Rolle des bronchialen Epithels in der Abwehr eindringender Pneumokokken noch nicht eindeutig definiert. Auch gilt es, die Keim-Rezeptor-Interaktionen und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, welche unter anderem zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine führen, genauer zu untersuchen. Dadurch könnten beispielsweise pathophysiologische Mechanismen, welche zur massiven Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten bei der Pneumokokkenpneumonie führen, erklärbar werden.

### 2.1 *Streptococcus pneumoniae*

#### 2.1.1 Allgemeines

*S. pneumoniae* wurde erstmals 1881 von Georg Miller Sternberg und Louis Pasteur unabhängig voneinander isoliert (Hahn *et al.*, 1999). Das Spektrum der pneumokokkenverursachten Erkrankungen reicht von leichteren Affektionen, wie der Otitis media und der Sinusitis über die bakterielle Pneumonie, die eitrige Meningitis und die Endokarditis bis zur lebensbedrohlichen Septikämie (Hausdorff *et al.*, 2005). Dieser Erreger verursacht dabei mehr Tote durch invasive Infektionen als jedes andere Bakterium und ist weltweit an 5. Stelle der Todesursachenstatistik (International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, 2002).

### 2.1.2 Der Erreger und seine Virulenzfaktoren

Pneumokokken bilden eine auf Blutagarplatten  $\alpha$ -hämolyisierende Spezies innerhalb der Gattung *Streptococcus* (Buttery und Moxon, 2002). Bis heute werden anhand verschiedener Kapselantigene 90 Serotypen unterschieden (Henrichsen *et al.*, 1995). Die 1  $\mu$ M großen, gram-positiven, fakultativ anaeroben Bakterien liegen meist als lanzettförmige oder in Ketten aneinander gereihete Diplokokken vor (Kardioglu *et al.*, 2004). Dieser Erreger wird selten von Mensch zu Mensch durch Tröpfcheninfektion übertragen, vielmehr handelt es sich meist um eine endogene Infektion auf dem Boden einer nasopharyngealen Besiedelung. Anhand epidemiologischer Studien wurden verschiedene Mechanismen der Interaktion zwischen Mensch und *S. pneumoniae* definiert (Casal *et al.*, 2003). Zunächst sind alle Serotypen in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, den Nasopharynx zu kolonialisieren und dort zu persistieren, ohne zu einer Erkrankung zu führen (Andersson *et al.*, 1981). Ca. 5-10 % der gesunden Erwachsenen weisen eine Besiedelung der oberen Luftwege mit Pneumokokken auf (Buttery und Moxon, 2002). Rund 20 von 90 Pneumokokkenserotypen können in andere Körperregionen migrieren. Schließlich können die Keime zur Ausbildung verschiedenster Erkrankungen führen, welche durch die Interaktion der Virulenzfaktoren mit Mechanismen der angeborenen sowie der erworbenen Immunität charakterisiert ist.

Pneumokokken enthalten eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die für die Adhärenz des Erregers, die Kolonialisierung, die Invasion, und letztendlich die Inflammation verantwortlich sind. Einer der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren ist dabei die in allen klinischen Isolaten anzutreffende Polysaccharidkapsel. Sie verhindert durch Maskierung gebundener Komplementkomponenten (C3b) die Opsonierung und Phagozytose durch die Wirtszelle (Buttery und Moxon, 2002). Die Zellwandkomponenten Peptidoglykan, Teichon- und Lipoteichonsäure sind als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) immunologisch bedeutende Bestandteile der Pneumokokken (Schröder *et al.*, 2003). Darüber hinaus sind Oberflächenproteine, wie „choline-binding-protein“ (Cbp) oder „pneumococcal surface protein A“ (PspA),  $H_2O_2$ , Enzyme, wie Neuraminidase, Metalloproteinase und Hyaluronidase sowie Toxine, wie Pneumolysin, Autolysin oder Hämolysin an der

Pathogenese der Erreger beteiligt (Hammerschmidt *et al.*, 2006, Jedrzejas *et al.*, 2001).

Bei dem Pathogenitätsfaktor Pneumolysin (Ply) handelt es sich um ein 53 kDa großes, aus vier Domänen bestehendes Protein (Rossjohn *et al.*, 1998), welches zytosolisch vorliegt und insbesondere während der Autolyse der Bakterien freigesetzt wird (Rubins *et al.*, 1998, Paterson und Mitchell, 2006). Es gehört zu einer Gruppe von bakteriellen thiol-aktivierten Zytolysinen und wird von klinisch isolierten Pneumokokken produziert (Rossjohn *et al.*, 1999, Zysk *et al.*, 2001). Die Bedeutung von Pneumolysin für die Pathogenität von *S. pneumoniae* wurde deutlich, als gezeigt werden konnte, dass pneumolysinnegative Pneumokokkenstämme im Tierversuch weniger virulent sind (Berry *et al.*, 1989) und die Immunisierung von Mäusen mit einer defekten Variante des Toxins Schutz gegen virulente Erreger bietet (Paton *et al.*, 1991).

Pneumolysin beeinflusst direkt die Funktion der Epithel- und Endothelzellen der Lunge. So hemmt es die ziliäre Aktivität der Bronchialepithelzellen (Zysk *et al.*, 2001) und führt durch das Aufbrechen der interzellulären Verbindungen („tight-junctions“) an alveolaren Epithelzellen (Rubins *et al.*, 1993) sowie pulmonalen Endothelzellen (Rubins *et al.*, 1992) zur Zerstörung der Zellenbarrieren. Auch an der Blut-Hirn-Schranke greifen während einer zerebralen Infektion mit Pneumokokken diese Mechanismen, die zur Invasion der Keime und zur Entwicklung eines Hirnödems beitragen (Zysk *et al.*, 2001). Die Zytotoxizität von Pneumolysin ist wahrscheinlich auf die Fähigkeit zurückzuführen, Cholesterin zu binden und durch die Formierung eines transmembranösen Porenkomplexes die Zytolyse eukaryontischer Zellen zu vermitteln (Gilbert *et al.*, 1999, Rossjohn *et al.*, 1998). Braun *et al.* fanden Hinweise darauf, dass die Formierung solcher Porenkomplexe an mitochondrialen Membranen zu einer Potentialänderung dieser Membranen und somit zur Freisetzung apoptoseinduzierender Faktoren führt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei Pneumolysin zusätzlich um ein mitochondriales Toxin handelt (Braun *et al.*, 2007). Außerdem ist dieses Protein in der Lage, mit dem humanen Immunsystem zu interagieren, indem es die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6, induziert (Houldsworth *et al.*, 1994, Rubins und Janoff, 1998).

### 2.1.3 Die Pneumokokkenpneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (AEP) bezeichnet jede Lungenentzündung eines immunkompetenten Patienten, die im privaten oder beruflichen Umfeld erworben wurde. Außerdem fallen auch solche Pneumonien unter diese Definition, die innerhalb der ersten 2 Tage eines Krankenhausaufenthaltes erstmals diagnostiziert wurden (Huntemann und Lorenz, 2004). Die AEP ist die weltweit am häufigsten diagnostizierte Infektionskrankheit. Ihre Inzidenz in der Gesamtbevölkerung wird auf 1-11/1000 Einwohner geschätzt, die Inzidenz unter Altenheimbewohnern liegt mit geschätzten 68-114/1000 Personen noch darüber. Bei 30 % der Patienten ist im Krankheitsverlauf eine Hospitalisierung nötig, davon bedürfen 10 % intensivmedizinischer Behandlung. Die Gesamtletalität der AEP beträgt 2-10 %, der bakteriämischen Pneumokokkenpneumonie auch heute noch ca. 20 % (Huntemann und Lorenz, 2004).

90 % der ambulant erworbenen Pneumonien werden durch bakterielle Infektionen hervorgerufen. *S. pneumoniae* stellt mit 25-45 % den weltweit am häufigsten isolierten Erreger dar. Dieser Keim verursacht das charakteristische Krankheitsbild der Pneumokokkenpneumonie. Weitere häufige AEP-Erreger sind *Haemophilus influenzae* (10-20 %), *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella spp.* Seltener handelt es sich um *Chlamydia psittaci*-, *Staphylococcus aureus* - oder *Pseudomonas aeruginosa*-ausgelöste Pneumonien. Neben Viren, wie Influenza A und B, können auch Parasiten und physikalische Noxen eine AEP auslösen (Huntemann und Lorenz, 2004).

Eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung einer invasiven Pneumokokkenpneumonie ist das Vordringen des Erregers aus dem besiedelten Nasopharynx in anatomisch tiefer gelegene Regionen des Respirationstraktes, beispielsweise durch Aspiration. Unter bestimmten Bedingungen können diese vorgedrungenen Keime nicht mehr durch natürliche Mechanismen, wie Mukusproduktion, Epithelbarriere oder Zilienbewegung, abgewehrt werden. Für die Pneumokokkenpneumonie prädisponierende Faktoren sind die chronisch obstruktive Lungenerkrankung, aspirationsdisponierende Erkrankungen, Nikotinabusus, allergische Lungenerkrankungen, Immunsuppression, HIV-Infektion, Alkoholismus, Asplenie, chronische Herz- oder Niereninsuffizienz und Diabetes mellitus. Besonders gefährdet sind

außerdem Kleinkinder und betagte Menschen (>65 Jahre) (Huntemann und Lorenz, 2004, Zimmermann *et al.*, 2005).

Die Pneumokokkenpneumonie verläuft meist als Lobärpneumonie in charakteristischen Stadien (Hahn *et al.*, 1999). Sie ist dabei v. a. durch eine massive Leukozyteninfiltration gekennzeichnet (Wang *et al.*, 2001). Wichtig für diese Leukozyteninvasion ist die Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine durch das Lungenepithel und Zellen der angeborenen Immunität, wie der Alveolarmakrophagen (Strieter *et al.*, 2003). Klinisch imponiert die Pneumokokkenpneumonie, nach einer Inkubationszeit von 1-3 Tagen, durch Schüttelfrost, Fieber, schweres Krankheitsgefühl, Husten, Dyspnoe und evtl. Thoraxschmerz durch eine mögliche Begleitpleuritis, sowie reichlich rostbraunes Sputum ab dem 2. Tag. Besonders bei älteren Patienten kann die Klinik durch oligosymptomatische Verläufe und extrapulmonale Symptome, wie Somnolenz und Konfusion verschleiert werden. Auch kommt es bei diesen Patienten neben längerer Krankheitsdauer häufiger zu Komplikationen, wie einer Sepsis, dem Empyem oder einer Meningitis (Zimmermann *et al.*, 2005). Diagnostiziert wird diese Form der Pneumonie anhand der klinischen Untersuchung, sowie durch eine Röntgenthoraxaufnahme, die dichte, relativ scharf begrenzte, großflächige Infiltrate erkennen lässt (Huntemann und Lorenz, 2004). Durch die laborchemische Diagnostik lassen sich eine Leukozytose oder eine Leukopenie nachweisen, außerdem eine Linksverschiebung mit toxischer Granulation und eine CRP (C-reaktives Protein)-Erhöhung. Der Erregernachweis kann aus Sputum, Pleurapunktat, Bronchialsekret, bronchoalveolärer Lavage (BAL) sowie experimentell durch einen Antigentest aus Urin versucht werden (Huntemann und Lorenz, 2004). Durch zunehmende Resistenzen von *S. pneumoniae* müssen die Therapiestrategien immer wieder neu überprüft werden. Dabei lässt sich eine starke Heterogenität in der Verteilung der Resistenzen nachweisen. So sind Pneumokokken in Deutschland nur zu <3 % resistent gegen Penicillin, während in Spanien und Osteuropa ca. 50 % der Keime Penicillinresistenzen aufweisen. Häufig treten auch kombinierte Resistenzen gegen ambulant vielfach eingesetzte Antibiotika, wie Makrolide, Tetrazykline und Cotrimoxazol auf (Huntemann und Lorenz, 2004). Daher erfolgt besonders bei stationär aufgenommenen Patienten die Therapie mit Antibiotika für 7-10 Tage gemäß Antibiogramm. Entsprechend der Leitlinien für die ambulant erworbene Pneumonie besteht die Empfehlung für Patienten ohne weitere Risikofaktoren in der Gabe von  $\beta$ -Lactamantibiotika (z. B. Amoxicillin), Makroliden (z.

B. Azithromycin, Clarithromycin, Roxithromycin) oder Tetracyclinen (Doxycyclin) (Höffken *et al.*, 2005).

In Anbetracht der zentralen Rolle von *S. pneumoniae* v. a. in der Pathogenese der AEP wurde ein polyvalenter Polysaccharidimpfstoff gegen 23 der 90 Pneumokokkenserotypen entwickelt, welche für bis zu 90 % der Erkrankungen verantwortlich sind (Zimmermann *et al.*, 2005). Empfohlen wird die Impfung für Personen mit erhöhter Gefährdung, wie beispielsweise Kinder und Personen ab dem 65. Lebensjahr, Patienten mit schwerwiegender pulmonaler oder kardialer Grunderkrankung sowie immunsupprimierte und splenektomierte Patienten (Huntemann und Lorenz, 2004). Bedauerlicherweise ist die Effizienz der Impfung wegen der hohen Serotypvariabilität und Genomveränderbarkeit der Erreger besonders bei sehr jungen, betagten und immundefizienten Patienten noch immer limitiert. Die Problematik der zunehmenden Resistenzen und der limitierten Effizienz der Schutzimpfung bei gleichzeitig hoher medizinischer Relevanz von *S. pneumoniae* macht es erforderlich, die in die Pathogenese der Pneumokokkenerkrankung involvierten pathophysiologischen Mechanismen, besonders die Interaktion zwischen Wirtsorganismus und Erreger, genauer zu erforschen.

## **2.2 Das Immunsystem**

### **2.2.1 Allgemeines**

Die Entzündungsreaktion ist ein wichtiger Schlüsselprozess im Abwehrsystem des Organismus gegen Infektionen durch verschiedene Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten. Sie wird hochgradig reguliert, um ihre Aktion in Ort und Zeit dort zu limitieren, wo sie gebraucht wird. Geht diese Kontrolle verloren, können eine Reihe von Erkrankungen, wie der septische Schock oder die Rheumatoide Arthritis, entstehen. Obwohl die inflammatorischen Antworten bei verschiedenen Erkrankungen unterschiedlich gestaltet sein können, sind sie jedoch durch ein gemeinsames Spektrum von Genen und endogenen Mediatoren, inklusive Wachstumsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6) und Chemokinen (z. B. Makrophagen-inflammatorischer Faktor  $\alpha$  und  $\beta$ , IL-8)



charakterisiert. Bei höheren Vertebraten unterscheidet man die angeborene Immunität („innate immunity“) von der erworbenen Immunität („adaptive Immunity“). Die angeborene Immunität verkörpert eine phylogenetisch alte, nicht-spezifische Antwort auf eine Infektion. Sie ist in fast allen multizellulären Organismen zu finden und stützt sich zunächst auf einen Satz keimbahnkodierter Rezeptoren, die Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) erkennen, sowie auf eine Vielzahl von Zellen, insbesondere Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Epithelzellen (Medzhitov und Janeway, 2000a). Die nur in Vertebraten vorkommende erworbene Immunität repräsentiert dagegen eine sich langsamer entwickelnde, aber langlebige und außerordentlich spezifische Immunantwort. Sie ist phylogenetisch jünger als die angeborene Immunität und gewährleistet die Wiedererkennung von Pathogenen bei einer erneuten Infektion. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Erkennung von Antigenen durch spezifische, somatisch generierte Antigenrezeptoren, die klonal auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten exprimiert werden. Um auf eine große Anzahl von potentiellen Pathogenen antworten zu können, haben B- und T-Lymphozyten die Fähigkeit zur Neuordnung („rearrangement“) ihrer Immunglobulin-gene bzw. ihrer T-Zellrezeptorengene mit der Entwicklung von über  $10^{11}$  verschiedenen Antigenrezeptorarten (Janeway *et al.*, 1999, Medzhitov und Janeway, 2000a).

Beide Systeme stehen in komplexer Interaktion, wobei dem angeborenen Immunsystem die Aufgabe zukommt, die Infektion so lange zu kontrollieren, bis die erworbene Immunität aktiviert ist und adäquat antworten kann. Diese Aktivierung wird durch die angeborene Immunität entscheidend beeinflusst (Medzhitov und Janeway, 2000a).

### **2.2.2 Die angeborene Immunantwort**

Das Oberflächenepithel der Haut und Schleimhaut stellt eine erste mechanische Barriere gegen eindringende Krankheitserreger dar. Dazu führt es durch die Freisetzung antimikrobieller Peptide, wie humanem  $\beta$ -Defensin (HBD1-4), zur Membranzerstörung vieler mikrobieller Pathogene (Ganz *et al.*, 2003, Oppenheim *et al.*, 2003). Einen weiteren Abwehrmechanismus der angeborenen Immunität bilden Phagozyten, wie Makrophagen und polymorphkernige neutrophile Granulozyten. In Anwesenheit invasiver bakterieller Infektionen migrieren sie zum Infektionsort,

erkennen und phagozytieren den Mikroorganismus (Ingestion), um ihn dann abzutöten und zu verdauen (Digestion) (Tosi *et al.*, 2005). Von Immunzellen und Zellen des infizierten Gewebes freigesetzte Zytokine und Chemokine greifen regulatorisch in die Immunantwort ein, indem sie beispielsweise die Migration der Leukozyten induzieren (Rossi *et al.*, 2000). Zusätzlich vermitteln Peptide des Komplementsystems eine antikörperunabhängige Opsonierung, Phagozytenmigration sowie mikrobielle Lyse (Tosi *et al.*, 2005, Aderem und Underhill, 1999). Diese Reaktionen können bereits ausreichen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Andernfalls steuern die Immunzellen durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren die weitere angeborene und erworbene Immunantwort.

Die Rezeptoren der angeborenen Immunität, sogenannte mustererkennende Rezeptoren („pattern-recognition receptors“, PRRs), dienen der Erkennung einer Vielzahl von mikrobiellen molekularen Mustern. Eine Gruppe von Rezeptoren, die beim Menschen die Rolle der PRRs übernehmen, sind die *Toll-like* Rezeptoren.

### **2.2.3 Pathogen-assoziierte Molekulare Muster (PAMPs)**

Ein wichtiger Mechanismus der angeborenen Immunität besteht darin, eine große Anzahl potentieller Pathogene mit einer begrenzten Rezeptorzahl zu unterscheiden, ohne dabei jedes mögliche Antigen spezifisch zu erkennen. Außerdem muss sie an die hohe Mutationsfähigkeit der Keime angepasst sein. Es entwickelten sich keimbahnkodierte mustererkennende Rezeptoren (PRR), die bestimmte evolutionär hoch konservierte Strukturen der Pathogene erkennen, welche in höheren eukaryontischen Zellen nicht zu finden sind. Diese Strukturen, genannt Pathogen-assoziierte molekulare Muster, sind essentielle Produkte der mikrobiellen Physiologie und deshalb weitgehend unveränderlich (Medzhitov und Janeway, 2000a). Sie werden von allen Mikroorganismen produziert und sind spezifisch für eine bestimmte Erregerklasse, was es dem Immunsystem erlaubt, nicht nur das Vorliegen einer Infektion zu erkennen, sondern auch wichtige Informationen über die Art des eindringenden Erregers zu ermitteln (Aderem *et al.*, 2001, Medzhitov und Janeway, 2000a). Beispiele für PAMPs sind diverse bakterielle Zellwandkomponenten, wie LPS (Lipopolysaccharid), welches einen wesentlichen Bestandteil gram-negativer Bakterien darstellt, sowie Lipopeptide, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, die

neben einer großen Anzahl weiterer biologisch aktiver Moleküle in gram-positiven Bakterien zu finden sind (Aderem und Underhill, 1999, Aderem *et al.*, 2001).

#### **2.2.4 Mustererkennende Rezeptoren**

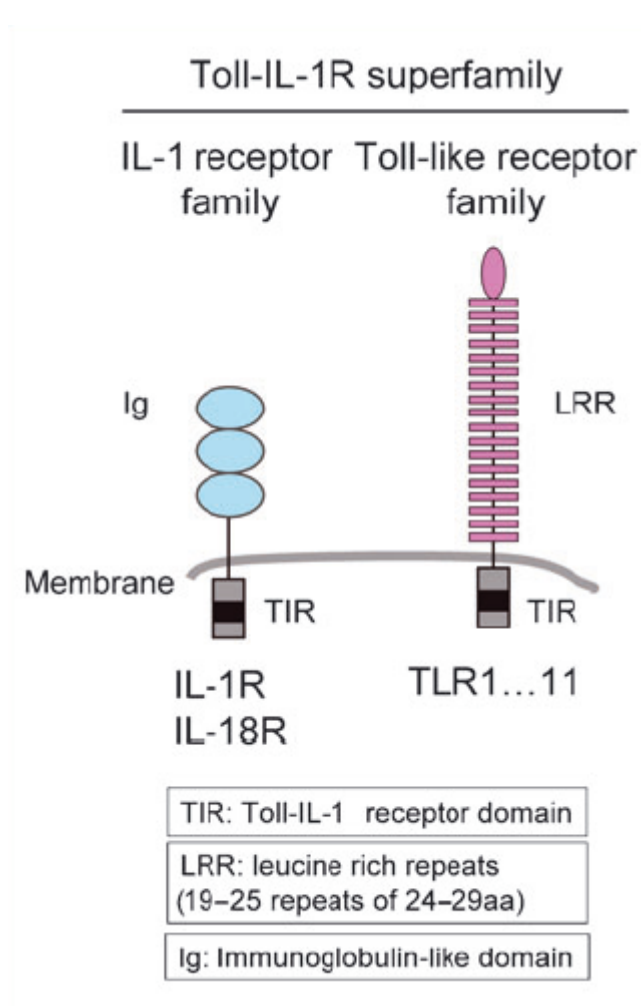
Die mustererkennenden Rezeptoren der angeborenen Immunität (PRR) können funktionell u. a. unterteilt werden in sezernierte und endozytierende Rezeptoren, welche Phagozytose vermitteln, und signaltransferierende Rezeptoren, die im wesentlichen proinflammatorische Signalwege aktivieren (Medzhitov und Janeway, 2000b, Aderem und Underhill, 1999).

Sezernierte PRRs, wie Mannan-bindendes Protein, wirken als Opsonine, indem sie an pathogene Strukturen binden und sie dadurch für die weitere Erkennung durch das Komplementsystem und Phagozyten markieren (Epstein *et al.*, 1996, Fraser *et al.*, 1998). Endozytierende PRRs, z. B. der Mannose-Rezeptor, werden auf der Oberfläche von Phagozyten exprimiert. Aus der Erkennung bestimmter mikrobieller PAMPs resultiert die Endozytose des PAMP-Rezeptorkomplexes und die Zerstörung des Pathogens in den Lysosomen. Pathogeneigene Proteine werden nun prozessiert und durch MHC (engl.: major histocompatibility-complex)-Moleküle auf der Makrophagenoberfläche präsentiert. Darüber hinaus werden verschiedene Mediatoren der Immunantwort, wie Zytokine, freigesetzt (Medzhitov und Janeway, 2000a). Die dritte Gruppe stellen die signaltransferierenden PRRs, wie die *Toll-like* Rezeptoren, dar. Sie werden auf der Oberfläche von Gewebemakrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie Endothel- und Epithelzellen exprimiert und verfügen über die Fähigkeit, nach der Erkennung von Pathogenen Signaltransduktionskaskaden zu aktivieren, um die Information zum Kern zu übertragen und dort durch Expression verschiedener Gene eine Immunantwort zu induzieren (Medzhitov und Janeway, 2000a).

#### **2.2.5 *Toll-like* Rezeptoren (TLRs)**

Erstmalig wurde *Toll* in *Drosophila melanogaster* (*dToll*) als ein für die dorsoventrale Polarisierung der Ontogenese entscheidendes Gen identifiziert (Anderson *et al.*, 1985a; Anderson *et al.*, 1985b, Hashimoto *et al.*, 1988). Die zytoplasmatische

Domäne von *dToll* zeigt Sequenzhomologien mit entsprechenden Anteilen der humanen IL-1-Rezeptorfamilie, weshalb diese Domäne auch TIR-Domäne (engl.: Toll/IL-1 receptor domain) genannt wird (Gay und Keith, 1991). Die extrazellulären Domänen der beiden Rezeptorfamilien unterscheiden sich dagegen grundlegend: im Gegensatz zu einer immunglobulinverwandten Domäne der IL-1-Rezeptorfamilie enthält der extrazelluläre Teil von *dToll* Leucin-reiche Strukturen („leucin-rich repeats“, LRR) (siehe Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der *Toll*-IL-1R Superfamilie**

Der IL-1 Rezeptor (IL-1R) und *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) aktivieren einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg durch die Rekrutierung von Adaptermolekülen an ihre homologe zytoplasmatische Domäne genannt TIR (Toll/IL-1 Rezeptordomäne). Im Gegensatz zu einer immunglobulinverwandten Domäne der IL-1-Rezeptorfamilie enthält der extrazelluläre Teil von *Toll* Leucin-reiche Strukturen („leucin-rich repeats“, LRR), welche für die Erkennung Pathogen-assoziiierter Muster verantwortlich sind (Albiger *et al.*, 2007a).

Beiden Rezeptorfamilien gemeinsam ist die Induktion von Signaltransduktionskaskaden mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Nukleären Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Familie (Belvin und Anderson, 1996). Durch *dToll* induzierte Proteine, wie das antifungale Peptid (Toll) und das antibakterielle Peptid (18-wheeler) wird die angeborene Immunantwort von *Drosophila* dahingehend reguliert, dass auch in Abwesenheit einer erworbenen Immunität zwischen Pilzen und Bakterien unterschieden werden kann und so eine angemessene antimikrobielle Antwort ermöglicht wird (Lemaitre *et al.*, 1996, Williams *et al.*, 1997).

Das erste humane *Toll*-Homolog wurde von Medzhitov *et al.* 1997 entdeckt und später als *Toll-like* Rezeptor (TLR)-4 identifiziert. Die Arbeitsgruppe konnte die Bedeutung der humanen *Toll-like* Rezeptoren (*hToll*) für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort nachweisen, indem gezeigt werden konnte, dass konstitutiv aktive TLR-4-Mutanten NF- $\kappa$ B-abhängige Gene für verschiedene inflammatorische Zytokine, wie IL-8, und kostimulierende Moleküle induzieren können. Im Anschluss wurden weitere, zu *dToll* und der IL-1-Rezeptorfamilie homologe, humane *Toll-like* Rezeptoren identifiziert (Rock *et al.*, 1998). Der Versuch, spezifische Liganden zu den entsprechenden *Toll-like* Rezeptoren zuzuordnen, stellt ein zentrales Forschungsziel einer Reihe von Arbeitsgruppen dar. Bedeutend sind dabei TLR-Überexpressionsstudien. So haben Kirschning *et al.* und Yang *et al.* unabhängig voneinander 1998 zunächst den *hTLR-2* als den für die LPS-Erkennung entscheidenden Rezeptor gehalten. Dem widersprachen Experimente, die den genetischen Defekt zweier LPS-hyporesponsiver Mäusestämme (C3H/HeJ und C57BL10/ScCr) auf eine TLR-4-Mutation zurückführten (Poltorak *et al.*, 1998, Qureshi *et al.*, 1999, Hoshino *et al.*, 1999). Daraufhin wurde TLR-4 als wesentlicher physiologischer LPS-Rezeptor postuliert (Heine *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 1999, Arbour *et al.*, 2000, Tapping *et al.*, 2000). Darüber hinaus haben verschiedene Studien gezeigt, dass für die LPS-Erkennung neben dem transmembranösen TLR-4 auch andere Signalmoleküle benötigt werden: LPS-bindendes Protein (LBP), cluster of differentiation 14 (CD14) und MD-2. Bei dem im Serum nachzuweisenden LBP handelt es sich um ein akute-Phase-Protein, welches als Opsonin LPS erkennt und bindet (Schumann *et al.*, 1990). CD14 ist ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Molekül ohne intrazelluläre und transmembranöse Domäne, welches den LPS-LBP-Komplex erkennt (Wright *et al.*, 1990, Ulevitch *et al.*, 1995) und daraufhin mit TLR-4 interagiert (Jiang *et al.*, 2000). Auch das sezernierte Molekül

MD-2 besitzt keine transmembranöse Domäne, es bindet an den extrazellulären Teil von TLR-4 (Shimazu *et al.*, 1999).

Der humane *Toll-like* Rezeptor-2 erkennt in Interaktion mit TLR-1 und TLR-6 eine große Anzahl biologisch aktiver Moleküle gram-positiver Bakterien, wie Peptidoglykan, Lipoprotein und Lipoteichonsäure sowie Mykobakterien und Hefen (Brightbill *et al.*, 1999, Underhill *et al.*, 1999a, Yoshimura *et al.*, 1999, Ozinsky *et al.*, 2000, Takeuchi *et al.*, 2000). So reagieren TLR-2-defiziente Mäuse und TLR-2-negative CHO-Zellen auf LPS, aber nicht auf gram-positive bakterielle Zellwandkomponenten (Takeuchi *et al.*, 1999, Lien *et al.*, 1999). Die Fähigkeit von TLR-4 und TLR-2, zwischen Pathogenen zu unterscheiden, ähnelt der Selektivität, die für die Drosophilaproteine Toll und 18-wheeler beobachtet wurde. Seither wurden 10 Mitglieder der TLR-Familie (TLR1-TLR10) im Menschen identifiziert. Jeweilige exemplarische Liganden sind der Abbildung 2-2 zu entnehmen. Humane *Toll-like* Rezeptoren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression. Während TLR-1, -2, und -4 auf der Zelloberfläche exprimiert werden, finden sich TLR-3, -7, -8, und -9 in intrazellulären Kompartimenten, wie den Endosomen (Takeda und Akira, 2005). *Toll-like* Rezeptoren werden in Zellen der angeborenen (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen) und erworbenen Immunität (maturierte dendritische Zellen) (Janeway und Medzhitov, 2002) sowie in Endothel- und Epithelzellen in unterschiedlichen Mustern exprimiert (Takeda *et al.*, 2003).

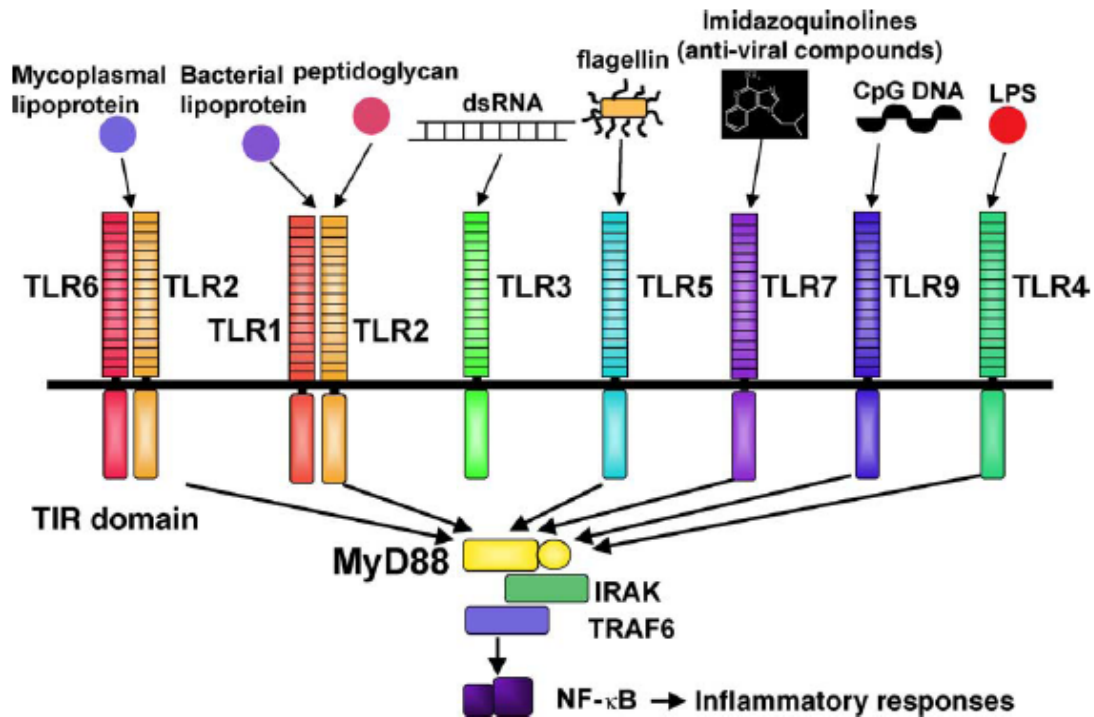


Abbildung 2-2: TLRs und ihre Liganden

TLR-2 ist essentiell in der Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden und Peptidoglykan. TLR-1 und TLR-6 kooperieren mit TLR2, um subtilere Unterschiede zwischen Triazetylierten (TLR-6)- und Diazetylierten (TLR-1) Lipopeptiden erkennen zu können.

TLR-4 ist der LPS-Rezeptor. TLR-9 ist wichtig für die Erkennung von CpG DNA. TLR-3 spielt bei der Erkennung viraler dsRNA eine Rolle, während TLR-7 und TLR-8 virale ssRNA erkennen. TLR-5 erkennt Flagellin. MyD88 lagert sich an die TIR-Domäne der *Toll-like* Rezeptoren an und vermittelt so die Signaltransduktion zur Induktion einer Immunantwort (Yamamoto *et al.*, 2004).

## 2.2.6 Die Erkennung von Pneumokokken

Der humane *Toll-like* Rezeptor-2 ist beteiligt an einer suffizienten Immunreaktion gegen Pneumokokken. Echchannaoui *et al.* konnten eine reduzierte Abwehr gegen Pneumokokken während einer bakteriellen Meningitis in TLR-2-defizienten Mäusen nachweisen (Echchannaoui *et al.*, 2002). Schröder *et al.* wiesen die Erkennung von Lipoteichonsäuren der Pneumokokkenzellwand durch TLR-2 nach. Interessanterweise wird ein wichtiger Virulenzfaktor dieser gram-positiven Bakterien, Pneumolysin, scheinbar auch TLR-4-abhängig erkannt (Malley *et al.*, 2003). Für *Toll-like* Rezeptoren ist gezeigt worden, dass sie durch Heterodimerisation eine größere Anzahl pathogener Strukturen (PAMPs) erkennen können (Ozinsky *et al.*, 2000, Takeda und Akira, 2005). So bilden TLR-1 und TLR-6 Heterodimere mit TLR-2 und

unterscheiden zwischen di- und triazetylierten Lipopeptiden (Takeuchi *et al.*, 2001, Takeuchi *et al.*, 2002). Dies trifft auch auf die Erkennung von *S. pneumoniae* zu. Dieser Keim induziert die Expression von TLR-1 und TLR-2 in infizierten Mauslungen sowie in humanen Bronchialepithelzellen *in vitro*. Außerdem wird die NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription synergistisch durch TLR-1/TLR-2-Dimere, aber nicht TLR-2/TLR-6-Dimere aktiviert (Schmeck *et al.*, 2005).

Die Bedeutung eines weiteren *Toll-like* Rezeptors, des TLR-9, für die Pneumokokkenerkennung wurde durch Albiger *et al.* nachgewiesen. TLR-9 induziert eine inflammatorische Antwort durch die Erkennung von unmethylierten CpG (Cytosinphosphat-Guanosin)-Dinukleotiden, welche v. a. in prokaryontischer DNA vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TLR-9-defiziente Alveolarmakrophagen, als auch TLR-9-defiziente Mäuse empfindlicher auf die Applikation von *S. pneumoniae* reagierten und eine deutliche Beeinträchtigung in der Erkennung, Aufnahme und Abtötung des Erregers aufzeigten. Die untersuchten Mäuse und Zelllinien exprimierten dabei TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6, sodass der Effekt auf die TLR-9-Defizienz zurückgeführt werden konnte (Albiger *et al.*, 2007b).

Vor kurzem ist für die Erkennung von *S. pneumoniae* eine weitere Rezeptorgruppe der angeborenen Immunität identifiziert worden. Dabei handelt es sich um zytosolische Nod-Proteine (engl.: nucleotide-binding oligomerization domain proteins), die an der Erkennung intrazellulär vorhandener Pneumokokken beteiligt sind. Die *S. pneumoniae*-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in HEK293-Zellen erwies sich als Nod2-abhängig. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Nod1- und Nod2-mRNA-Expression sowohl in C57BL/6-Mäuselungen als auch in Bronchialepithelzellen infolge einer Stimulation mit Pneumokokken hochreguliert wird (Opitz *et al.*, 2004).

## **2.2.7 Zytokine und Chemokine**

Zytokine sind eine heterogene Gruppe löslicher kleiner Polypeptid- oder Glykoproteinmediatoren, die, eingebunden in ein komplexes Netzwerk, an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Dazu gehören Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren. Die meisten Zellen des Immunsystems und viele andere Zelltypen setzen Zytokine frei und antworten auf Zytokine über spezifische



Zytokinrezeptoren. Zu den wichtigsten Zytokinen zählen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ . Beide beeinflussen die Immunantwort, den Metabolismus und die Hämatopoese. Dosisabhängig verursachen sie u. a. Fieber, Blutdruckabfall, Neutrophilie oder Leukopenie. Im Fall eines Endotoxinschocks während einer durch gram-negative Bakterien verursachten Sepsis, werden sie von mononukleären Phagozyten freigesetzt. Sie selbst können wiederum die Produktion anderer inflammatorischer Mediatoren aktivieren. Sie induzieren u. a. die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Leukozyten, stimulieren die Leukozytenmigration, aktivieren die neutrophilen Granulozyten zur Phagozytose, Degranulation, und oxidativem Burst (Oppenheim *et al.*, 2001, Beutler *et al.*, 1989).

Diese nützlichen Antworten auf eine Infektion können sich bei verstärkter und fehlregulierter Zytokinaktivierung zu verminderter myokardialer Kontraktilität, erhöhter Kapillarpermeabilität, Koagulopathie und Multiorganversagen steigern (Cohen *et al.*, 2002).

Neben Zytokinen sind auch Chemokine an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Es handelt sich dabei um eine Gruppe spezialisierter zytokinähnlicher Polypeptide, die von infiziertem Gewebe freigesetzt werden und eine gerichtete Zellmigration von Entzündungszellen induzieren (Rossi *et al.*, 2000). Das stark chemotaktisch wirkende Chemokin IL-8/CXCL8 ist ein Schlüsselmediator in der neutrophilenvermittelten Inflammation in der Lunge (Strieter *et al.*, 2002). Seine Freisetzung wird durch Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , bakterielle Komponenten wie Lipopolysaccharide, virale Produkte sowie Zellstress induziert (Remick *et al.*, 2005).

### **2.2.8 Granulozyten-Makrophagen-Colony stimulierender Faktor (GM-CSF)**

Der Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor gehört mit IL-3 und IL-5 zur kurzkettigen 4- $\alpha$ -helikalen Untergruppe der hämatopoetischen Zytokine. Diesen drei Signalmolekülen gemeinsam ist ein heterodimerer Rezeptor, dessen  $\alpha$ -Untereinheit zytokinspezifisch agiert, während sich die für die Signaltransduktion verantwortliche  $\beta$ -Untereinheit („common  $\beta$ “,  $\beta$ c) aller Rezeptoren gleicht. Der GM-CSF-Rezeptor wird auf CD34+ Vorläuferzellen und allen myeloiden Zellen exprimiert. GM-CSF wird u. a. von aktivierten T-Lymphozyten, Eosinophilen, Mastzellen, Basophilen, Makrophagen, Endothelzellen und Knochenmarksstromazellen sezerniert. Stimuliert wird die Sekretion durch proinflammatorische Zytokine, wie IL-

1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , sowie mikrobielle Bestandteile, wie Lipopolysaccharid (LPS) (Shearer *et al.*, 2003).

GM-CSF wurde initial durch seine Fähigkeit definiert, sowohl Granulozyten- als auch Makrophagen-Kolonien aus Vorläuferzellen zu generieren (Burgess *et al.*, 1980). Heute wird rekombinantes humanes GM-CSF klinisch u. a. zur Reduktion chemotherapiebedingter Myelosuppression bei Tumorpatienten und zur Stammzellmobilisation in der Tumorthherapie eingesetzt (Armitage *et al.*, 1998). Chung und Barnes konnten 1999 belegen, dass der Wachstumsfaktor neben seiner hämatopoetischen Regulatorfunktion auch durch direkte Aktivierung von Leukozyten am Infektionsort selbst an der Immunantwort beteiligt ist, indem er beispielsweise die Funktion reifer Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und dendritischer Zellen potenziert. Stanley *et al.* konnten 1994 die Bedeutung von GM-CSF für die Regulation der Immunantwort nachweisen, indem sie zeigten, dass Mäuse mit defekten Genen für den  $\beta$ c-Rezeptor oder GM-CSF selbst eine annähernd normale Anzahl hämatopoetischer Stammzellen und Vorläuferzellen besitzen, aber nicht zur akzelerierten Produktion von Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten fähig sind, wenn sie mit infektiösen Stimuli in Kontakt kommen (Stanley *et al.*, 1994, Robb *et al.*, 1995).

## **2.3 Die intrazelluläre Signaltransduktion**

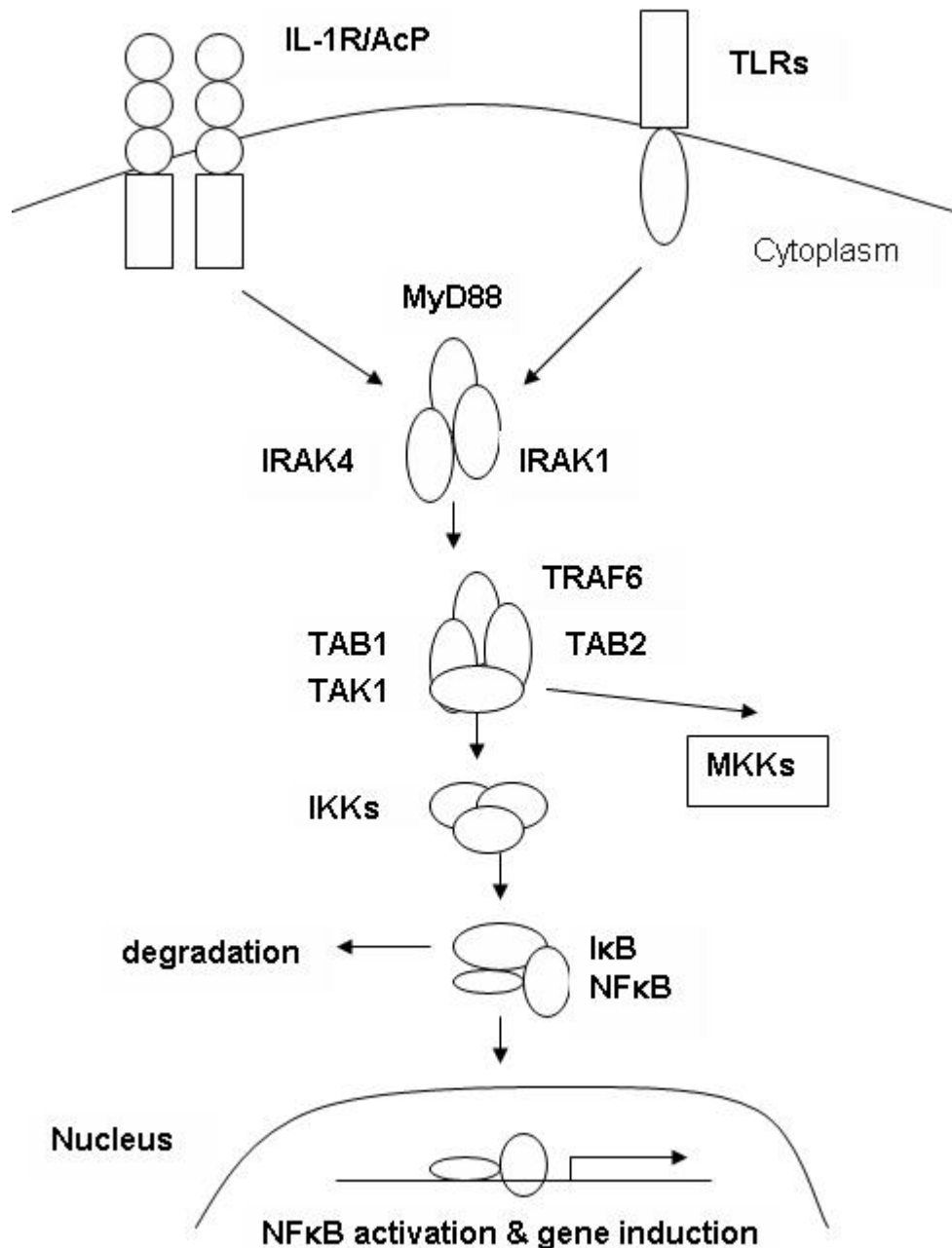
### **2.3.1 Der Toll-like Rezeptor (TLR)-Signalweg**

Signaltransduktionskaskaden in der Zelle dienen der Übermittlung von Signalen von der Zellmembran bis in den Zellkern. Ein Beispiel für eine solche Kaskade ist der TLR-Signaltransduktionsweg. Dieser wurde zuerst am Beispiel von TLR-4 untersucht. Er stellt sich bei den anderen TLR-vermittelten Transduktionswegen ähnlich, aber nicht identisch dar.

Die extrazellulär gelegene Leucin-reiche Domäne (engl.: „leucine-rich-repeat“, LRR) der TLRs dient der Erkennung der von außen auf die Zelle einwirkenden Signale. Die Bindung eines passenden Liganden (z. B. PAMPs) an diese extrazelluläre Domäne führt zur Rekrutierung des TLR-Adapterproteins MyD88 (engl.: „myeloid differentiation factor 88“) (Medzhitov *et al.*, 1998). Durch homophile Interaktion der

intrazellulären TIR (Toll-/IL-1-Rezeptor)-Domäne von TLR-4 mit der C-terminalen TIR-Domäne von MyD88 kommt es zur Assoziation dieser Signaltransduktionsproteine. Durch diese Interaktion verbindet sich nun die N-terminale Death-Domäne von MyD88 mit einer homologen Domäne der Proteinkinase IRAK-4 (IL-1R-assoziierte Kinase-4) (Wesche *et al.*, 1997, Takeda und Akira, 2005). Im Folgenden kommt es zur IRAK-4-vermittelten Phosphorylierung von IRAK-1, welches sich wiederum mit einem weiteren Adaptorprotein, TRAF6 (engl.: "tumor necrosis factor receptor-associated factor 6"), verbindet (Cao *et al.*, 1996, Takeda und Akira, 2005, Yamamoto *et al.*, 2004). Daraufhin kommt es zur Aktivierung des Adaptormoleküls TAB (engl.: „TAK1-binding protein“), welches wiederum die TAK-1 (engl.: transforming growth factor  $\beta$  activating kinase“-1) aktiviert. Die TAK-1 ist ein Mitglied der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-3-Kinasefamilie (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999). An dieser Stelle teilt sich der Signalweg: die TAK-1 aktiviert sowohl die I $\kappa$ B-Kinase (IKK), über die der kanonische NF- $\kappa$ B-Weg aktiviert wird, als auch die MAPK-Kaskade (siehe Abbildung 2-3).

Die TLR-abhängige Aktivierung der Zytokinproduktion spielt eine wichtige Rolle in der Rekrutierung anderer Komponenten der angeborenen Abwehr gegen bakterielle Pathogene. Allerdings ist mit einer exzessiven Zytokinproduktion auch die Sepsis und andere Formen des SIRS (systemic inflammatory response syndrome) verbunden, weshalb dieser Signalweg nützlich, aber auch potentiell gefährlich für den Organismus sein kann (Cohen *et al.*, 2002).



**Abbildung 2-3: Der *Toll-like* Rezeptor (TLR)-Signalweg**

Die Leucin-reiche Domäne (LRR) der *Toll-like* Rezeptoren erkennt auf die Zelle einwirkende Signale. Die Bindung eines Liganden an diese extrazelluläre Domäne führt zur Rekrutierung des TLR-Adapterproteins MyD88. Durch homophile Interaktion der intrazellulären TIR (Toll-/IL-1-Rezeptor)-Domäne mit der C-terminalen TIR-Domäne von MyD88 kommt es zur Assoziation dieser Signaltransduktionsproteine. Dadurch verbindet sich die N-terminale Death-Domäne von MyD88 mit einer homologen Domäne der Proteinkinase IRAK-4. Es folgt die IRAK-4-vermittelte Phosphorylierung von IRAK-1, welches sich wiederum mit TRAF6 verbindet. Daraufhin kommt es zur Aktivierung des Adaptormoleküls TAB, welches wiederum die TAK-1 aktiviert. An dieser Stelle teilt sich der Signalweg: die TAK-1 aktiviert sowohl die IκB-Kinase (IKK), über die der kanonische NF-κB-Weg aktiviert wird, als auch die MAPK-Kaskade (Akira und Sato, 2003).

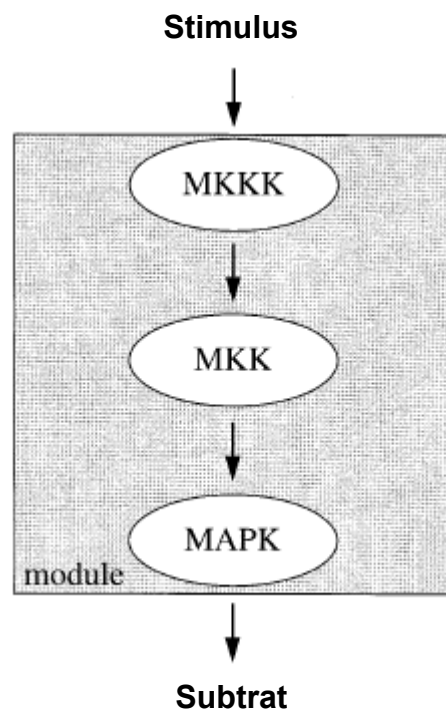
### 2.3.2 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen, die fundamentale biologische Prozesse, wie Zellwachstum und Differenzierung, aber auch Entzündung und Apoptose, kontrollieren. Sie kommen in allen untersuchten eukaryontischen Zellen vor. Man unterscheidet drei große Untergruppen von MAPK beim Menschen. Dazu gehört zunächst die p38-MAPK mit ihren bislang 4 isolierten Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ . Darüber hinaus werden u. a. die "c-jun amino-terminal kinase" (JNK) mit den Isoformen 1, 2 und 3 sowie die "extracellular signal regulated-kinase"1 (ERK1)- und ERK2 dazugerechnet (Kyriakis *et al.*, 2001).

MAPK werden durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF, Zytokine wie IL-3, IL-5 und TNF $\alpha$  aktiviert. Darüber hinaus führen auch Hormone, Neurotransmitter, osmotischer Schock und ionisierende Strahlung zu einer MAPK-Aktivierung (Widmann *et al.*, 1999, Shearer *et al.*, 2003). Die Übertragung dieser Signale bis in den Kern wird über komplizierte Kinasenkaskaden vermittelt, in welchen hintereinandergeschaltete Proteinkinasen in einer Kaskade phosphoryliert werden. Die erste Kinase ist die MKKK, welche u. a. durch GTP-bindende Proteine der Ras- und Rho-Familie aktiviert wird. Es handelt sich dabei um eine Serin/Threoninkinase, welche im aktivierten Zustand die nächste Kinase innerhalb der Kaskade phosphorylieren und aktivieren kann: die MKK. Diese erkennt und phosphoryliert das Thr-X-Tyr-Motiv in der Aktivierungsdomäne der MAPK. Bis heute sind 14 MKKK, 7 MKK und 12 MAPK identifiziert worden (siehe Abbildung 2-4, Widmann *et al.*, 1999).

Die MAPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, welche Prolin an bestimmten Positionen ihrer Substrate erkennen und diese daraufhin an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren (Kyriakis *et al.*, 2001). Zu ihren Substraten zählen stromabwärts gelegene Kinasen, wie die MSK1 und MSK2 (engl.: „mitogen and stress-activated kinases“) und die MK2 und MK3 (engl.: "MAPK-activated proteinkinasen"). Außerdem werden z. B. Phospholipasen, Transkriptionsfaktoren und Proteine des Zytoskeletts phosphoryliert (Widmann *et al.*, 1999), woraus eine koordinierte Aktivierung von Gentranskription, Proteinsynthese, Zellzyklusablauf, Zelldifferenzierung und Zelltod resultiert. Zwischen den MAP-Kinasenkaskaden besteht eine enge Vernetzung durch wechselseitigen Signalfloss und sich überlappende

Substratspezifitäten. Diese Interaktion dient der Integration der dem Signal entsprechenden Antwort und der Aktivierung getrennter Gegensätze (Kaminska *et al.*, 2005).



**Abbildung 2-4: Die Bausteine der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Signaltransduktionswege**

Verschiedene Stimuli induzieren die Mitogen-aktivierte Proteinkinasen-Kaskade. Der Signalweg besteht aus 3 Kinasen [MAPK kinase kinase (MKKK), MAPK kinase (MKK) und MAPK], welche sequentiell durch Phosphorylierung aktiviert werden. Aktivierte MAPK können dann ihre Substrate (z. B. stromabwärts gelegene Kinasen, Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine) an den Aminosäuren Serin und Threonin phosphorylieren (Widmann *et al.*, 1999).

Die Inaktivierung und damit Feinregulation der MAPK-Aktivität erfolgt durch MAPK-Phosphatasen, z. B. die MAP Kinasen Phosphatase (MKP). Diese entfernen die Phosphatgruppen an den Aktivierungsdomänen, was zur Unterbrechung der Signalkaskade führt (Farooq und Zhou, 2004). Die erhöhte Aktivität der MAPK, besonders der p38-MAPK, und ihre Beteiligung an der Regulation der Synthese inflammatorischer Mediatoren auf Transkriptions- und Translationsebene machen sie

zu einem potentiellen Ziel für die antiinflammatorische Therapie. p38- und JNK-Inhibitoren wurden entwickelt, und präklinische Daten legen nahe, dass diese Inhibitoren antiinflammatorische Aktivität besitzen (Kaminska *et al.*, 2005).

### 2.3.2.1 p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Die p38-MAPK zählt zu den archetypischen Mitgliedern der MAPK. Bis heute wurden vier p38 MAPK-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) identifiziert; sie sind ca. 60% homolog. Während die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten ubiquitär exprimiert werden (Jiang *et al.*, 1996), ist bei einer Anreicherung der  $\gamma$ -Untereinheit im Skelettmuskel und der  $\delta$ -Untereinheit in Lunge, Niere, Hoden, Pankreas und Dünndarm von einer zellspezifischen Expression auszugehen (Kaminska *et al.*, 2005).

Zu den extrazellulären Stimuli der p38-MAPK zählen verschiedene Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ , TNF $\alpha$  sowie Pathogen-assoziierte molekulare Muster, wie LPS und Staphylokokkenpeptidoglykan. Außerdem ruft UV-Strahlung, osmotischer Stress und Hitze eine p38-MAPK-Aktivierung hervor (Kaminska *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2001). Die meisten Stimuli, welche zu einer p38-MAPK-Phosphorylierung führen, aktivieren gleichfalls die JNK. Die Aktivierung der p38-MAPK erfolgt durch 2-fache Phosphorylierung an Thr180 und Tyr182 durch übergeordnete MAPK-Kinasen (Kaminska *et al.*, 2005). Dabei werden alle vier p38-Isoformen durch die MKKK TAK-1 und ASK1 (engl.: apoptosis signal-regulating kinase), sowie MKK3 und MKK6 aktiviert, die Isoformen p38 $\alpha$  und  $\beta$  können zusätzlich durch Teile der JNK-Kaskade MKKK1 und MKK4 phosphoryliert werden (Raingeaud *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 2001).

Es konnte gezeigt werden, dass die p38 $\alpha$ -Isoform eine zentrale Rolle im Ablauf inflammatorischer Prozesse spielt (Hale *et al.*, 1999) und gleich wie die Isoform p38 $\beta$  aktivierend auf Transkriptionsfaktoren wirkt, wohingegen die Isoformen  $\delta$  und  $\gamma$  einen inhibierenden oder neutralen Effekt ausüben (Pramanik *et al.*, 2003). Dabei können aber zellspezifische Unterschiede bestehen. Zu den Substraten der p38-MAPK zählen Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B und AP-1. Einige Transkriptionsfaktoren sind dabei ein direktes Ziel der p38-MAPK, andere werden durch stromabwärts gelegene Proteinkinasen phosphoryliert, welche selbst durch die

p38-MAPK aktiviert werden, wie die MAPK-aktivierte Proteinkinase (MAPKAP kinase)-2 und MAPKAP-3 oder die p38-regulierte/aktivierte Kinase (PRAK). Die p38-MAPK spielt eine zentrale Rolle in der Produktion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8. Außerdem ist sie beteiligt an der Enzyminduktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 (Chen *et al.*, 2001). Für verschiedene entzündliche Erkrankungen, wie die Rheumatoide Arthritis und inflammatorische Darmerkrankungen konnte ein regulierender Einfluss der p38-MAPK-Signalkaskade nachgewiesen werden (Kaminska *et al.*, 2005, Sweeney und Firestein, 2004, Hollenbach *et al.*, 2004).

Pyridinyl-Imidazol-Komponenten-enthaltende Inhibitoren wurden ursprünglich als Hemmstoffe der inflammatorischen Zytokinsynthese entwickelt (Badger *et al.*, 1996, Griswold *et al.*, 1996). Dann wurde die p38 MAPK-Isoform  $\alpha$  als das den Inhibitor spezifisch bindende Molekül identifiziert, was der Isoform den zusätzlichen Namen CSBP (engl.: cytokine suppressive antiinflammatory drug binding proteins) einbrachte. Dies machte die spezifischen antiinflammatorischen Inhibitoren für die selektive Untersuchung der p38-MAPK besonders wertvoll. Das Prinzip der Inhibition besteht in der kompetitiven Bindung des Inhibitors an die Adenosintriphosphat(ATP)-Bindungsstelle der p38-MAPK. Dadurch kommt es nicht zur Unterbindung der Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAP-Kinase selbst, sondern zur Inhibition ihrer katalytischen Aktivität durch Blockade der Übertragung von Phosphat auf stromabwärts gelegene abhängige Ziele (Tong *et al.*, 1997). Die Inhibitoren zeigen eine hohe Affinität zu den MAPK-Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ , wohingegen die Isoformen  $\gamma$  und  $\delta$  unbeeinflusst bleiben (Chen *et al.*, 2001, Goedert *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurden die Inhibitoren SB202190 und SB203580 verwendet, sowie die inaktive Kontrollkomponente SB202474, welche nicht in der Lage ist, die ATP-Bindedomäne des Enzyms zu besetzen.

### **2.3.3 Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B (NF- $\kappa$ B)**

NF- $\kappa$ B ist ein eukaryontischer Transkriptionsfaktor, der in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird. Er wurde erstmals 1986 als der nukleäre Faktor identifiziert, der für die Transkription der Immunglobulinleichtketten in B-Lymphozyten erforderlich ist (Sen und Baltimore, 1986). Unter dem Oberbegriff NF- $\kappa$ B werden verschiedene



Dimere aus Mitgliedern der DNA-bindenden Rel-Proteinfamilie zusammengefasst. Die NF- $\kappa$ B/Rel-familie beinhaltet RelB, c-Rel, RelA (p65), NF- $\kappa$ B2 (p52 und sein Präkursor p100) und NF- $\kappa$ B1 (p50 mit seinem Präkursor p105) (Ghosh *et al.*, 1998). Die meisten Familienmitglieder können sowohl Homodimere als auch Heterodimere bilden. Die am weitesten verbreitete Form von NF- $\kappa$ B ist ein p50/p65-Heterodimer, für welches eine Beteiligung an der Aktivierung inflammatorischer Gene durch IL-1 $\beta$  oder TNF $\alpha$  in humanen Monozyten gezeigt werden konnte (Hayden und Ghosh, 2004). Jedes der Rel-Proteine enthält eine N-terminale, aus 300 Aminosäuren bestehende, hoch konservierte Rel-Homologie-Domäne („rel homology domain“, RHD). Diese ist verantwortlich für DNA-Bindung, Dimerisation und Interaktion mit dem I $\kappa$ B-Protein, außerdem ist in ihr auch die Kernlokalisationssequenz enthalten (Ghosh *et al.*, 1998). Die verschiedenen Dimere unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht. Sie weisen unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu bestimmten DNA-Bindungsstellen auf und besitzen, wie „Knockout“-studien gezeigt haben, auch unterschiedliche Funktion. Außerdem wirken sie verschieden auf die Transkription: RelA, RelB und c-Rel haben scheinbar aktivierende Eigenschaften, p50- und p52-Homodimere eher hemmende Wirkung (Ghosh *et al.*, 1998). Die vielfältigen Variationen in Bezug auf DNA-Bindung, Funktion und Transkriptionsverhalten erlauben es der Zelle, auf externe Stimuli zur richtigen Zeit mit der korrekten Genaktivierung zu antworten. Zu diesen NF- $\kappa$ B-aktivierenden Stimuli zählen mikrobielle Bestandteile (PAMPs), Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, IFN $\gamma$ , sowie proapoptotische Stimuli, wie UV-Licht und freie Sauerstoffradikale (Ghosh *et al.*, 1998).

NF- $\kappa$ B ist einer der wichtigsten Regulatoren der proinflammatorischen Genexpression. Seit seiner Entdeckung sind verschiedene Bindungsstellen in den Promotoren und Enhancerregionen vieler Gene nachgewiesen worden, wie von Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) zur Aktivierung von Immunzellen, akute Phase Proteinen (Angiotensinogen, C3-Komplementfaktor) für die Inflammation, Zelladhäsionsmolekülen (VCAM-1, ELAM-1, ICAM-1) für die Leukozytenadhäsion und -transmigration, sowie Rel- und I $\kappa$ B-Proteine (I $\kappa$ B $\alpha$ , p105, c-Rel) zur Regulation der NF- $\kappa$ B-Antwort (Tak *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 1995, Karin und Ben Neriah, 2000).

Die Aktivität von NF- $\kappa$ B wird durch seinen Inhibitor I $\kappa$ B (inhibitors of  $\kappa$ B) reguliert, an welchen NF- $\kappa$ B in inaktiver Form im Zytoplasma gebunden ist. Die I $\kappa$ B-Proteine

können in die Isoformen I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\gamma$  und I $\kappa$ B $\epsilon$  unterteilt werden (Hayden und Ghosh, 2004). Allen I $\kappa$ B-Isoformen ist eine ankyrinreiche Domäne gemeinsam, welche an die Rel-Homologie-Domäne bindet, die die NF- $\kappa$ B-Kernlokalisationssequenz maskiert (Ghosh *et al.*, 1998), und dadurch NF- $\kappa$ B im Zytosol zurückhält. Dabei ist die I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung mit transienter NF- $\kappa$ B-Aktivierung verbunden, wohingegen die I $\kappa$ B $\beta$ -Degradierung mit anhaltender Aktivierung einhergeht (Thompson *et al.*, 1995). Jede I $\kappa$ B-Isoform enthält eine unterschiedliche Anzahl von Ankyrinwiederholungen, was zur Spezifität beiträgt, mit welchem Rel-Dimer die entsprechende I $\kappa$ B-Isoform interagiert (Thompson *et al.*, 1995).

Die Phosphorylierung von I $\kappa$ B stellt einen wichtigen Schritt in der NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar und wird durch I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) vermittelt. Der I $\kappa$ B-Kinasekomplex besteht aus mindestens 3 Untereinheiten, wobei IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  mit einer Kinasefunktion ausgestattet sind, während IKK $\gamma$ /NEMO (engl.: NF- $\kappa$ B essential modifier) eine regulatorische Untereinheit darstellt. Die Phosphorylierung durch I $\kappa$ B-Kinasen und die anschließende Degradation des I $\kappa$ B-Proteins führt zur Freilegung der Kernlokalisationssequenz von NF- $\kappa$ B (Karin und Ben Neriah, 2000). Dieses kann jetzt in den Kern translozieren und dort durch die Bindung der Rel-Homologie-Domänen an Promoter- und Enhancer-Regionen  $\kappa$ B-Stellen-tragender DNA-Abschnitte (Ghosh *et al.*, 1998) die Transkription spezifischer Gene induzieren.

Die IKK kann als Antwort auf proinflammatorische Stimuli durch stromaufwärts gelegene Kinasen, wie die MAP-Kinasen, aktiviert werden. Neue Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung von IKK $\beta$ , eher als von IKK $\alpha$ , an der NF- $\kappa$ B-Induktion durch proinflammatorische Stimuli, wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ , beteiligt ist. IKK $\alpha$  wird für die Kontrolle der Zelldifferenzierung benötigt, besonders in der Epidermis (Delhase *et al.*, 1999).

Das Regulatorprotein IKK $\gamma$ /NEMO wird für die proinflammatorische Aktivierung des IKK-Komplexes benötigt. Es interagiert mit IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  über die Bindungsstelle NEMO-bindende Domäne (NBD). Unter der Annahme, dass die Inhibition der NEMO-IKK-Interaktion zu einer Unterbindung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt, wurde ein zellpermeables Peptid (IKK-„NEMO binding Domain“, IKK-NBD) entwickelt, welches an die regulatorische IKK-Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO bindet. Dadurch wird die Assoziation von NEMO mit dem IKK-Komplex blockiert und die zytokininduzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression inhibiert, ohne die basale NF- $\kappa$ B-Aktivität zu verändern

(May *et al.*, 2000). Die Entwicklung eines solchen inhibitorischen Peptids könnte einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Kontrolle überschießender Entzündungsreaktionen, wie des ARDS (engl.: acute respiratory distress syndrome), darstellen (Ankermann *et al.*, 2005).

#### **2.3.4 Der Transkriptionsfaktor Aktivator-Protein-1 (AP-1)**

Die AP-1-Transkriptionsfaktorfamilie besteht aus Homodimeren und Heterodimeren der DNA-bindenden Proteine der Jun- (c-Jun, JunB, JunD) und der Fos-Familie (c-Fos, FosB, Fra-1 und Fra-2). Zusätzlich ist die Bildung von Heterodimeren mit Mitgliedern der ATF (engl.: activating transcription faktor)-Proteinfamilie (B-ATF, ATF-2, ATF-3) oder der JDP (Jun-dimerising partners)-Proteinfamilie (JDP-1 und JDP-2) möglich (Hess *et al.*, 2004). Jedes dieser Proteine wird unterschiedlich exprimiert und reguliert, was bedeutet, dass jeder Zelltyp eine komplexe Mischung aus AP-1-Dimeren besitzt, die unterschiedlich Funktionen ausüben (Wagner *et al.*, 2001). AP-1 vermittelt die Genregulation in Abhängigkeit einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Stimuli wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Stresssignalen, bakteriellen (LPS und Peptidoglykan) und viralen Infektionen sowie onkogenen Stimuli (Hess *et al.*, 2004, Mackman *et al.*, 1991, Gupta *et al.*, 1999). Der Transkriptionsfaktor spielt eine zentrale Rolle in der Regulation von Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Transformation, abhängig von der Stimulusart, der Zusammensetzung der Dimere, dem Zelltyp und der Zellumgebung. Ferner induziert AP-1 die Expression proinflammatorischer Zytokine und spielt dadurch eine bedeutende Rolle in der Immunantwort (Hess *et al.*, 2004).

Ein gemeinsames Merkmal aller AP-1-Proteine ist eine evolutionär konservierte bZIP-Domäne mit  $\alpha$ -helikaler Struktur. Im N-terminalen Abschnitt dieser bZip-Domäne befindet sich die DNA-Bindungsdomäne für die Interaktion mit der palindromischen AP-1-Bindungsstelle. Diese ist in der Enhancerregion zahlreicher Zielgene lokalisiert und enthält die Konsensussequenz 5'-TGACGTCA-3', welche auch „12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)-response element (TRE)“ genannt wird (Olive *et al.*, 1997). Im C-terminalen Anteil der bZip-Domäne befindet sich eine Leucin-reiche amphipatische Region, genannt „leucin-zipper“-Region, welche für die Dimerisation verantwortlich ist. Im Aufbau der „leucin-zipper“-Region bestehen

Unterschiede, welches die Spezifität und die Stabilität der Homo- und Heterodimere beeinflusst (Wagner *et al.*, 2001). Darüber hinaus besitzen die AP-1-Proteine eine transaktivierende Domäne und Bindungsstellen für Kinasen wie JNK und ERK (Hess *et al.*, 2004).

Die AP-1-Proteine unterscheiden sich in ihren Dimerisationseigenschaften. Jun-Proteine bilden Homo- und Heterodimere, auch können sie mit Mitgliedern der ATF-Proteinfamilie heterodimerisieren. Fos-Proteine können keine Homodimere bilden, sie bilden stabile Heterodimere mit Jun-Proteinen und können dadurch ihre DNA-Bindungsaktivität erhöhen (Hess *et al.*, 2004). Außerdem ist die aktivierende Wirkung auf die Transkription innerhalb der AP-1-Proteine unterschiedlich. So haben c-Jun, c-Fos, FosB starke aktivierende Wirkung auf die Transkription, wohingegen JunB, JunD, Fra-1 und Fra-2 die Transkription nur schwach aktivieren. Letzte können sich unter bestimmten Umständen sogar repressiv auf die AP-1-Aktivität auswirken, indem sie mit c-Jun, c-Fos und FosB „inaktive“ Heterodimere bilden, welche mit „aktiven“ Dimeren um die AP1-Bindungsstelle an der DNA konkurrieren (Hess *et al.*, 2004).

Das dominant-negative Fos-Protein A (acidic extension)-Fos inhibiert die sequenz-spezifische DNA-Bindung von AP-1 in äquimolarer Konkurrenz (Olive *et al.*, 1997). Strukturell ist das Protein gekennzeichnet durch eine saure amphipathische Proteinsequenz, welche an das N-terminale Ende des Fos-„leucin-zippers“ angehängt wurde. Diese Proteinsequenz und die DNA-bindende Region von Jun-Proteinen interagieren physikalisch derart miteinander, dass ein Heterodimer mit gerollter Spiralenform entsteht. Dadurch wird der Komplex von Fos-Jun, vermittelt über die bZip-Regionen, ca. 3000fach stabilisiert und so die Bindung der DNA-bindenden Region von Jun an die DNA verhindert (Olive *et al.*, 1997). Gelshiftanalysen haben gezeigt, dass A-Fos die DNA-Bindung des Fos-Jun-Heterodimers in äquimolarer Konzentrationen um ca. 80 % reduziert (Olive *et al.*, 1997).

### 3 Fragestellung

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die Pathogenese der Pneumokokkeninfektion auf der Ebene der Interaktion des Erregers mit der pulmonalen Epithelzelle untersucht werden.

Folgende Fragen wurden dabei adressiert:

1. Kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine durch das bronchiale Epithel nach Infektion mit *S. pneumoniae* bzw. nach Stimulation mit dem Virulenzfaktor Pneumolysin?
2. Welche Rezeptoren sind in die Erkennung der Pneumokokken bzw. von Pneumolysin durch das Immunsystem beteiligt?
3. Welche intrazellulären Signaltransduktionswege und Transkriptionsfaktoren sind in der Zellaktivierung durch *S. pneumoniae* von Bedeutung?

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen.

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Analyse-„Kits“ werden hier nicht extra gelistet. Die Bezugsquellen sind den entsprechenden Abschnitten in dem Kapitel Methoden zu entnehmen.

#### 4.1.1 Materialien für das Arbeiten mit Bakterien

##### 4.1.1.1 Medien für die Bakterienkultur

<u>Medien für die Bakterienkultur</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
<b><i>S. pneumoniae</i>-Anzuchtbouillon</b>		
Todd Hewitt Broth	15,00 g	BD Mikrobiologie
Hefeextrakt	2,50 g	Sigma
a. bidest.	500 ml	
<b><i>S. pneumoniae</i>-Kryomedium</b>		
Anzuchtbouillon <i>S. pneumoniae</i>	80 %	
Glycerol 99 %ig	20 %	Sigma
<b>Luria Bertani-Medium (<i>E. coli</i>)</b>		
Trypton enzymatisch hydrolysiert aus Casein	10,00 g	Fluka
Hefeextrakt	5,00 g	Sigma
Natriumchlorid	5,00 g	Roth

a. bidest. 1000,00 ml

**Luria Bertani-Kryomedium (*E. coli*)**

Luria Bertani-Medium (Vorkultur) 400,00 µl

Glycerol 99 %ig 500,00 µl Sigma

**Luria Bertani-Selektionsagarplatten (*E. coli*)**

Agar 7,50 g Beckton

Dickinson

Ampicillin 50,00 µg Sigma

Luria Bertani-Medium 500,00 ml

\*Nach Fertigstellung der Medien wurden diese für 10 Minuten bei 115 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Die Zugabe des Ampicillins für die Selektionsagarplatten erfolgte nach dem Abkühlen des agarhaltigen Mediums kurz vor dem Gießen der Platten.

**4.1.1.2 Weitere benötigte Materialien für das Arbeiten mit Bakterien**

<u>Materialien</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
Columbia Agar Platten	Anzucht von <i>S. pneumoniae</i>	BD Mikrobiologie
Erythromycin 98 %ig	Selektionsantibiotikum für R6xply-	Sigma
Homogenisator	Mauslunge	Eigenanfertigung
Sterile Watteträger	Überführen von Bakterien	Applimed SA
Unitwist 400	Anzucht von <i>E. coli</i>	Uniequip
10 cm Kulturschalen	Selektionsagarplatten	Nunc
Impfösen 10 µl	Ausplattieren der Bakterien	Roth

#### 4.1.2 Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen verschiedenster Ausführungen wurden bei Falcon® bezogen.

#### 4.1.3 Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten

<u>Materialien für BEAS-2B-Zellen</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Stimulationsmedium</b>		
Keratinocyte SFM	500,00 ml	Gibco
Epithelial Growth Factor	2,50 µg	Gibco
Bovine pituitary extract	25,00 mg	Gibco
Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
Epinephrin-Hydrochlorid (1 mg/ml)	250,00 µl	Sigma
All trans Retinolsäure (1 mg/ml)	50,00 µl	Sigma
<b>Zellkulturmedium</b>		
Stimulationsmedium	500,00 ml	Gibco
Amphotericin B 500 x	200,00 µl	Roche
Penicillin/Streptomycin	7,00 ml	PAA
<b>Adhäsionsflüssigkeit</b>		
Keratinocyte SFM	100,00 ml	Gibco
Bovines Serumalbumin (100 mg/ml)	1,00 ml	Sigma
Fibronectin (1 mg/ml)	1,00 ml	Sigma
Vitronectin (5 µg/ml)	0,1 ml	Sigma
<b>Kryokonservierungsmedium</b>		
Keratinocyte SFM	10,00 ml	Gibco
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	1,00 %	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	7,50 %	Sigma



<b><u>Materialien für HEK293-Zellen</u></b>	<b><u>Zusammensetzung</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<b>Stimulationsmedium</b>		
Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Life Technologies
<b>Zellkulturmedium</b>		
Fötale Kälberserum (FCS)*	10,00 %	Gibco
Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
Penicillin/Streptomycin 100 x	5,00 ml	PAA
<b>Kryokonservierungsmedium</b>		
Dulbeccos Modified Eagle Medium	500,00 ml	Life Technologies
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma

\* Für Zellkulturmedium verwendetes FCS wurde für eine Dauer von 30 Minuten auf 56 °C im Wasserbad zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt.

<b><u>Materialien für CHO-3E10-Zellen</u></b>	<b><u>Zusammensetzung</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
<b>Stimulationsmedium</b>		
Ham´s nutrient-Medium F-12	500,00 ml	Gibco
<b>Zellkulturmedium</b>		
Fötale Kälberserum (FCS)*	10,00 %	Gibco
Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
Penicillin/Streptomycin 100 x	5,00 ml	PAA
<b>Zusätzlich verwendete Antibiotika</b>		
Hygromycin B	405 µg/ml	Calbiochem
Genticin (G418)	0,4 mg/ml	Gibco
<b>Kryokonservierungsmedium</b>		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS)*	20,00 %	Gibco

Ham's nutrient-Medium F-12	70,00 %	Gibco
----------------------------	---------	-------

#### 4.1.4 Stimulanzen, Inhibitoren und Enzyme

<u>Stimuli</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Hersteller</u>
IL-1 $\beta$	human rekombinant	R&D Systems
TNF $\alpha$	human rekombinant	R&D Systems
Lipopolysaccharid	Rekombinant	Sigma

<u>Inhibitoren</u>	<u>Wirkungsweise</u>	<u>Hersteller</u>
SB202190, SB203580	Spezifische Inhibition der p38-MAPK	Calbiochem
SB202474	Nichtfunktionierende Kontrollkomponente der p38-MAPK-Inhibitoren	Calbiochem
IKK-NBD	Inhibition der IKK-Untereinheit NEMO	Biomol

<u>Enzyme</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
Trypsin/EDTA 1 x	Ablösen der Beas-2B-Zellen	Gibco
Accutase	Ablösen der CHO-3E10-Zellen	PAA
AMV Reverse Transcriptase	Generierung von cDNA aus RNA	Promega
RNasin, rekombinant	Generierung von cDNA aus RNA	Promega
Red Taq Polymerase	Vermehrung der cDNA	Sigma

#### 4.1.5 Puffer, Lösungen und Gele

<u>ELISA-Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>	<u>Hersteller</u>
<b>Carbonatpuffer 0,1 M; pH 9,5</b>		
Natriumhydrogencarbonat	4,20 g	Merck
Natriumcarbonat	1,78 g	Merck
a. bidest.	500,00 ml	

**Blockierungspuffer**

Dulbeccos PBS 1 x	45,00 ml	PAA
FCS	5,00 ml	Gibco

**Waschpuffer**

Dulbeccos PBS 1 x	1000,00 ml	PAA
Tween20	0,05 %	Sigma

**Substratlösung (TMB Substrat Reagent Set)**

Wasserstoffperoxid	50,00 %	BD Bioscience
3,3', 5,5'Tetramethylbenzidine	50,00 %	BD Bioscience

**Stopplösung 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 95-97 %ig	27,47 ml	Merck
a. bidest.	500,00 ml	

**PCR-Puffer****Zusammensetzung****Hersteller****Lysepuffer**

RLT	1,00 ml	Qiagen
B-Mercaptoethanol	0,01 %	Sigma

**TAE Puffer, pH 8,0**

Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig 100 %ig	1,14 ml	Merck
EDTA 0,5 M	2,00 ml	Roth
a. bidest.	1000,00 ml	

**EMSA-Puffer****Zusammensetzung****Hersteller****5x Bindepuffer**

Tris-HCl; pH 7,5	50,00 mM	Sigma
Magnesiumchlorid	5,00 mM	Sigma

EDTA	2,50 mM	Roth
DTT	5,00 mM	Serva
Natriumchlorid	250,00 mM	Rith
Glycerol	20,00 %	Sigma
a. bidest.	100,00 ml	

### **TGE Puffer; pH 8,3**

Tris Base	6,16 g	Sigma
Glycin	28,54 g	Serva
EDTA	784,00 mg	Roth
a. bidest.	1000,00 ml	

### **5x Orange G**

Glycerol	5,00 ml	Sigma
EDTA 0,5 M	1,00 ml	Roth
Orange G 2 %ig	1,00 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	0,10 ml	Serva
a. bidest.	10,00 ml	

### **EMSA-Gel**

### **Zusammensetzung Hersteller**

#### **natives Polyacrylamidgel**

40 % Bis-Acrylamid; Ratio 29 :1	5,00 ml	Serva
Tris 1 M pH 7,5	2,00 ml	Sigma
Glycin 1 M	7,60 ml	Serva
EDTA 0,5 M	160,00 µl	Roth
APS 10 %ig	200,00 µl	Serva
TEMED	30,00 µl	R&D Systems
a. bidest.	26,00 ml	

#### 4.1.6 Primer, Oligonukleotide und Antikörper

<u>PCR-Primer</u>	<u>Vorwärtssequenz</u>	<u>Rückwärtssequenz</u>	<u>Hersteller</u>
GM-CSF	5'TGGCTGCAGAG	3'CAGTTCCAGTGACTC	TIB
	CCTGCTGCTC	TTTCGGTGGAGCGTC	MOLBIOL
GAPDH	5'CCACCCATggC	5'TCTAgACggCAgg	TIB
	AAATTCCATggCA	CAggTCAggTCCACC	MOLBIOL

<u>Sonstige Primer</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
Random Hexamer Primer	Reverse Transkriptase	Promega

<u>EMSA- Oligonukleotide</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Hersteller</u>
AP-1/1	5'-IRD700- GTCAGTCAGTGACTCAATCGGTCA-3'	metabionGmbH
AP-1/2	5'-IRD700- TGACCGATTGAGTCACTGACTGAC-3'	metabionGmbH
AP-1 cool 1	5'-GTCAGTCAGTGACTCAATCGGTCA-3'	metabionGmbH
AP-1 cool 2	5'-TGACCGATTGAGTCACTGACTGAC-3'	metabionGmbH

<u>FACS- Antikörper</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
CD25-APC	Markierung von CD25 auf aktivierten CHO-3E10-Zellen	BD Bioscience
ISO-APC	Isotypenkontrolle	BD Bioscience

#### 4.1.7 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
BioRad Gelelektrophorese System	Gelelektrophorese (EMSA)	BioRad
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera (PCR)	Olympus
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Olympus Kamera (PCR)	
FFX-20M GIBCO BRL UV Transluminator	Darstellung der Banden im PCR-Gel	Life Technologies™
Gelhalterungssystem	Vorrichtung zum Gießen der Gele (PCR)	BioRad
Gießvorrichtung	Einspannen der Glasplatten (EMSA)	BioRad
Lumat LB 9501	Messung der Lumineszenz (Reporter Assay)	Bertholt
Odyssey Scanner Platereader	Dokumentation (EMSA) Auslesen der ELISA-Platten	LI-COR STL
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Durchführung der RT-PCR	MJ Research
BD FACSCalibur™ System	Zählen CD25-positiver CHO-3E10-Zellen	BD Bioscience

Eingesetzte Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Schüttler, Eismaschinen usw. werden in dieser Arbeit nicht extra aufgeführt. Sie entsprechen alle den gängigen Standards und werden regelmäßig gewartet.

#### 4.1.8 Verbrauchsmaterialien

<u>Materialien/Substanzen</u>	<u>Verwendungszweck</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	Gelelektrophorese (PCR)	Promega
dNTP Mix	DNA-Bausteine (RT-PCR)	Promega

Ethidiumbromid	Dokumentation der DNA-Banden (PCR)	Sigma
Quarzglasküvetten Typ 105.200	RNA- und Plasmid DNA-Messung	Hellma
Röhren 5 ml; 75 x 12 mm Ø	Lumineszenzmessung (Reportergeräten)	Sarstedt
Thermowell™ Tubes 0,5 ml	DNase und RNase freie Reaktionsgefäße (RT-PCR)	Costar®
MaxiSorp-96er Assay Platten	ELISA-Platten	Mikroplatten.de

Außerdem verwendete Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße u. ä. entsprechen den gängigen Standards und werden hier nicht extra aufgeführt.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Pneumokokkenkultur und -stimulation**

#### **4.2.1.1 Pneumokokkenstämme**

Die verwendeten Pneumokokkenstämme R6x, R6xply-, SPN232 sowie SP37 wurden freundlicherweise von Dr. Sven Hammerschmidt (Forschungszentrum für Infektionskrankheiten, Universität Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Pathogenitätsfaktoren. Der Stamm R6x besitzt im Gegensatz zum Wildtyp D39 (Serotyp 2) keine Kapsel, und ist aufgrund seiner verminderten lytischen Aktivität für den Einsatz in der Zellkulturmethodik sehr geeignet. Darüber hinaus wurde eine Mutante des Stammes R6x, der Stamm R6xply- verwendet. Es handelt sich dabei um eine pneumolysinnegative Mutante, die durch Transformation eines pJDC9:ply-Konstrukts in *S. pneumoniae* Stamm R6x erzeugt wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Zysk, Düsseldorf, Deutschland; Zysk *et al.*, 2001). Der dadurch entstandene Stamm R6xply- wurde auf Schafblutagar mit 1 µg/ml Erythromycin als Selektionsantibiotikum kultiviert. Der ferner eingesetzte Stamm SPN232 ist eine kapsellose Variante des Typ3 des Stammes SP36 (ein NCTC Stamm 7978), der sich durch erhöhte Adhärenz und Invasion auszeichnet und außerdem über das untersuchte Protein Pneumolysin verfügt. Ebenfalls adhärent und invasiv, dabei wenig bekapselt und pneumolysinpositiv ist der Stamm SP37 (NCTC10319), ein Typ 35A Stamm.

#### **4.2.1.2 Pneumokokkenkultur und -stimulation**

Kultiviert wurden die verschiedenen Pneumokokkenstämme auf Columbia-Agar mit 5% Schafblut (BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden wenige Kolonien in 20 ml Nährbouillon (15 g Todd-Hewitt-Bouillon, 0,5 % Hefeextract in 500 ml Aqua bidest.) überführt und wiederum 3 - 4 h inkubiert. Die optimale optische Dichte des Ansatzes, bei der sich die Pneumokokken in der Wachstumsphase (logarithmische Phase)



befinden, beträgt  $2 - 4 \times 10^8$  cfu/ml und wurde mittels Extinktionsmessung bei 600 nm bestimmt. Nach Erreichen dieser optischen Dichte konnte das Pneumokokken-Bouillon-Gemisch bei 3900 g für 10 min zentrifugiert und danach in Stimulationsmedium je nach Versuchsprotokoll resuspendiert werden. Die Stimulationsdauer und die Pneumokokkenkonzentration wurden entsprechend dem jeweiligen Versuchsprotokoll variiert.

#### **4.2.2 BEAS-2B-Kultur und -Stimulation**

Die humane Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B (zur Verfügung gestellt von Dr. Curtis Harris, NIH, Bethesda, MD; Fuhrmann *et al.*, 1999, Reddel *et al.*, 1988) wurde in Keratinocyte SF-Medium (Gibco™ Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Deutschland) ergänzt gemäß den Angaben des Herstellers (ATCC, Manassas, VA) kultiviert.

Für die Untersuchung der Zytokininduktion (GM-CSF-ELISA, Bio-Plex™ Cytokine Assay) durch *S. pneumoniae* wurden die BEAS-2B-Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz in 24-Lochplatten gezüchtet, dann mit antibiotikafreiem Medium überschichtet, und am Folgetag mit Pneumokokken ( $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  cfu/ml), TNF $\alpha$  (50 ng/ml, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), IL1- $\beta$  (10 ng/ml, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland), Pneumolysin (0,01  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Hammerschmidt; Leipzig, Deutschland) oder Peptidoglykan (1  $\mu$ g/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. R. Schumann, Berlin, Deutschland) stimuliert. In einigen Experimenten wurden die Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190, SB203580 und SB202474 (Calbiochem, Merck, Darmstadt, Deutschland), oder dem IKK $\gamma$ /NEMO-Inhibitor IKK-NBD (Biomol, Plymouth Meeting, PA) in verschiedenen Konzentrationen vorinkubiert. Für die Bestimmung der AP-1-Aktivierung durch Pneumokokken mithilfe des EMSA wurden BEAS-2B-Zellen in 10 cm-Schalen ausgesät, bei Erreichen der Konfluenz mit antibiotikafreiem Medium überschichtet und am Folgetag mit verschiedenen Konzentrationen des Pneumokokkenstammes R6x, TNF $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  stimuliert.

### **4.2.3 HEK293-Zellkultur und -Stimulation**

Humane embryonale Nieren (HEK293)-Zellen (American Type Culture Collection ATCC, Rockville, USA) wurden in DMEM-Medium (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) mit 1 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FCS kultiviert. Im Rahmen der Versuchsvorbereitung erwies sich die Aussaat von  $1,2 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung einer 12-Loch-Zellkulturplatte, beziehungsweise  $0,8 \times 10^5$  Zellen/ Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte als sinnvoll, um nach 60 h eine für die Transfektion erforderliche 50-80 %-ige Konfluenz zu erlangen.

Im Rahmen der TLR-2-Überexpressionstudien wurde zur Stimulation TLR-2-transfizierter Zellen DMEM ohne FCS und Penicillin/Streptomycin verwendet, wohingegen für die Stimulation TLR-4-transfizierter Zellen 10 % FCS zugegeben wurden. Die Stimulation erfolgte 24 - 48 h nach der Transfektion je nach Protokoll mit LPS (150 ng, 200 ng, Sigma), verschiedenen Pneumokokkenstämmen in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Kap. 4.2.1), TNF $\alpha$  (50  $\mu$ g/ml), oder Pneumolysin (1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml). Der Stimulationsansatz wurde 6 h inkubiert und im Anschluss daran 1x mit PBS/- gewaschen.

Für die A-Fos-Überexpressionsexperimente wurden die transfizierten HEK293-Zellen mit TNF $\alpha$  (50 ng/ml) und Pneumokokken (Stamm R6x,  $10^5$  cfu/ml) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 15 h wurden die Überstände in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt, bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert und auf ihre IL-8-Konzentration anhand des Human-IL-8-ELISA (enzyme-linked immunosorbend assay)-Sets (BD Bioscience Opt EIA™) (siehe Kap. 4.2.6.2) geprüft.

### **4.2.4 CHO-3E10-Kultur und -Stimulation**

Die Ovarialzellen des chinesischen Hamsters „Chinese hamster ovary cells“(CHO) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Ghosh, YALE University New Haven, USA) enthalten ein NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid, das bei NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Expression von CD25 auf der Zelloberfläche führt. Außerdem beinhalten die Zellen ein Plasmid zur CD14-, sowie zur TLR-4-Expression.

Die Zelllinie wurde in Ham's nutrient-Medium F-12 (Gibco™ Invitrogen Corporation) mit 1 % Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertem FCS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Um die stabil transfizierten Gene dauerhaft intrazellulär zu halten, wurden

die Zellen kontinuierlich mit eukaryontenwirksamem Antibiotikum Hygromycin B (405 µg/ml, Calbiochem), sowie Genticin (=G418, 0,4 mg/ml, Gibco) versetzt. Zellen, die das Plasmid verlieren, büßen damit die Antibiotikaresistenz vermittelnde Resistenzgen ein und sterben ab.

Zur Versuchsvorbereitung wurden  $2 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung einer 6-Loch-platte ausgesät. Nach 72 h erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS/- die Stimulation mit 150 ng/ml LPS (Sigma) bzw. Pneumolysin (2 µg/ml, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tim Mitchell, Univ. Glasgow, UK). Die Inkubationszeit dieses Ansatzes betrug 18 h.

## **4.2.5 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)**

### **4.2.5.1 Prinzip**

Mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist es möglich, aus einer geringen Nukleinsäuremenge innerhalb weniger Stunden ein spezifisches Fragment *in vitro* millionenfach anzureichern. Dazu erfolgt die Auftrennung der beide Stränge der DNA durch Erhitzen auf 94 °C (Denaturation), dann wird die Temperatur auf 55 °C gesenkt, um die Hybridisierung der, im massiven Überschuß vorhandenen, Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA zu ermöglichen (Annealing). Diese Primer bestehen aus 15 - 25 Basen und sind der Sequenz des 5'-Endes der Einzelstränge komplementär. Im Anschluss wird die Temperatur auf 70 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Dabei werden die Primer verlängert (Elongation), bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der Ausgangs-DNA exakt gleicht. Werden diese Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle.

### **4.2.5.2 RNA-Isolierung und Reverse-Transkription-Reaktion**

Durch die Reverse-Transkription-Reaktion kann isolierte mRNA mithilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden, die dann als Ausgangsmatrize für die

Amplifikation dient. Dafür wurde aus isolierten Mauslungen (freundlicherweise bereitgestellt von Martin Witzernath, CCM Berlin) die RNA herausgelöst, indem das in flüssigem Stickstoff gefrorene Lungengewebe sofort nach Entnahme zunächst mechanisch homogenisiert wurde. Um Zellstrukturen aufzubrechen, wurden die Proben zuerst mit RLT-Puffer bzw. Lysepuffer zur Proteinextraktion inkubiert und danach 6 x 3 Sekunden bei halber Kraft (50 % Power) beschallt. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Daraufhin wurde 1 µg RNA mit 11,5 µl Aqua tridest. auf Eis vermischt und in ein dünnwandiges 0,5-ml-Eppendorfgefäß überführt. Im Thermocycler erfolgte nun die erste Inkubation bei 70 °C über 5 min. Nach dem Abkühlen auf 42 °C wurden 8,5 µl eines Gemisches, bestehend aus 4 µl AMV-puffer (5x), 2 µl Nukleotide (dNTP, 10 mM, Promega), 1 µl Hexamer-Primer (0,2 µg/ml, Pharmacia), 0,75 µl RNasin® sowie 0,75 µl AMV-Reverse Transkriptase (bzw. Taq-Polymerase, Promega, Heidelberg, Deutschland), hinzugefügt, wobei darauf zu achten war, dass die beiden zuletzt genannten Substanzen erst unmittelbar vor dem Start der Reaktion zugegeben werden dürfen.

Es schloss sich eine weitere Inkubation bei 42 °C für 60 min an, danach wurde die RT-Reaktion durch Erhitzen auf 95 °C für 5 min beendet. Anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und 80 µl Aqua bidest. zugegeben. Die so erhaltene cDNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

#### **4.2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die sich nun anschließende Vervielfältigung der gewonnenen DNA wurden zunächst 5 µl der cDNA mit 2,5 µl Ammonium-PCR-Puffer (10x) einschließlich Magnesiumchlorid, 0,5 µl Nukleotide (dNTP, 10mM), jeweils 0,25 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (0,5 µg/ml), 15,65 µl Aqua tridest., sowie 1 µl Taq-Polymerase versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1 Tropfen Mineralöl bedeckt. Daraufhin wurden ca. 35 Zyklen bei einer Annealingtemperatur von 60 - 62 °C durchlaufen, die finale Extension erfolgte bei 72 °C für 5 min. Um die gleichmäßige Beladung mit RNA in jedem Experiment zu sichern, wurden alle Ansätze auf die jeweilige Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)-mRNA-Expression untersucht. Hierfür bedurfte es ca. 30 Zyklen bei 60 °C Annealingtemperatur.

#### **4.2.5.4 Elektrophorese**

Für die Elektrophorese wurde ein 1,5 %-iges Agarosegel hergestellt, indem 100 ml TAE-Puffer mit 1,5 g Agarose (Promega®, EEO von 0,06-0,13) vermischt und erhitzt wurden, daraufhin wurden 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt und das Gel gegossen. Die Proben wurden in TAE-Puffer (1x) bei 100 V für ca. 1 h aufgetrennt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte mit einer Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter unter UV-Licht.

#### **4.2.6 ELISA**

##### **4.2.6.1 GM-CSF-ELISA**

Die Konzentration von GM-CSF in den BEAS-2B-Überständen wurde mithilfe des Human-GM-CSF-ELISA (enzyme-linked immunosorbend assay)-Sets (BD Bioscience Opt EIA™, BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) gemessen.

Zu diesem Zweck wurden MaxiSorp-ELISA-Platten (Mikroplatten.de, Straubenhardt, Deutschland) mit anti-GM-CSF-Antikörpern nach Angaben des Herstellers in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,5) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am Folgetag wurden nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS, 0,05 % Tween20) die freien Proteinbindungsstellen mit Blockierungspuffer (PBS, 10 % inaktiviertes FCS, pH 7) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Daran schloss sich, wie auch vor jedem folgenden Schritt, ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer an. Nun konnte die Standardreihe mit GM-CSF in Blockierungspuffer sowie die BEAS-2B-Überstände unverdünnt auf die ELISA-Platten aufgetragen und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Ebenfalls bei Raumtemperatur erfolgte dann die Überschichtung mit Detektions-anti-GM-CSF-Antikörpern gekoppelt an ein Enzym-Reagenz (Avidin-horseradish peroxidase conjugate) in Blockierungspuffer, wiederum gemäß der Anleitung des Herstellers für 1 h. Die Substratreaktion erfolgte mit Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid (TMB-Substrate Reagent Set, BD Pharmingen™) als Substrate. Nach Inkubation unter Lichtausschluss für 30 min konnte jetzt die Farbreaktion durch 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Extinktion mit

einem Spektrometer ermittelt werden. Anhand der Standardkurve wurden die jeweiligen GM-CSF-Konzentrationen abgeleitet. Die Absolutwerte der gemessenen Konzentrationen lagen im pg/ml-Bereich.

#### **4.2.6.2 IL-8-ELISA**

Mithilfe des Human-IL-8-ELISA-Sets (BD Biosciences OptEIA™) konnten die Konzentrationen von humanem IL-8 analog des GM-CSF-ELISA nach Angaben des Herstellers gemessen werden. Als Abweichung vom oben beschriebenen Protokoll erfolgte die Messung der Zytokinkonzentration aus 1:50-Verdünnungen der BEAS-2B-Zellüberstände mit Blockierungspuffer. Die Absolutwerte lagen im pg/ml-Bereich.

#### **4.2.7 Bio-Plex™ Cytokine Assay**

Die Konzentration von GM-CSF, IL-8, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in den BEAS-2B-Überständen wurde mithilfe des, als „sandwich immunoassay“ konzipierten, Bio-Plex™ Cytokine Assay (BioRad, München, Deutschland) unter Befolgung der Angaben des Herstellers gemessen. Diese Methode basiert auf der Bindung der nachzuweisenden Moleküle an fluoreszenzmarkierte Mikrosphären (beads), welche mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Die zu bestimmenden Zytokine werden durch einen zweiten Antikörper detektiert, und die biochemischen Reaktionen an der Oberfläche der Mikrosphären nach Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin mithilfe eines Flusszytometers bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden die vorbereiteten Mikrosphären auf, mit Bio-Plex Assay Puffer, angefeuchtete Filterplatten gegeben und nach zweimaligem Waschen des Filters die Überstände *S. pneumoniae*-stimulierter BEAS-2B-Zellen bzw. die Standardproben hinzugegeben. Alle verwendeten Proben wurden bis zur Messung auf Eis aufbewahrt, zusätzlich wurden die Mikrosphären bei allen Arbeitsschritten vor Lichteinstrahlung geschützt. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Proben-Mikrosphären-Gemische bei Raumtemperatur auf einem Schüttler und 3-maligem Waschen des Filters mit dem Bio-Plex Waschpuffer wurden dem Ansatz Detektionsantikörper zugegeben. Ebenfalls bei Raumtemperatur wurden im Anschluss daran die Proben nochmals 30 min inkubiert und der Filter 3-mal

gewaschen. An die Zugabe von Streptavidin-Phycoerythrin schloss sich ebenfalls eine 10-minütige Inkubation und 3-maliges Waschen an. Zuletzt wurden die Mikrosphären mittels Bio-Plex Assay Puffer resuspendiert und die Konzentration der Zytokine mithilfe des Flusszytometers bestimmt. Anhand von Standardkurven wurden die jeweiligen Zytokinkonzentrationen abgeleitet.

## **4.2.8 HEK293-Überexpressions-Experimente**

### **4.2.8.1 Plasmid-DNA-Transformation und -Isolierung**

Es wurden TLR-2-, TLR-4- und CD14-kodierende Plasmide (Kirschning *et al.*, 1998) sowie MD2-kodierende Plasmide (Miyake *et al.*, 2000, Akashi *et al.*, 2000) wie beschrieben verwendet, ebenso das NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid (Schwarzer *et al.*, 1998). RSV- $\beta$ -Galaktosidase-kodierende Plasmide wurden freundlicherweise von W. Hallatschek (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Der CMV-500-Leervektor sowie CMV-500-A-Fos-kodierende Plasmide wurden von Charles Vinson zur Verfügung gestellt (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Für die Transformation der Plasmid-DNA in kompetente *E.coli DH5 $\alpha$* <sup>TM</sup> (Invitrogen) wurde zunächst 1  $\mu$ g der bereitgestellten und auf ihre Identität bereits geprüften DNA zu 100  $\mu$ l der Bakterien hinzugegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis, 45 Sekunden bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 800  $\mu$ l LB-Medium (1 % Bacto-Tryptan, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) dem Ansatz hinzugefügt und wiederum für 1 h bei 37 °C inkubiert. Auf Selektions-Agar (LB-Medium versetzt mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin und Agar) wurden im Anschluss 100  $\mu$ l des Plasmid-*E.coli*-Gemischs ausplattiert und über Nacht bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden jeweils einzelne Kolonien mit einer Impföse in 5 ml LB-Medium mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin überführt und die so entstandene Vorkultur 10 h bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Die anschließend angefertigte Hauptkultur bestand aus 75 ml LB-Medium versetzt mit 150  $\mu$ l der Vorkultur sowie 50  $\mu$ g/ml Ampicillin. Einer erneuten Inkubation über Nacht folgte nun eine Zentrifugation für 15 min bei 5000 g. Mittels High Speed MIDI-Kit (Qiagen) konnte die Plasmid-DNA nach

Anleitung des Herstellers aufgereinigt werden. Die exakte DNA-Konzentration wurde durch Extinktionsmessung bei 260 nm ermittelt.

#### **4.2.8.2 HEK293-Transfektion mittels Calciumphosphatpräzipitationsmethode**

HEK293-Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphatpräzipitationsmethode (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit, Clontech Laboratories, Palo Alto, USA) nach Angaben des Herstellers transfiziert. Diese Methode fußt auf der Theorie, dass Plasmid-DNA mit Calciumphosphat Kristalle bildet, welche dann mittels Endozytose in die Zelle gelangen. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurden die Zellen mit 0,05 µg RSV-β-Galaktosidase-Plasmid kotransfiziert. Je nach Versuchsansatz wurden unterschiedliche Plasmidkonzentrationen verwendet. Die Gesamt-DNA-Konzentration betrug 0,2 µg/Vertiefung, was bei verschiedenen Ansätzen die Verwendung eines Kontrollvektors erforderlich machte, um eben diese Konzentration konstant zu halten. In Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen mit PBS/- gewaschen und mit DMEM mit 10 % FCS beschichtet.

#### **4.2.8.3 Luciferase- und β-Galaktosidase-Bestimmung**

Nach Ablauf der Stimulationszeit und anschließender Lysierung der Zellen mittels Lysierungspuffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega Corporation, Madison, USA) konnten die Luciferasekonzentrationen mit Hilfe des „Luciferase Reporter Gene Assay“ (Promega, Mannheim, Deutschland) unter Befolgung der Instruktionen des Herstellers am Luminometer (Berthold) gemessen werden. Zur β-Galaktosidasebestimmung wurde anhand des „β-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) analog verfahren. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen wurden die erhaltenen Luciferasewerte durch die β-Galaktosidasewerte dividiert. Alle Angaben diesbezüglich erfolgen deshalb in relativen Luciferase-Aktivitäten.



#### **4.2.8.4 HEK293-Transfektion mittels SuperFect®**

Auch bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass DNA mit dem SuperFect®-Reagenz kompakte Komplexe ausbildet, was wiederum das Eindringen der Plasmide in die Zelle erleichtert. Die SuperFect®-DNA-Komplexe besitzen eine leicht positive Ladung, welche die Bindung an negativ geladene Rezeptoren (z. B. sialylierte Glykoproteine) der Zelloberfläche ermöglicht. In der Zelle selbst kommt die Pufferfunktion des SuperFect®-Reagenz zum Tragen, welche durch Inhibition der lysosomalen Nukleasen die Stabilität der Plasmid-Reagenz-Komplexe erhöht. Es wurden Plasmide kodierend für TLR-2 (0,1 µg/Vertiefung), dominant negatives c-Fos (= CMV500-A-Fos, 0,05 µg/Vertiefung), CMV500-Leervektor (0,05 µg/Vertiefung) verwendet. Auch hier war zur Konstanthaltung der Gesamt-DNA-Menge von 0,4 µg/Vertiefung eine Ergänzung der Ansätze durch einen mock-Leervektor erforderlich. Die Transfektion erfolgte unter Beachtung der Angaben der Hersteller. Anschließend wurden die Zellen mit PBS -/- gewaschen und mit DMEM mit 10 % FCS beschichtet.

#### **4.2.9 FACS-Analyse**

Während der Wachstums- und Differenzierungsphase von Zellen, sowie deren Exposition gegenüber externen Stimuli kommt es zu einer qualitativen und quantitativen Änderung der Expression von Oberflächenmolekülen. Diese können mithilfe der FACS- (engl.: „fluorescence-activated cell sorter“) Analyse voneinander unterschieden werden, indem fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper mit den Zelloberflächenproteinen, wie z. B. den Differenzierungsantigenen (cluster of differentiation, CD), reagieren.

Zunächst wurden dazu die CHO-3E10-Zellen mit PBS-/- gewaschen und von der 6-Loch-Platte abgelöst. Danach wurden die Zellen dreifach bei 4 °C und 2000 g zentrifugiert, dazwischen wurde das Zellpellet jeweils vom Überstand getrennt und in eiskaltem PBS+/+ resuspendiert. Nach der letzten Zentifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen auf Eis mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (CD25/APC, ISO/APC) überschichtet und 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml eiskaltem PBS+/+ resuspendiert und im Kanal FL-4 des

FACScalibur (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland) gemäß ihrer nun markierten CD25-Oberflächenproteine gezählt.

#### **4.2.10 Pneumolysin-Polymyxin-Test**

Rekombinantes Pneumolysin wurde in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt (Saunders *et al.*, 1989). Die Stockproteinkonzentration betrug 0,21 mg/ml, was  $1,3 \times 10^6$  hämolytischen Einheiten/ml entspricht. Um eine Kontamination des verwendeten Pneumolysins mit LPS auszuschließen, wurde der Polymyxin-Test durchgeführt. Bei Polymyxin handelt es sich um ein bakterizides Antibiotikum, welches durch Bindung an LPS die Zellmembran schädigt, und demzufolge gegen gramnegative Erreger wirksam ist. Hier wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Polymyxin mit LPS Komplexe bildet und dadurch seine Wirkung auf die Zelle verringert.

Dazu wurden HEK-293-Zellen wie bereits beschrieben kultiviert, ausgesät und mit Plasmiden zur Expression von TLR-4 (0,001 µg/Vertiefung), MD2 (0,001 µg/Vertiefung), CD14 (0,001 µg/Vertiefung), NF-κB-abhängigem Luciferase-Reporter (0,05 µg/Vertiefung), β-Galaktosidase (0,05 µg/Vertiefung) anhand der Calciumphosphatpräzipitationsmethode transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) oder Pneumolysin (1 µg/ml) jeweils einzeln sowie mit Polymyxin (10 µg/ml) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 5 h wurde die Luciferase- sowie die β-Galactosidase-Aktivität mittels „Luciferase Reporter Gene Assay“ bzw. „β-Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent“, wie bereits beschrieben (siehe Kap. 4.2.8.3), ermittelt.

#### **4.2.11 Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

##### **4.2.11.1 Prinzip des Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Die Methode des „Elektrophoretic Mobility Shift Assay“ dient der Detektion DNA-bindender Proteine. Das Laufverhalten von IRDye™-markierten doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden in einem Elektrophoresegel verändert sich, wenn sie eine spezifische Bindung mit DNA-bindenden Proteinen eingehen.

#### **4.2.11.2 Gewinnung der nukleären Proteine**

Zunächst wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem Phosphoprotein-Waschpuffer (0,1 M NaF, 5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 15 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 400 ml PBS-/-) gewaschen, mit 90 µl Puffer A (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0,1 % NP-40, 1 mM DTT, 10 µg Leupeptin, 10 µg Antipain, 10 µg Pepstatin, 788 µl Phosphoprotein-Waschpuffer) beschichtet und vorsichtig abgeschabt. Danach wurde die Zellsuspension in 1,5-ml-Eppendorfgefäße überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die leichte Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 3 min. Die Überstände mit der enthaltenen zytosolischen Proteinfraction wurden entfernt, das Pellet mit 50 µl Puffer B (10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 50 mM DTT, 0,25 mM PMSF, 0,25 µg Leupeptin, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) resuspendiert und 30 min bei 4 °C im Schüttler inkubiert. Darauf folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000 g und 4 °C. Die dabei gewonnenen Überstände enthielten die nukleären Proteine. Diese Überstände wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### **4.2.11.3 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Proteinquantifizierung wurden 5 µl der Probe in 1 ml BioRad-Reagenz (1:5 Verdünnung von Reagenz mit Aqua bidest.) pipettiert und entsprechend der Methode nach Bradford (BioRad Protein-Assey, BioRad, München, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers die Extinktion mit einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Anschließend konnte die Konzentration anhand einer Eichreihe ermittelt werden.

#### **4.2.11.4 Hybridisierung der Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotide enthielten die AP-1-Konsensussequenz 5'-GTCAGTCAGTGAATCGGTCA-3' (metabion GmbH, Martinsried, Deutschland). Die Markierung erfolgte durch den Hersteller mit IRDye™700. Das „kalte“ Oligonukleotid lag unmarkiert vor. Zur Herstellung der Doppelstrang-

Oligonukleotide (hybridisieren oder „annealen“) wurden äquimolare Mengen der komplementären Einzelstränge in TE-Puffer (Qiagen) im Thermocycler für 3 min bei 100 °C denaturiert und anschließend bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss abgekühlt.

#### **4.2.11.5 Elektrophoretic Mobility Shift Assay**

Um die Bindung der Oligonukleotide an die zu detektierenden Proteine zu ermöglichen, wurden die Reaktionsansätze bestehend aus 7,5 µg nukleärem Protein, Oligonukleotid (20 mM), DTT (25 mM) versetzt mit 2,5 % Tween-20 und 5fach-Bindepuffer (50 mM TrisHCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM EDTA, 5 mM DTT, 250 mM NaCl, 20 % Glycerol, 400 µg Lachssperma, Aqua bidest.) bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Je nach Versuchsprotokoll wurden einigen Ansätzen unmarkierte („kalte“) Oligonukleotide in 15fach molarem Überschuss (300 mM) zur Kompetition hinzugefügt. Danach erfolgte die Auftrennung der Ansätze in 4 %-igem Polyacrylamidgel in TGE-Puffer (Tris Base 6,1g, Glycin 28,5g, EDTA 0,78g in 1 l Aqua bidest., pH 8,3) bei 80 V. Als optimal hat sich die Elektrophorese bei Dunkelheit und auf Eis herausgestellt. Für die Auswertung wurde das Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR® Bioscience) unter Beachtung der Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurde das Elektrophoesegel eingescannt und anhand der mitgelieferten Software bearbeitet.

#### **4.2.12 Statistik**

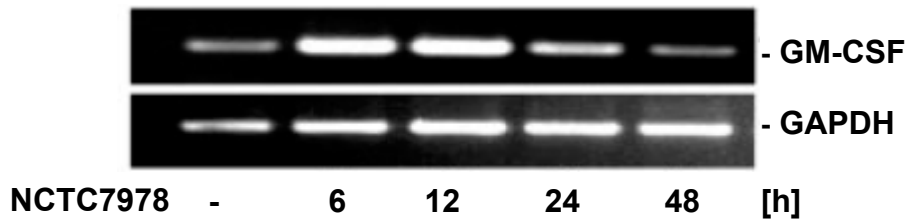
Alle gezeigten Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des „Einweg-ANOVA“ und dem Newmann Keuls post Test. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm Microsoft Office Excel® verwendet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 *S. pneumoniae* induziert die GM-CSF-Expression in Mäuselungen

Die Pneumokokkenpneumonie ist gekennzeichnet durch eine massive Leukozyteninfiltration. Wichtig dafür ist die Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine durch das Lungenepithel und Zellen der angeborenen Immunität. Über GM-CSF als hämatopoetischen Wachstumsfaktor ist bekannt, dass er nicht nur zur Generierung von Granulozyten und Makrophagen aus Vorläuferzellen beteiligt ist, sondern auch direkt am Infektionsort selbst zur Leukozytenaktivierung beitragen kann. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob *S. pneumoniae* die Freisetzung des Wachstumsfaktors GM-CSF *in vivo* in infizierten Mäuselungen induzieren kann.

In der Arbeitsgruppe von Fr. Dr. Rosseau (Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie) wurden von Hr. Dr. Hocke gemäß den Tierschutzbestimmungen C57BL/6-Mäuse durch intranasale Infektion für 6, 12, 24 und 48 h mit *S. pneumoniae* NCTC 7978 infiziert. Dies führte zur Ausbildung einer mit massivem Leukozyteneinstrom verbundenen Pneumonie. Daraufhin wurden die Lungen explantiert, homogenisiert und die gesamte RNA isoliert. Mittels RT-PCR wurde das erhaltene Material auf die mRNA-Expression des Zytokins GM-CSF hin untersucht. Dabei konnte eine zeitabhängige Zunahme der mRNA-Expression für GM-CSF nachgewiesen werden, wobei nach 6 h und 12 h post-infectionem die deutlichste Verstärkung des Signals zu verzeichnen war. Bereits 24 h nach der Infektion war das Signal rückläufig, 48 h nach der Stimulation entsprach der mRNA-Gehalt dem unstimulierter Mäuselungen. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Gesamtverteilung der mRNA in den verschiedenen Ansätzen wurde eine zeitgleiche PCR mit spezifischen Primern der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GADPH) durchgeführt. Das Enzym eignet sich für diesen Zweck, da es in nahezu allen Geweben konstitutiv hoch exprimiert wird.



**Abbildung 5-1: Die Zunahme der GM-CSF-Expression in Mäuselungen nach *S. pneumoniae*-Infektion**

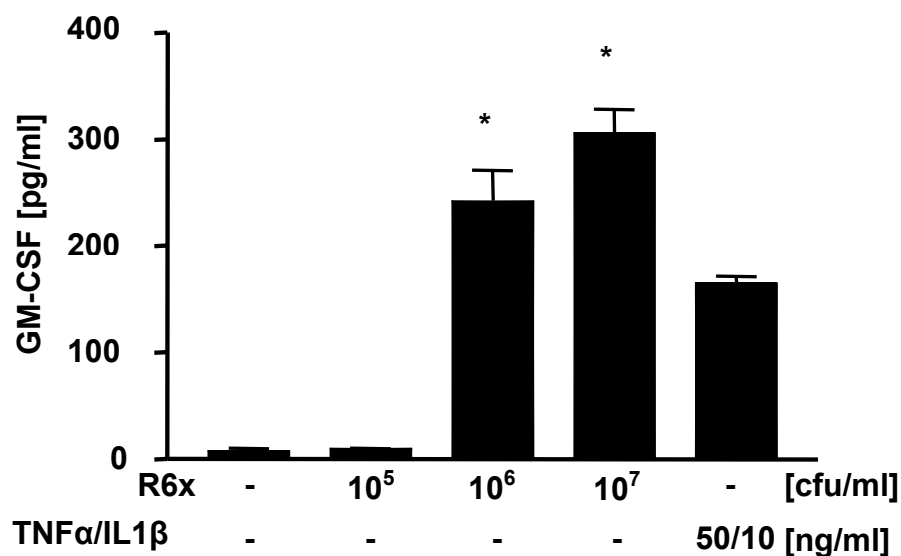
Die Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* für 6, 12, 24 und 48 h infiziert. Daraufhin wurden die Lungen explantiert, homogenisiert und die Gesamt-RNA isoliert. Mittels der RT-PCR für das Zytokin GM-CSF konnte eine zeitabhängige Zunahme der Expression nachgewiesen werden. Die hier gezeigte RT-PCR ist eine repräsentative Abbildung von insgesamt drei unabhängig voneinander angesetzten Stimulationen und daraus resultierenden RT-PCR-Ansätzen. Zur Kontrolle der gleichen Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA wurde die GAPDH bestimmt.

## **5.2 *S. pneumoniae* induziert die Expression von GM-CSF in humanen Bronchialepithelzellen *in vitro***

Allerdings können die unter Kap. 5.1 aufgeführten Ergebnisse nicht auf einen einzelnen Zelltyp zurückgeführt werden. Interessant war deshalb die Untersuchung der Reaktion von humanen Bronchialepithelzellen auf Pneumokokken, um den Ursprung der erhöhten GM-CSF-Expression zu spezifizieren. Die Bronchialepithelzellen stellen die erste Barriere gegen eindringende Pathogene, wie Pneumokokken, dar, die den menschlichen Organismus u. a. über die Atemwege infizieren. Darüber hinaus ist über die Funktion dieser Zellen in der angeborenen Immunität noch wenig bekannt. So könnte die pneumokokkenstimulierte Expression proinflammatorischer Zytokine im tracheobronchialen Epithel zur Einwanderung von Leukozyten signifikant beitragen.

Aus diesem Grund wurde *S. pneumoniae* auf die Fähigkeit hin untersucht, in der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B die Bildung des proinflammatorischen Zytokins GM-CSF zu induzieren. Dazu wurden BEAS-2B-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen der unbekapselten Pneumokokkenmutante R6x infiziert. Für TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ist eine Aktivierung der GM-CSF-Freisetzung bereits nachgewiesen worden (Shearer *et al.*, 2003), weshalb diese Zytokine als Positivkontrolle verwendet wurden. Nach einer Inkubationszeit von 15 h wurden die Konzentrationen von GM-CSF mittels ELISA in den Zellüberständen ermittelt.

Die Abbildung 5-2 zeigt eine dosisabhängige GM-CSF-Sekretion der BEAS-2B-Zellen nach Pneumokokkenstimulation. Außerdem erwies sich die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Freisetzung mindestens als ebenso effektiv wie die Stimulation der BEAS-2B-Zellen mit TNF $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml).



**Abbildung 5-2: Die Induktion von GM-CSF in BEAS-2B-Zellen durch *S. pneumoniae***

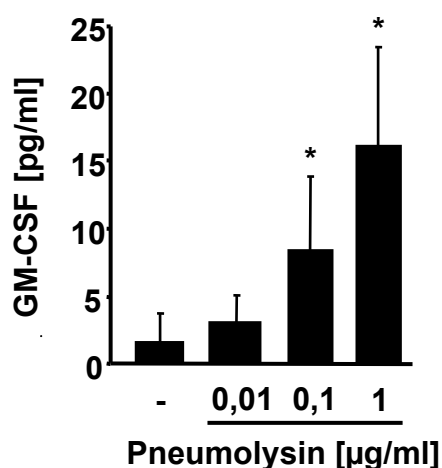
BEAS-2B-Zellen wurden über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen von R6x oder TNF $\alpha$ / IL-1 $\beta$  stimuliert. Am folgenden Tag wurden die GM-CSF-Konzentrationen in den Zellüberständen mit Hilfe eines GM-CSF-ELISA ermittelt. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (-) sind gekennzeichnet (\*).

### **5.3 Pneumolysin induziert die Expression von GM-CSF in humanen Bronchialepithelzellen *in vitro***

Das Toxin Pneumolysin trägt wesentlich zur Pathogenität von *S. pneumoniae* bei. So ist eine Interaktion des Toxins mit dem humanen Immunsystem, beispielsweise durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Houldsworth *et al.*, 1994), bereits beschrieben. Hier sollte untersucht werden, ob Pneumolysin auch die Freisetzung von GM-CSF in humanen Bronchialepithelzellen induzieren kann.

Dazu wurden BEAS-2B-Zellen für 15 h mit rekombinantem Pneumolysin stimuliert. Am Folgetag wurde die GM-CSF-Konzentration in den Zellüberständen mithilfe eines ELISA ermittelt.

Wie die Abbildung 5-3 erkennen lässt, induziert Pneumolysin die GM-CSF-Freisetzung dosisabhängig. Eine Konzentration von 0,01 µg/ml reichte dabei noch nicht aus, um die Produktion des Wachstumsfaktors zu aktivieren. Erst ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ließ sich eine signifikante Steigerung nachweisen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Pneumokokken selbst, sondern auch Pneumolysin als ein entscheidender Virulenzfaktor des Keims zur Induktion von GM-CSF fähig sind. Um eine Kontamination des Toxins mit Lipopolysaccharid auszuschließen, wurde ein Polymyxin-Test und ein Limolus-Test (durch Mikrobiologie) durchgeführt (Daten nicht aufgeführt).



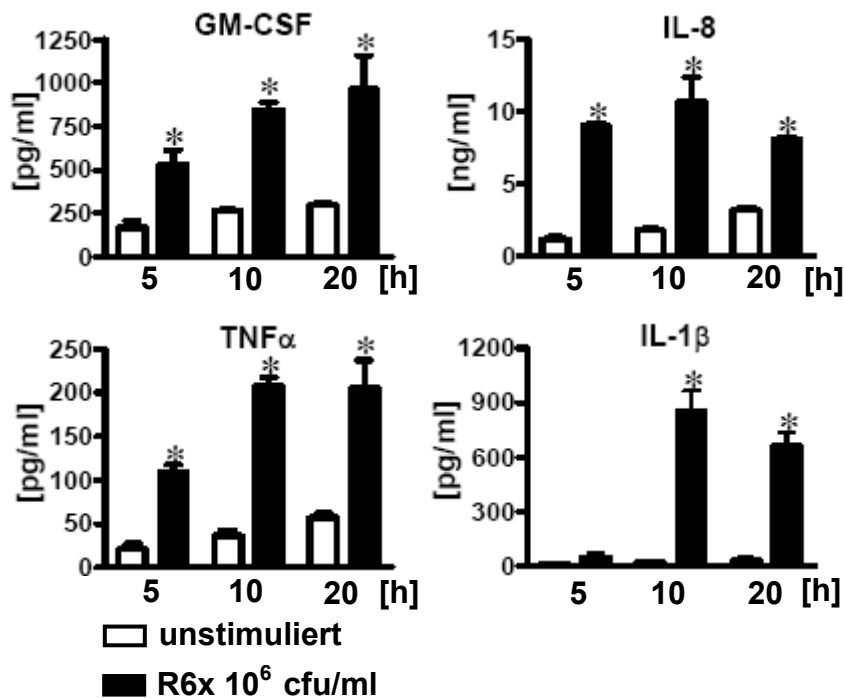
**Abbildung 5-3: Die Induktion von GM-CSF in BEAS-2B-Zellen durch Pneumolysin**

BEAS-2B-Zellen wurden für 15 h mit verschiedenen Konzentrationen von Pneumolysin stimuliert. Am folgenden Tag wurde die GM-CSF-Konzentration in den Zellüberständen mit Hilfe eines ELISA ermittelt. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (-) sind gekennzeichnet (\*).



#### **5.4 *S. pneumoniae* induziert proinflammatorische Zytokine zeitabhängig in humanen Bronchialepithelzellen *in vitro***

Im Folgenden wurde geprüft, ob Pneumokokken auch die Produktion anderer wichtiger Zyto- und Chemokine induzieren können. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Zeitabhängigkeit der Zytokinfreisetzung gerichtet. Untersucht wurde im Speziellen das stark chemotaktisch wirkende Chemokin IL-8, sowie wichtige regulatorischen Zytokine: TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ . Zusätzlich sollte die Zeitabhängigkeit der GM-CSF-Induktion nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x ( $10^6$  cfu/ml) für 5, 10 und 20 h infiziert. Die Konzentration der angegebenen Zyto- und Chemokine wurde nach Ablauf der Inkubationszeit mittels Bio-Plex™ Cytokine Assay in den Zellüberständen gemessen. Für alle untersuchten Mediatoren konnte eine zeitabhängige Induktion durch *S. pneumoniae* nachgewiesen werden. Dabei stieg die Konzentration von GM-CSF und TNF $\alpha$  in den Zellüberständen mit zunehmender Stimulationszeit kontinuierlich an. Dagegen erreichte die IL-8-Freisetzung bei ca. 10 h ein Maximum und fiel bei 20 h wieder unter die Konzentration der bei fünfstündiger Stimulation erzielten Werte ab. Für IL-1 $\beta$  war erst nach zehnstündiger Inkubationszeit eine Induktion durch *S. pneumoniae* nachweisbar, die Konzentration in den Überständen nach fünfstündiger Stimulation zeigte keine signifikante Steigerung gegenüber unstimulierten Proben.



**Abbildung 5-4:** *S. pneumoniae* induziert die Freisetzung verschiedener Zytokine in humanen Bronchialepithelzellen

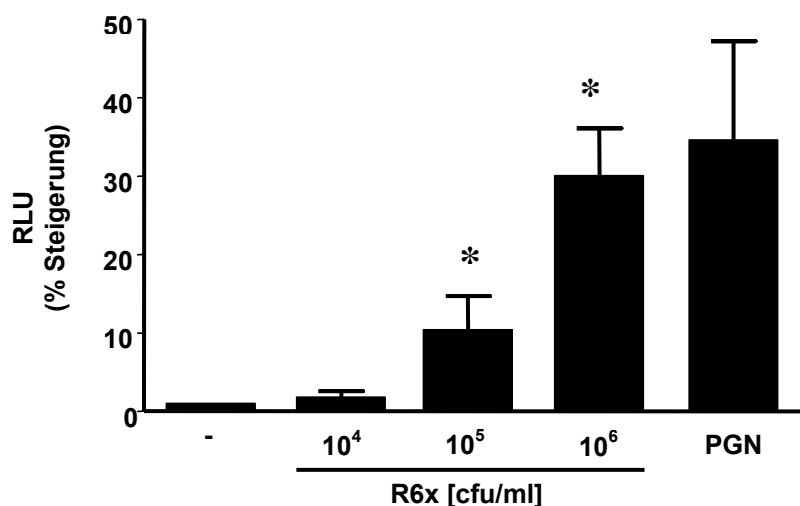
BEAS-2B-Zellen wurden für 5, 10 und 20 h mit  $10^6$  cfu/ml R6x stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellüberstände abgenommen und die Konzentration von GM-CSF, IL-8, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  mithilfe des Bio-Plex™ Cytokine Assay bestimmt. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (unstimuliert) sind gekennzeichnet (\*).

### 5.5 Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Expression wird über TLR-2, die pneumolysininduzierte GM-CSF-Expression über TLR-4 vermittelt

Die Erkennung der Pneumokokken durch Rezeptoren der angeborenen Immunität erweist sich als sehr vielschichtig und ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Erreger selbst exprimiert bestimmte Pathogen-assoziierte molekulare Muster, für welche bereits eine Erkennung durch TLR-2 nachgewiesen wurde. Im Folgenden sollte dieser Sachverhalt zunächst für humane Lungenepithelzellen nachvollzogen werden. Dazu wurde ein NF- $\kappa$ B-Reporterassay durchgeführt. Da sich die Transfektionseffizienz der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B als zu gering herausstellte, wurden stattdessen embryonale Nierenzellen (HEK293) für die Versuchsdurchführung ausgewählt, da diese Zellen mit hoher Effizienz transfiziert

werden können. Da sie allerdings kein TLR-2 exprimieren, wurden sie transient mit jeweils 0,1 µg des *h*TLR2-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,2 µg eines NF-κB-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids und eines β-Galaktosidase-Konstrukts, mittels Calciumphosphatmethode kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x in ansteigenden Konzentrationen bzw. mit Peptidoglykan (1 µg/ml) stimuliert. Die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten der Zellysate wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h mittels eines Chemilumineszenz-Meßgerätes bestimmt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken die Transkription des NF-κB-abhängigen Reportergens dosisabhängig induzieren. Eine Infektionsdosis von 10<sup>5</sup> cfu/ml war dabei mindestens notwendig, um eine deutliche Aktivierung des NF-κB-abhängigen Luciferase-Reportergens hervorzurufen. Zudem stellte sich die Infektion mit 10<sup>6</sup> cfu/ml *S. pneumoniae* als ebenso effektiv heraus wie eine Stimulation mit Peptidoglykan (1 µg/ml). Entscheidend war dabei die Expression von TLR-2, wodurch die Induktion der Luciferase-Aktivitäten durch *S. pneumoniae* erst möglich wurde.



**Abbildung 5-5: Die dosisabhängige Induktion der NF-κB-Transkriptionsaktivität durch *S. pneumoniae***

HEK293-Zellen wurden transient mit jeweils 0,1 µg des *h*TLR2-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,2 µg eines NF-κB-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids und eines β-Galaktosidase-Konstrukts, mittels Calciumphosphatmethode kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen des Pneumokokkenstammes R6x bzw. mit Peptidoglykan (1µg/ml) stimuliert. Die Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivitäten der Zellysate wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h bestimmt. Relative Luciferase-

Aktivitäten (RLU) ergaben sich aus der Berechnung des Quotienten aus NF- $\kappa$ B-Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (-) sind gekennzeichnet (\*).

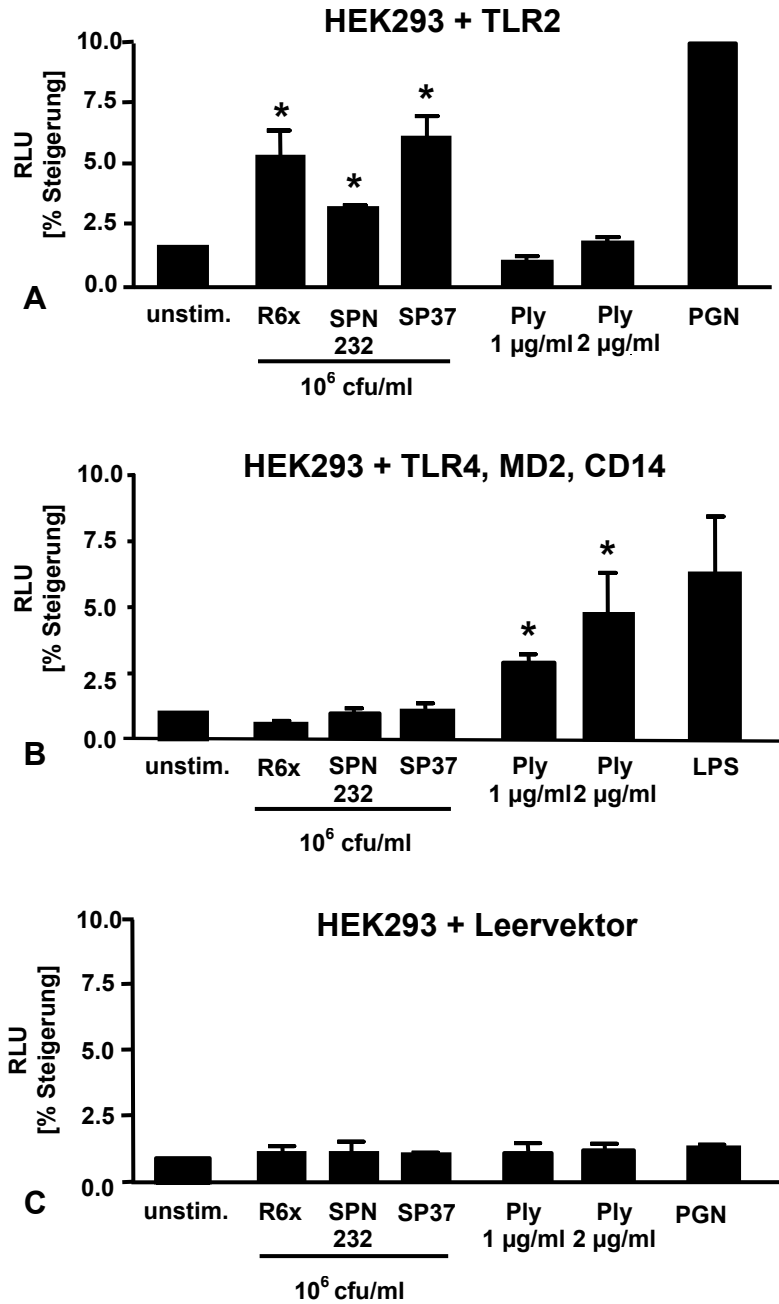
Dieses Ergebnis veranschaulicht die Bedeutung der Pneumokokken als TLR-2-abhängige Stimulanzen in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit der Induktion einer Immunreaktion des Organismus gegen den eindringenden Erreger.

Als nächstes wurde anhand von TLR-Überexpressionsversuchen geprüft, ob Pneumolysin TLR-4-abhängig ebenfalls eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B bewirken kann. Dazu wurden HEK293-Zellen zunächst transient mit jeweils 0,1  $\mu$ g des *h*TLR2-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,05  $\mu$ g eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids und eines  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukts, mittels Calciumphosphatmethode kotransfiziert (Abb. 5-6 A). Am Folgetag erfolgte die Stimulation mit den pneumolysinpositiven Pneumokokkenstämmen R6x, SPN232 und SP37 (jeweils  $10^6$  cfu/ml) und Pneumolysin (1 und 2  $\mu$ g/ml). In diesem Versuch diente Peptidoglykan (1  $\mu$ g/ml), als bekanntes TLR-2-Stimulans, als Positivkontrolle. Die Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Zelllysate wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h bestimmt. Wie die Abbildung 5-6A zeigt, werden die Pneumokokkenstämme durch TLR-2 erkannt und verstärken die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität signifikant. Eine besonders starke Aktivierung von NF- $\kappa$ B war dabei durch die Stimulation mit der unbekapselten Pneumokokkenmutante R6x, sowie mit der stark adhärenenten, invasiven und dabei wenig bekapselten Variante SP37 zu verzeichnen. Der kapsellose, stark adhärenente Stamm SPN232 verstärkte die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität in weitaus geringerem Maße. Dagegen löst Pneumolysin in keiner der verwendeten Konzentrationen eine NF- $\kappa$ B-Aktivierung aus, die gemessenen Luciferaseaktivitäten entsprechen denen der unstimulierten Proben.

Dann wurden HEK293-Zellen transient mit jeweils 0,001  $\mu$ g eines *h*TLR4-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,001  $\mu$ g eines MD2- und eines CD14-kodierenden Plasmids, kotransfiziert (Abb. 5-6B). Das NF- $\kappa$ B-abhängige Luciferase-Reporter-Plasmid und das  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukt wurden, wie unter (A) beschrieben, eingesetzt. Die Stimulation und die Messung der Luciferaseaktivitäten erfolgten wie unter (A) beschrieben, mit dem Unterschied, dass als Positivkontrolle das bekannte TLR-4-Stimulans Lipopolysaccharid (200 ng/ml) verwendet wurde. Hier wurde deutlich, dass Pneumolysin durch TLR-4 erkannt wird und die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität dosisabhängig induziert. Bereits 1  $\mu$ g/ml Pneumolysin

reichten aus, um das Signal gegenüber den unstimulierten Proben zu verdreifachen. Obwohl alle eingesetzten Pneumokokkenstämme Pneumolysin produzieren, konnte durch keinen Stamm eine Erhöhung der Luciferaseaktivitäten erzeugt werden.

HEK293-Zellen wurden zuletzt mit einem Leervektor (mock), zusammen mit einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmid und einem  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukt, kotransfiziert (Abb. 5-6C). Die Stimulation und Luciferasemessung erfolgte wie unter (A) beschrieben. Durch die Transfektion eines Leervektors anstelle eines TLR-2- oder TLR-4-kodierenden Plasmids fehlen die *Toll-like* Rezeptoren auf der Oberfläche der HEK293-Zellen. Daraus resultiert, dass weder Pneumokokken noch Pneumolysin eine Induktion der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität auslösen können.



**Abbildung 5-6: Die dosisabhängige Induktion der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität durch Pneumolysin ist *h*TLR4-abhängig**

Abbildung A: HEK293-Zellen wurden transient mit jeweils 0,1  $\mu$ g des *h*TLR2-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,05  $\mu$ g eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids und eines  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukts, mittels Calciumphosphatmethode kotransfiziert.

Abbildung B: HEK293-Zellen wurden transient mit jeweils 0,001  $\mu$ g eines *h*TLR4-kodierenden Vektors, zusammen mit je 0,001  $\mu$ g eines MD2- und eines CD14-kodierenden Plasmids, kotransfiziert. Das NF- $\kappa$ B-abhängige Luciferase-Reporter-Plasmid und das  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukt wurden, wie unter (A) beschrieben, eingesetzt.

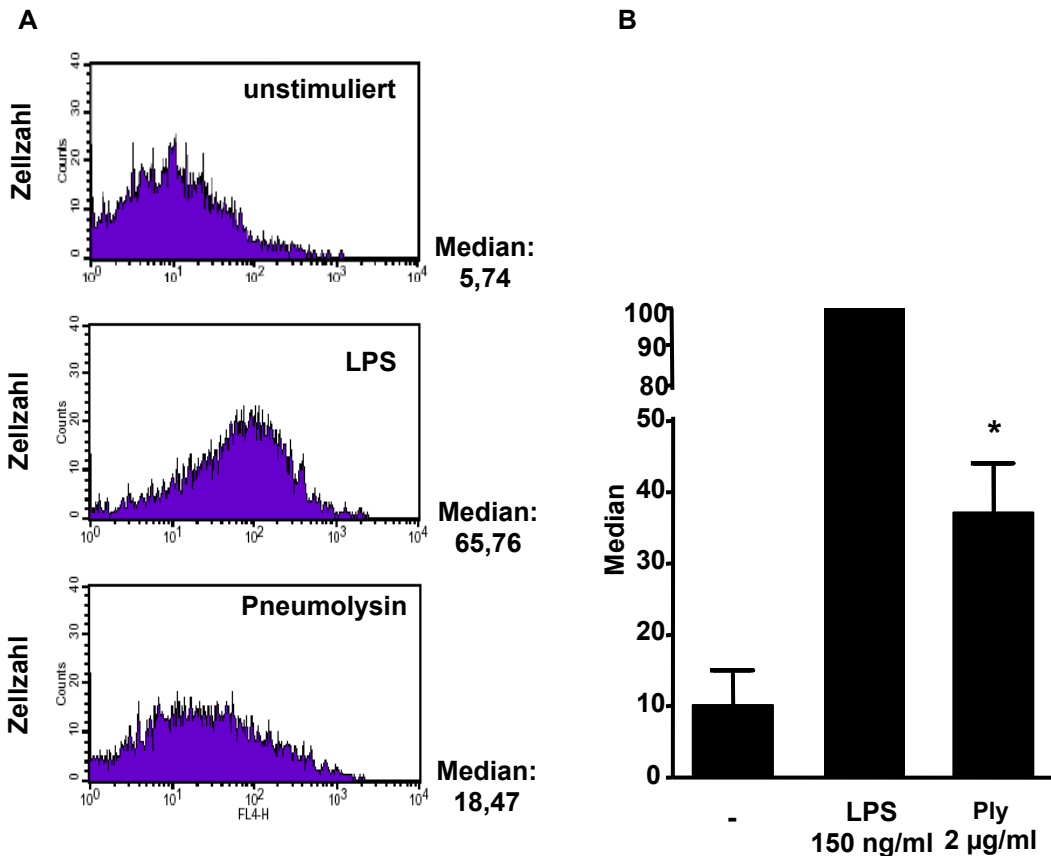
Abbildung C: HEK293-Zellen wurden mit einem Leervektor (mock), zusammen mit einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmid und einem  $\beta$ -Galaktosidase-Konstrukt, kotransfiziert.

Zu A, B, C: 24 h post-transfectionem wurden die Zellen mit den Pneumokokkenstämmen R6x, SPN 232 und SP37 in angegebener Konzentration infiziert. Als Positivkontrolle wurden Peptidoglykan (1 µg/ml) (A, C) sowie LPS (200 ng/ml) benützt.

Die Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten der Zelllysate wurden nach einer Inkubationszeit von 6 h bestimmt. Relative Luciferase-Aktivitäten (RLU) ergaben sich aus der Berechnung des Quotienten aus NF- $\kappa$ B-Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitäten. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (unstim.) sind gekennzeichnet (\*).

Diese Ergebnisse sollten anhand eines Experimentes mit der TLR-2-negativen Zelllinie CHO-3E10 überprüft werden. Die eingesetzten Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (engl.: Chinese hamster ovary cells, CHO) enthalten ein NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid, das bei NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Expression von CD25 auf der Zelloberfläche führt. Außerdem verfügen die Zellen über ein stabil transfiziertes Plasmid zur CD14-, sowie zur TLR-4-Expression.

Konfluente CHO-3E10-Zellen wurden mit Pneumolysin (2 µg/ml) und LPS (150 ng/ml) für jeweils 18 h inkubiert. Anschließend wurde die quantitative Änderung der Expression von Oberflächenmolekülen mithilfe der FACS-Analyse ermittelt. Zur Unterscheidung der Oberflächenmoleküle wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper (CD25/APC, ISO/APC) verwendet. Anhand der Verteilung der CD25-positiven Zellen in Flusszytogramm (Abbildung 5-7A) lässt sich erkennen, dass sowohl LPS als auch Pneumolysin in TLR-4-positiven CHO-3E10-Zellen zu einer Induktion der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität mit dem Resultat der CD25-Expression auf der Zelloberfläche führen. Dabei verursachte Pneumolysin eine signifikante Rechtsverschiebung des Kurvenmaximums, wobei der Effekt von LPS allerdings nicht erreicht wurde. Die Auftragung der Mediane dieser Flusszytogramme in einem Diagramm verdeutlicht diesen Sachverhalt (Abbildung 5-7B).



**Abbildung 5-7: Pneumolysin stimuliert die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über *h*TLR-4-Rezeptoren**

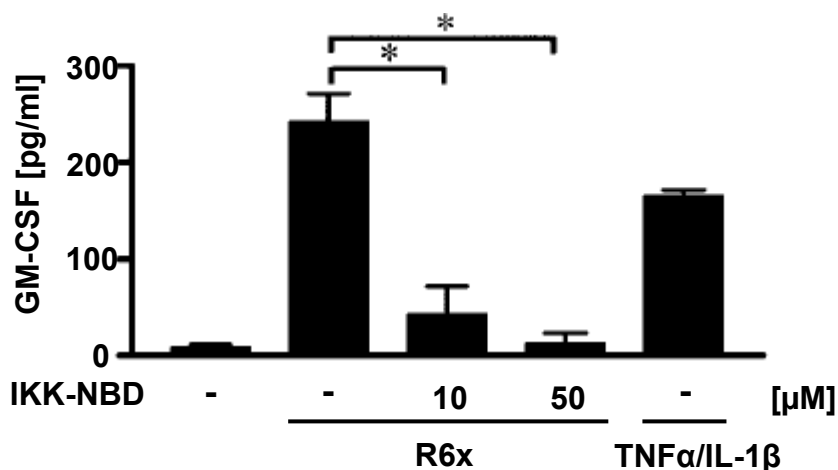
CHO(Chinese hamster ovary cells)-Zellen wurden stimuliert mit LPS (150 ng/ml) bzw. Pneumolysin (2  $\mu$ g/ml). Diese Zellen enthalten ein NF- $\kappa$ B-Reporterplasmid, das bei NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Expression von CD25 auf der Zelloberfläche führt. Außerdem beinhalten die Zellen ein Plasmid zur CD14-, sowie zur TLR-4-Expression. Nach einer Inkubationszeit von 18 h wurde die quantitative Änderung der Expression von Oberflächenmolekülen mithilfe der FACS-Analyse ermittelt. Zur Unterscheidung der Oberflächenmoleküle wurden fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper (CD25/APC, ISO/APC) verwendet. Die Abbildung A zeigt die Verteilung der CD25-positiven Zellen bei LPS- bzw. Pneumolysinstimulation, sie repräsentiert drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente. Die Abbildung B verdeutlicht die NF- $\kappa$ B-Aktivierung über TLR4, indem Mediane der einzelnen Stimulationen miteinander verglichen wurden. Zur besseren Veranschaulichung wurde der absolute Wert von LPS mit 100% gleichgesetzt und die übrigen Werte als relative Werte aufgetragen. Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (-) sind gekennzeichnet (\*).



## 5.6 Die Bedeutung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Weges

Daraufhin wurde die Bedeutung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes, dem zentralen Kinasekomplex im kanonischen NF- $\kappa$ B-Weg, für die pneumokokkenabhängige Gentranskription von GM-CSF in humanen Bronchialepithelzellen analysiert. Zu diesem Zweck wurden BEAS-2B-Zellen vor der Stimulation 2 Stunden mit 10 und 50  $\mu$ M des spezifischen I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitors (IKK-NBD) vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Stimulation für 15 h mit der unbekapselten Pneumokokkenmutante R6x ( $10^7$  cfu/ml) bzw. mit TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$  (50 ng/10 ng) als Positivkontrolle. Die GM-CSF-Konzentrationen in den Zellüberständen wurden mittels ELISA bestimmt.

Die Abbildung 5-8 zeigt eine dosisabhängige signifikante Verminderung der GM-CSF-Ausschüttung durch den eingesetzten Inhibitor IKK-NBD. Bereits bei einer Inhibitorkonzentration von 10  $\mu$ M wurde die GM-CSF-Sekretion um den Faktor 6 vermindert. Eine höhere gewählte Konzentration von IKK-NBD (50  $\mu$ M) resultierte in einer Reduktion der GM-CSF-Konzentration in den Überständen, die der unstimulierten Proben entsprach.



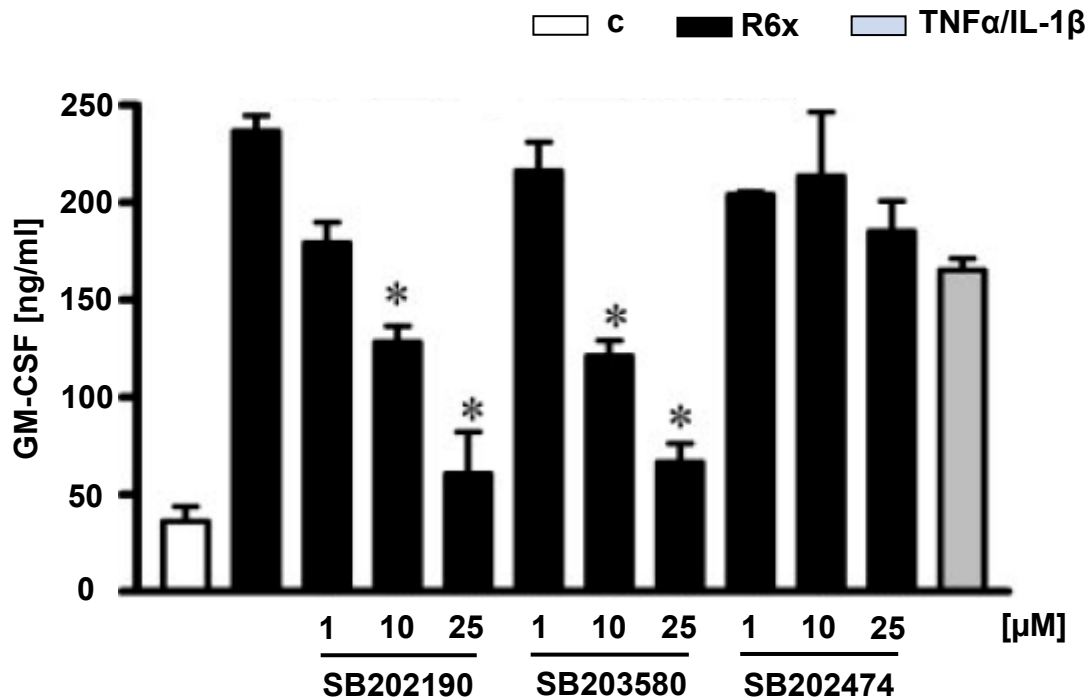
**Abbildung 5-8: Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Freisetzung in bronchialen Epithelzellen ist IKK-abhängig**

BEAS-2B-Zellen wurden vor der Stimulation 2 h mit dem spezifischen I $\kappa$ B-Kinase-Inhibitor IKK-NBD in den angegebenen Konzentrationen vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Stimulation für 15 h mit dem Pneumokokkenstamm R6x ( $10^7$  cfu/ml) bzw. mit TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$ (50 ng/10 ng) als Positivkontrolle. Die GM-CSF-Konzentrationen in den Zellüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. Der abgebildete Graph zeigt die

Vereinigung von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktionen der GM-CSF-Sekretion gegenüber der ungehemmten Pneumokokkenstimulation sind gekennzeichnet (\*).

### **5.7 Die Inhibition der p38-MAP-Kinase blockiert die *S. pneumoniae*-induzierte GM-CSF-Expression in humanen Bronchialepithelzellen**

Die p38-MAP-Kinase ist an der Regulation proinflammatorischer Zytokine beteiligt. Um die Bedeutung der p38-MAPK-Aktivierung für die GM-CSF-Expression zu überprüfen, wurden die spezifischen chemischen p38-MAPK-Inhibitoren SB202190 und SB203580, sowie ein nicht aktives Homolog SB202474 verwendet. Dazu wurden BEAS-2B-Zellen 20 min vor der Pneumokokkenstimulation mit den chemischen Inhibitoren bzw. mit der nicht aktiven Kontrollkomponente in ansteigenden Konzentrationen (je 1, 10, 25  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 15 h mit R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert und danach die Konzentration von GM-CSF in den Zellüberständen mittels ELISA bestimmt. Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Freisetzung übersteigt die Sekretion, welche durch TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$  ausgelöst wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der p38-MAP-Kinase in Bronchialepithelzellen die GM-CSF-Freisetzung signifikant verminderte, wobei eine Dosisabhängigkeit zu verzeichnen war. Das nicht aktive Homologe löste keine Reaktion aus.



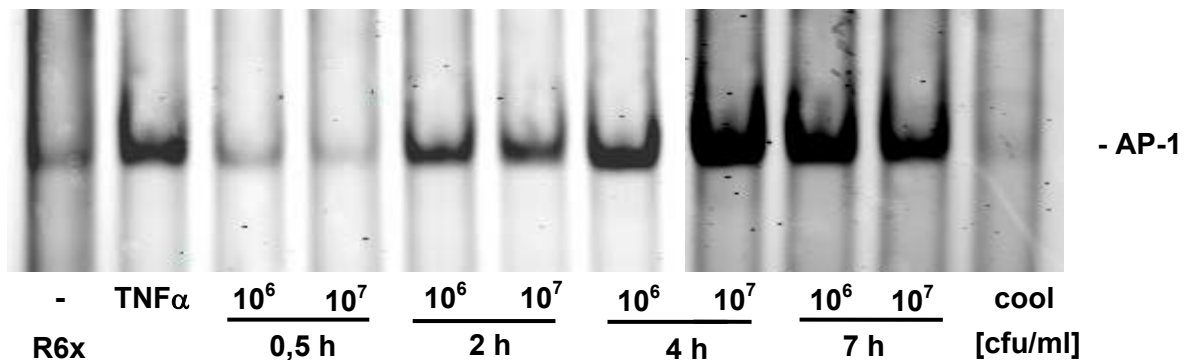
**Abbildung 5-9: Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Expression wird durch p38 MAPK-inhibition blockiert**

BEAS-2B-zellen wurden 20 min vor der Stimulation mit *S. pneumoniae* mit den spezifischen p38-MAPK-Inhibitoren SB202190, SB203580 oder der nichtaktiven Kontrollkomponente SB202474 vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für 15 h mit R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert bzw. mit TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$  stimuliert. Die Konzentration von GM-CSF in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktionen der GM-CSF-Sekretion gegenüber der ungehemmten Pneumokokkenstimulation sind gekennzeichnet (\*). Zu sehen sind Mittelwerte und Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten.

## 5.8 *S. pneumoniae* aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1 in humanen Bronchialepithelzellen

Neben NF- $\kappa$ B spielt auch der Transkriptionsfaktor AP-1 eine Rolle in der Regulation der Immunantwort (Hess *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob auch *S. pneumoniae* eine Aktivierung von AP-1 in humanen Bronchialepithelzellen bewirken kann. Dazu wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x in angegebenen Konzentrationen für 0,5, 2, 4, und 7 h inkubiert. Das Kernprotein wurde durch fraktionierte Proteingewinnung extrahiert und im EMSA mit spezifischen IRDye700-gelabelten AP-1-Oligonukleotiden detektiert.

Wie die Abbildung 5-10 zeigt, induziert *S. pneumoniae* die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors zeitabhängig. Während eine 30-minütige Inkubation mit dem Erreger noch nicht für eine signifikante AP-1-Induktion ausreichte, konnte eine Erhöhung der DNA-bindenden Proteine im Kernextrakt 2, 4 und 7 h postinfectionem nachgewiesen werden. Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors nach 4-stündiger Infektion mit Pneumokokken erwies sich als ebenso hoch, wie nach einstündiger TNF $\alpha$ -Stimulation (10 ng/ml). Außerdem konnte gezeigt werden, dass bereits eine Dosis von 10<sup>6</sup> cfu/ml des Pneumokokkenstammes R6x für die AP-1-Induktion ausreichte.



**Abbildung 5-10: Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch *S. pneumoniae* in BEAS-2B-Zellen**

BEAS-2B-Zellen wurden mit *S. pneumoniae* R6x in angegebenen Konzentrationen für 0,5, 2, 4, und 7 h inkubiert. Daraufhin wurde das Kernprotein durch fraktionierte Proteingewinnung gewonnen und im EMSA mit spezifischen IRDye700-gelabelten AP-1-Oligonukleotiden detektiert. Das abgebildete Gel zeigt ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

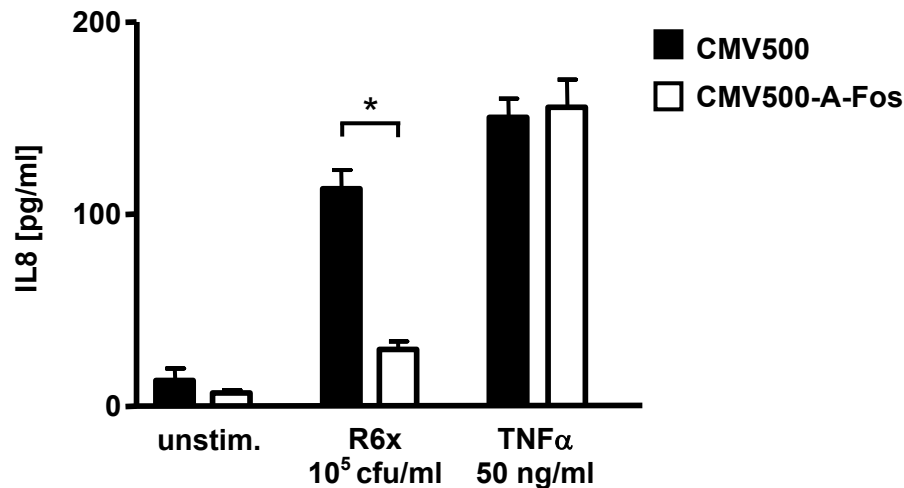
### 5.9 Die durch *S. pneumoniae* induzierte IL-8-Expression ist AP-1-abhängig

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung von AP-1 an der Regulation der Immunantwort auf eine Infektion mit *S. pneumoniae* nachzuweisen, besteht in der Durchführung von A-Fos-Überexpressionsexperimenten. Das dominant-negative Fos-Protein A (acidic extension)-Fos inhibiert die sequenzspezifische DNA-Bindung von AP-1 durch Konkurrenz mit intakten Fos-Proteinen.

Wie bereits unter Kap. 5.4 nachgewiesen, sezernieren Bronchialepithelzellen nach der Stimulation mit Pneumokokken verschiedene Zyto- und Chemokine und greifen dadurch entscheidend in die Regulation der Immunantwort ein. Das stark chemotaktisch wirkende Chemokin IL-8 ist ein solcher pneumokokkeninduzierter Mediator und soll wegen seiner zentralen Bedeutung in der Steuerung der Immunreaktion hier besonders untersucht werden.

Zunächst wurden HEK293-Zellen mit jeweils 0,1 µg eines TLR-2-kodierenden Plasmids, sowie mit einem dominant-negativen Plasmid für A-Fos (CMV500-A-Fos) bzw. dem entsprechenden Leervektor CMV500 kotransfiziert. Am Folgetag wurden die Zellen für 15 h mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^5$  cfu/ml) infiziert oder mit TNFα (10 ng/ml) stimuliert. Die IL-8-Konzentration in den Zellüberständen wurde mittels ELISA bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass dominant-negatives A-Fos die pneumokokkeninduzierte IL-8-Sekretion deutlich reduzierte. Auf die TNFα-vermittelte IL-8-Freisetzung hatte A-Fos dagegen keinen blockierenden Effekt.



**Abbildung 5-11: Die Induktion der IL-8-Freisetzung durch *S. pneumoniae* ist AP-1-abhängig**

Alle verwendeten HEK293-Zellen wurden mit jeweils 0,1 µg eines hTLR2-kodierenden Plasmids mittels Superfect® transfiziert. Die schwarzen Balken der Abbildung beziehen sich auf Zellen, die zusätzlich mit einem dominant-negativen Plasmid für c-Fos (CMV500-A-Fos) kotransfiziert wurden. Die weißen Balken repräsentieren Ergebnisse, die durch eine Transfektion mit dem Leervektor CMV500 erhalten wurden. Am Folgetag wurden die Zellen für 15 h mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^5$  cfu/ml) infiziert bzw. mit TNFα (10 ng/ml) stimuliert. Die IL-8-Konzentration in den Zellüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Zu sehen sind Mittelwerte und

Mittelwertabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Kontrolle (unstim.) sind gekennzeichnet (\*).

## 6 Diskussion

Die Pneumokokkenpneumonie ist durch eine massive Leukozyteninfiltration gekennzeichnet (Wang *et al.*, 2001). Wichtig für die Steuerung dieser Leukozyteninvasion ist die Freisetzung proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine. Dem Bronchialepithel kommt in Bezug auf diese Zytokinfreisetzung und der damit einhergehenden Feinregulation der Immunantwort auf eindringende Pneumokokken eine zentrale Bedeutung zu. Daher wurden die durch *S. pneumoniae*-induzierte Zytokinfreisetzung und die dadurch aktivierten Signaltransduktionswege untersucht.

### 6.1 *S. pneumoniae* induziert die Sekretion proinflammatorischer Zytokine

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass *S. pneumoniae*, als häufigster Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (Huntemann und Lorenz, 2004), die Freisetzung von GM-CSF durch Lungengewebe induzieren kann. Zunächst konnte gezeigt werden, dass es während der Induktion einer Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell zu einer zeitabhängigen Verstärkung der mRNA-Expression von GM-CSF in den Mäuselungen kommt. Diese gesteigerte mRNA-Expression war insbesondere 6 und 12 h post-stimulationem ersichtlich, 48 h nach der Stimulation war sie dagegen nicht mehr nachweisbar. Da in diesem Experiment nicht ein bestimmter Zelltypus, sondern das gesamte Lungengewebe untersucht wurde, ist es nicht möglich, die Herkunft des GM-CSF zu spezifizieren. Interessant war deshalb die Untersuchung der Reaktion von humanen Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) auf Pneumokokken, um den Ursprung der erhöhten GM-CSF-Expression zu analysieren. Bisher ist über die Funktion dieser Zellen in der angeborenen Immunität noch wenig bekannt. Zunächst ist es als Barriere und durch seine Ausstattung mit Mukozilien Teil des mechanischen Abwehrsystems der Atemwege (Bals *et al.*, 2004, Takizawa *et al.*, 1998). Außerdem ist es in der Lage, durch Freisetzung biologische aktiver Komponenten, wie der Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-8 (Strieter *et al.*, 2002), die Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität zu beeinflussen. Durch die Lokalisation des Bronchialepithels in unmittelbarer anatomischer und physiologischer Relation zu Endothel- und Alveolarzellen sowie Zellen des Interstitiums kann die parakrine

Freisetzung der Zytokine lokale Effekte hervorrufen, die die Leukozyteninfiltration und die Steigerung der Effektorfunktion der Immunzellen am Infektionsort unterstützen können (Marini *et al.*, 1992, Cromwell *et al.*, 1992). Somit hat das Bronchialepithel eine wichtige Bedeutung in der Abwehrreaktion des Organismus, indem es den Schutz der Atemwege und des Lungenparenchyms vor mikrobieller Kolonisation und Infektion vermittelt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B, welche die *Toll-like* Rezeptoren 1 - 6 exprimieren (May *et al.*, 2000), mit ansteigenden Konzentrationen der unbekapselten Pneumokokkenmutante R6x zu einer dosisabhängigen Steigerung der GM-CSF-Sekretion führt. Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Freisetzung erwies sich ab einer eingesetzten Pneumokokkenkonzentration von  $10^6$  cfu/ml als mindestens ebenso effektiv wie die Stimulation der BEAS-2B-Zellen mit TNF $\alpha$  (50 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). Diese Daten weisen darauf hin, dass dem Epithel, neben seiner Rolle als mechanische Barriere, durch die Erkennung eindringender Keime und die daraus resultierende Zytokinaktivierung eine wichtige „Wächter“-Funktion zukommt.

Die Fähigkeit der GM-CSF-Freisetzung durch Zellen des Bronchialepithels wurde bereits nachgewiesen (Abdelaziz *et al.*, 1995, Bayram *et al.*, 1998, Jagels *et al.*, 1999, Lee *et al.*, 2005). Allerdings sind neben Bronchialepithelzellen auch andere Lungenzelltypen in der Lage, GM-CSF zu produzieren. Dazu zählen u. a. Alveolarmakrophagen (Tazi *et al.*, 1991), pulmonale Endothelzellen (Burg *et al.*, 2002), Lungenfibroblasten (Koyama *et al.*, 1998) und Lungenepithelzellen (Ritter *et al.*, 2005). Es wird dadurch deutlich, dass das Bronchialepithel einen Teil eines komplizierten Netzwerks verschiedenster Zelltypen darstellt, welches inflammatorische und immunologische Reaktionen in und um die Atemwege moduliert. Eine signifikante Steigerung der GM-CSF-Freisetzung konnte für verschiedene Stimulanzen aufgezeigt werden. Zunächst zählen dazu Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-4, IL-13 (Lee *et al.*, 2005, Tazi *et al.*, 1991, Nakamura *et al.*, 1996) und verschiedene Noxen, wie Acetaldehyd, Ozon und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Machida *et al.*, 2003, Bosson *et al.*, 2003, Jany *et al.*, 1995). Ebenso können virale und bakterielle Produkte, wie virale dsRNA oder LPS, die GM-CSF-Sekretion induzieren (Ritter *et al.*, 2005, Tazi *et al.*, 1991). Darüber hinaus ist speziell für einige Erreger der bakteriellen Pneumonie die Induktion von GM-CSF bereits demonstriert worden. Paine *et al.* wiesen GM-CSF eine wesentliche Rolle in der inflammatorischen Antwort



auf *Pneumocystis carinii* durch Versuche am Mauspneumoniemodell zu (Paine *et al.* 2000). Im selben Modell bewiesen Magee *et al.* eine erhöhte GM-CSF-Konzentration im Plasma nach einer Infektion mit *Chlamydia trachomatis* (Magee *et al.*, 1991). An der humanen Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B gelang Slevogt *et al.* der Nachweis der zeit- und dosisabhängigen Freisetzung von GM-CSF nach der Stimulation der Zellen mit *Moraxella catarrhalis* (Slevogt *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung des Wachstumsfaktors in der Regulation der Immunantwort im Rahmen einer Pneumonie. In diesem Zusammenhang untersuchten Knapp *et al.* die Rolle von endogenem G-CSF in der Abwehr gegen die pneumokokkeninduzierte Pneumonie. Sie entdeckten eine erhöhte Konzentration von G-CSF in der bronchoalveolären Lavage von Patienten mit unilateraler Pneumokokkenpneumonie. Im Mauspneumoniemodell führte die Gabe eines anti-G-CSF-Antikörpers zu einer reduzierten Anzahl und verminderten Adhäsion von Neutrophilen im untersuchten Lungengewebe. Dadurch wird deutlich, dass G-CSF während der Pneumokokkenpneumonie lokal am Ort der Infektion produziert wird, und dort eine antiinflammatorische Wirkung besitzt (Knapp *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse werden bestätigt durch Versuche von Hebert *et al.* an splenektomierten Mäusen, welche ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Pneumokokkensepsis aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Therapie mit G-CSF bei diesen Mäusen die Funktion der Alveolarmakrophagen verstärkt und letztendlich das Überleben nach einer Pneumokokkeninfektion verbessern kann (Hebert *et al.*, 1990). Dem widersprechen zwei Studien an Patienten mit multilobulärer Pneumonie, wobei kein Nutzen einer G-CSF-Therapie zusätzlich zur antibiotischen Therapie aufgezeigt werden konnte (Nelson *et al.*, 2000, Root *et al.*, 2003).

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob auch der isolierte Virulenzfaktor Pneumolysin zu einer GM-CSF-Expression führt. Dadurch könnte die verstärkte pulmonale inflammatorische Antwort auf pneumolysinpositive Pneumokokkenstämme, charakterisiert durch einen exzessiven Neutrophileneinstrom in die Lunge, erklärbar werden (Kadioglu *et al.*, 2002). Zudem ist bekannt, dass pneumolysinnegative Stämme von *S. pneumoniae* weniger schwere Verlaufsformen der Sepsis auslösen als der Wildtyp (Kadioglu *et al.*, 2002). Die Bedeutung von Pneumolysin für die Pathogenität der Pneumokokken wurde in dieser Hinsicht schon mehrfach untersucht. Es ist bekannt, dass Pneumolysin selbst in der Lage ist,

proinflammatorische Mediatoren, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Houldsworth *et al.*, 1994) oder IL-8 (Fickl *et al.*, 2005, Cockeran *et al.*, 2002) zu induzieren und somit die Immunantwort auf den eindringenden Erreger zu verstärken. Allerdings wurden diese Experimente vornehmlich an Immunzellen, wie Blutmonozyten (Houldsworth *et al.*, 1994) oder neutrophilen Granulozyten (Cockeran *et al.*, 2002, Fickl *et al.*, 2005) durchgeführt. Aus diesem Grund war es interessant, die Wirkung von Pneumolysin auf humane Bronchialepithelzellen zu analysieren. An BEAS-2B-Zellen konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin die GM-CSF-Freisetzung dosisabhängig verstärkt und dadurch zusätzlich zu den Pneumokokken selbst, als ein entscheidender Virulenzfaktor des Keims, zur Induktion von GM-CSF fähig ist.

Das Lungengewebe steht in vielfältiger Wechselwirkung mit der Umgebung, und hat im Laufe der Evolution verschiedene Strategien entwickelt, um den Organismus vor über die Atemwege eindringenden Mikroorganismen zu schützen und so den Gasaustausch aufrechtzuerhalten. Dabei nehmen die Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität eine zentrale Stellung ein. Zu diesen Mechanismen zählt das Zytokinnetzwerk. Die Initiation der pulmonalen Infektabwehr, ihre Aufrechterhaltung, die Aktivierung der erworbenen Immunität und schließlich die Beendigung der inflammatorischen Reaktion sind abhängig von der zellulären Kommunikation durch Zytokine. Im Anschluss sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob durch Pneumokokken auch andere wichtige regulatorische Zytokine induzierbar sind und ob eine Zeitabhängigkeit einer eventuellen Induktion zugrunde liegt. Spezielles Augenmerk wurde dabei auf die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gerichtet. Beide beeinflussen die Immunantwort, indem sie beispielsweise die Produktion anderer inflammatorischer Mediatoren aktivieren oder die Leukozytenmigration stimulieren (Oppenheim *et al.*, 2001, Beutler *et al.*, 1989). Zusätzlich wurde der Effekt der Pneumokokken auf die IL-8-Sekretion überprüft. Das Chemokin IL-8 spielt eine wichtige Rolle in der Initiation und Aufrechterhaltung der Leukozytenmigration während der Inflammation der Lunge. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *S. pneumoniae* die untersuchten Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-8 und GM-CSF zeitabhängig in humanen Bronchialepithelzellen induziert. Dabei steigt die Konzentration von GM-CSF und TNF $\alpha$  in den Zellüberständen mit zunehmender Stimulationszeit kontinuierlich an, was auch hier ihre Bedeutung in der Frühphase („early response“) der Immunantwort unterstreicht. Dagegen erreicht die

IL-8-Freisetzung bei ca. 10 h ein Maximum und fällt bei 20 h wieder unter die Konzentration der bei fünfständiger Stimulation erzielten Werte ab. Für IL-1 $\beta$  ist erst nach 10-stündiger Inkubationszeit eine Induktion durch *S. pneumoniae* nachweisbar. Somit werden Mediatoren mit unterschiedlicher Funktion nach bestimmtem zeitlichen Muster vom Bronchialepithel freigesetzt, sodass auf eine aktive Teilnahme des Epithels an der Feinregulation der Immunantwort geschlossen werden kann.

Eine erhöhte Konzentration von IL-8 in der bronchoalveolären Lavage bei Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie wurde bereits durch Boutten *et al.* nachgewiesen (Boutten *et al.*, 1996). Für einige der bekannten Erreger der Pneumonie, wie *Hämophilus influenza* (Clemans *et al.*, 2000) und *Mycoplasma pneumoniae* (Sohn *et al.*, 2005) ist dabei speziell der Nachweis der IL-8-Induktion gelungen. Schmeck *et al.* konnten *in vitro* die gesteigerte IL-8-Sekretion durch Bronchialepithelzellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* nachweisen (Schmeck *et al.*, 2004). Verschiedene Studien spezifizieren darüber hinaus die Bedeutsamkeit einzelner Pneumokokkenbestandteile für die IL-8-Induktion. In der bronchoalveolären Lavage mit Pneumokokken infizierter Kaninchen führte die Stimulation mit Bestandteilen der Pneumokokkenzellwand zu hohen IL-8-Konzentrationen, wohingegen die Inokulation der Polysaccharidkapsel keine inflammatorische Reaktion auslöste. Durch  $\beta$ -Laktam-Antibiotika lysierte Pneumokokken steigerten ebenfalls die IL-8-Sekretion, was bedingt sein kann durch die freigesetzten Zellwandbestandteile und intrabakterielle Toxine, wie Pneumolysin (Tuomanen *et al.*, 1987, Cockeran *et al.*, 2002).

Auch die Bedeutung von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in der Pathophysiologie der Pneumonie war bisher Gegenstand diverser Studien. Im Mauspneumoniemodell wurde bereits für verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Mikroorganismen, wie *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Aspergillus fumigatus* oder *Streptococcus pneumoniae*, eine gesteigerte TNF-Expression nachgewiesen (Strieter *et al.*, 2002, Laichalk *et al.*, 1996, Brieland *et al.*, 1995). Fantuzzi *et al.* bewiesen an IL-1 $\beta$ -defizienten Mäusen, dass das Zytokin IL-1 $\beta$  an der Initiation der angeborenen Immunreaktion beteiligt ist und modifizierende Wirkung auf inflammatorische Kaskaden besitzt (Fantuzzi *et al.*, 1996). Jones *et al.* definierten TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  als sogenannte „early response“-Mediatoren, welche mit kurzer Latenzzeit nach dem Kontakt mit eindringenden Mikroorganismen freigesetzt werden. Mäuse mit

defizienten TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Rezeptoren sind im Falle einer Pneumokokkenpneumonie nur bedingt in der Lage, die Infektion abzuwehren, was deutlich wird durch eine verminderte Einwanderung von Immunzellen ins Lungengewebe (Jones *et al.*, 2005).

Während der akuten Phase der Immunreaktion steigt also die Konzentration von IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und GM-CSF im Lungengewebe an. Gon *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang den Konzentrationsverlauf dieser Mediatoren im Serum von betagten, an Pneumonie erkrankten Menschen, bzw. die Zytokinproduktion LPS-stimulierter peripherer Blutmonozyten betagter Spender und verglichen diese mit äquivalenten Proben junger Menschen. Interessanterweise konnte eine verminderte Zytokinproduktion in höherem Alter festgestellt werden, was unter Umständen zur reduzierten Funktion der Abwehrreaktion in dieser Altersgruppe beiträgt (Gon *et al.*, 1996). Dies könnte eine der Ursachen dafür sein, dass ein hohes Lebensalter zur Entwicklung einer ambulant erworbenen Pneumonie prädisponiert (Huntemann und Lorenz, 2004, Zimmermann *et al.*, 2005).

## **6.2 Die Rolle der *Toll-like* Rezeptoren in der Erkennung von *S. pneumoniae***

Wie verschiedene Studien nahe legen, ist die Erkennung der Pneumokokken durch Rezeptoren der angeborenen Immunität vielschichtiger, als bisher angenommen wurde. Die katagorische Einteilung dieser gram-positiven Keime unter reine TLR-2-Liganden scheint auf *S. pneumoniae* nicht zuzutreffen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass neben der Detektion von Pneumokokken durch TLR-2-Rezeptoren auch der Erkennung von Pneumolysin über TLR-4 eine wichtige Rolle zukommt.

Versuche mit anti-TLR-2-Antikörpern, mit unterschiedlichen TLR-2-negativen Zelllinien und mit Zellen von TLR-2-defizienten Mäusen identifizierten TLR-2 als den wesentlichen Rezeptor in der Erkennung gram-positiver Mikroorganismen (Yoshimura *et al.*, 1999, Lien *et al.*, 1999, Brightbill *et al.*, 1999, Ozinsky *et al.*, 2000, Takeuchi *et al.*, 2000). *S. pneumoniae* exprimiert bestimmte Pathogen-assoziierte molekulare Muster, wie Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, für welche bereits die Detektion durch TLR-2 nachgewiesen wurde (Schröder *et al.*, 2003, Yoshimura *et al.*, 1999, Schwandner *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse konnten hier anhand von TLR-2-Überexpressionsstudien an HEK293-Zellen bestätigt werden, welche weder TLR-2

noch TLR-4 exprimieren (Hornung *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass Pneumokokken die Transkription des NF- $\kappa$ B-abhängigen Reportergens in TLR-2-überexprimierenden Zellen dosisabhängig induzieren. Eine Infektionsdosis von  $10^5$  cfu/ml war dabei mindestens notwendig, um eine deutliche Aktivierung des NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reportergens hervorzurufen.

Ein wesentlicher Bestandteil der äußeren Membran gram-negativer Bakterien, Lipopolysaccharid, welches durch die Interaktion mit dem *Toll-like* Rezeptor 4 als prädominierender Mediator der inflammatorischen Antwort fungiert (Heine *et al.*, 1999, Takeuchi *et al.*, 1999, Arbour *et al.*, 2000, Tapping *et al.*, 2000), wird von Pneumokokken nicht exprimiert. Der präzise Mechanismus, durch welchen schwere gram-positive Infektionen, wie die Pneumokokkenseptikämie, die klinische Präsentation gram-negativer Endotoxinämie und deren Schockphänomene imitieren kann, ist bis heute nicht eindeutig geklärt.

Neben der TLR-2-abhängigen Erkennung der Pneumokokken durch das Immunsystem scheint auch ein von diesem Rezeptor unabhängiger Weg zu existieren. Koedel *et al.* fanden eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Sekretion durch Peritonealmakrophagen TLR-2-defizienter Mäuse nach einer Pneumokokkenstimulation (Koedel *et al.*, 2003). Damit übereinstimmend zeigten Yoshimura *et al.*, dass in Chinesischen Hamsterovarialzellen (CHO/CD14), welche kein TLR-2, aber TLR-4 exprimieren, auch ohne TLR-2-Überexpression durch die Stimulation mit *S. pneumoniae* eine leichte Aktivierung im Sinne einer NF- $\kappa$ B-Translokation zu verzeichnen war. Eine Stimulation mit einem pneumolysinnegativen Pneumokokkenstamm führte in CHO/CD14-Zellen mit TLR-2-Überexpression zu einer NF- $\kappa$ B-Translokation, in CHO/CD14-Zellen mit TLR-4 Überexpression konnte keine NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen werden (Yoshimura *et al.*, 1999). Durch diese Experimente wurde Pneumolysin erstmals eine Rolle in der TLR-2-unabhängigen Erkennung von *S. pneumoniae* eingeräumt. Malley *et al.* konnten 2003 an Peritonealmakrophagen TLR-4-defizienter Mäuse eine Hyporesponsivität gegenüber Pneumolysin im Vergleich zu Wildtypmäusen nachweisen. In TLR-Überexpressionsstudien an TLR-4-transfizierten HEK293-Zellen stimulierten ethanolinaktivierte, aber nicht hitzeinaktivierte Pneumokokken die NF- $\kappa$ B-Aktivierung, wobei diese Stimulation auf das hitzelabile, aber ethanolstabile Toxin Pneumolysin zurückgeführt wurde. Neben diesen *in vitro* Studien erhellten die *in vivo* Studien an

TLR-4-defizienten Mäusen und ihrem entsprechenden Wildtyp, welche nasopharyngeal mit einem biolumineszierenden Pneumokokkenstamm infiziert wurden, die Bedeutung von Pneumolysin und *Toll-like* Rezeptoren in der Pathophysiologie der Pneumokokkenerkrankung. TLR-4-defiziente Mäuse zeigten in den ersten 3 Tagen post-infectionem eine signifikant stärkere Besiedelung des Nasopharynx, steigende Raten an Bakteriämie mit darauffolgenden invasiven Erkrankungen und eine erhöhte Letalität nach Beladung mit einem pneumolysinproduzierenden Pneumokokkenstamm, wohingegen pneumolysinnegative Stämme solche Veränderungen nicht hervorriefen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TLR-4 an der Vermittlung der angeborenen Immunantwort auf Pneumokokken durch die Interaktion mit Pneumolysin beteiligt ist und dadurch eine Schutzfunktion einnimmt, welche die relative seltene Entwicklung invasiver Erkrankungen nach asymptomatischer Kolonialisierung mit *S. pneumoniae* bewirkt (Malley *et al.*, 2003). Die Interaktion von TLR-4 mit Pneumolysin sollte hier durch TLR-Überexpressionsversuche bestätigt werden. In TLR-2 transfizierten HEK293-Zellen stimulierten die pneumolysinproduzierenden Pneumokokkenstämme R6x, SPN232 und SP37 die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität, während rekombinantes Pneumolysin in keiner der verwendeten Konzentrationen ein Signal auslöste. Dagegen ließ sich bei einer Kotransfektion der HEK-Zellen mit TLR-4, CD14 und MD2 eine deutliche, dosisabhängige Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch Pneumolysin nachweisen, wohingegen durch die eingesetzten Pneumokokkenstämme, obwohl sie Pneumolysin produzieren, keine Erhöhung der Luciferaseaktivitäten erzeugt werden konnte. Dabei muss erwähnt werden, dass *in vivo* bereits gezeigt werden konnte, dass der Pneumokokkenstamm D39 Pneumolysin nach extrazellulär sezernieren kann, *in vitro* gelang dieser Nachweis bisher noch nicht. Daher könnte die *in vitro*-Expressionskinetik von Pneumolysin durch den D39-Stamm sehr verschieden sein von den Mechanismen *in vivo*. Für die Pneumolysinfreisetzung erforderliche Faktoren im Blut des Wirts sind so z. B. denkbar (Balachandran *et al.*, 2001). Darüber hinaus diskutierten bereits Balachandran *et al.* die Möglichkeit, dass unterschiedliche Pneumokokkenstämme unterschiedliche, auch Autolysin-unabhängige Mechanismen für die Freisetzung von Pneumolysin entwickelt haben könnten (Balachandran *et al.*, 2001).

Die TLR-4-Abhängigkeit der Pneumolysinerkennung konnte anhand eines Experimentes mit der TLR-2-negativen Zelllinie CHO-3E10 nachvollzogen werden.

Sowohl LPS als auch Pneumolysin induzierten in TLR-4-positiven CHO-3E10-Zellen die NF- $\kappa$ B-Translokation mit dem Resultat der CD25-Expression auf der Zelloberfläche. Allerdings erwies sich in diesem Versuchsmodell Pneumolysin als ein wesentlich schwächeres NF- $\kappa$ B-Stimulans als Lipopolysaccharid. Srivastava *et al.* konnten 2005 die direkte und spezifische Interaktion von Pneumolysin und TLR-4 nachweisen (Srivastava *et al.*, 2005). So waren peritoneale Makrophagen von WT-Mäusen signifikant anfälliger für die pneumolysininduzierte Apoptose als TLR-4-defiziente Makrophagen. Auch konnte durch den Einsatz eines spezifischen TLR-4-Antagonisten (B1287) die pneumolysininduzierte Apoptoserate in WT-Makrophagen reduziert werden (Srivastava *et al.*, 2005).

Der Stellenwert der Rezeptoren TLR-2 und -4 für die Erkennung der Pneumokokken in der Immunreaktion ist dabei allerdings umstritten. Zunächst untersuchten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander die Auswirkungen von direkt in die intrazerebralen Zisternen injizierten Pneumokokken im Mausmeningitismodell. So konnte demonstriert werden, dass TLR-2-defiziente Mäuse unter diesen Versuchsbedingungen eine signifikante Verstärkung der Krankheitsschwere zeigten, was sich in einer Aggravation der meningitisinduzierten intrakraniellen Komplikationen, wie erhöhter Hirndruck und gesteigerter Blotschrankenpermeabilität, sowie klinisch durch deutliche Gewichtsabnahme und Temperaturveränderung äußerte (Echchannaoui *et al.*, 2002, Koedel *et al.*, 2003). Koedel *et al.* wiesen zusätzlich eine Erhöhung der TLR-2-mRNA-Expression im Hirngewebe nach *S. pneumoniae*-Injektion nach. Hinsichtlich der bakteriellen Clearance liegen unterschiedliche Ergebnisse vor: während bei Echchannaoui *et al.* die Bakterienkonzentration in Blut und Liquor in Mäusen mit der TLR-2-Mutation nicht signifikant höher ist als bei vergleichbaren Mäusen ohne Mutation, haben Koedel *et al.* eine erhöhte Erregerkonzentration in beiden Proben nachweisen können. Überraschenderweise waren die Unterschiede in der Zytokinexpression in der Frühphase der Pneumokokkenmeningitis und im Ausmaß der Neutrophilenmigration ins ZNS im Vergleich der TLR-2-defizienten Mäuse mit den Wildtypmäusen nur sehr gering ausgeprägt.

Analog zu diesen Versuchen wurde in Experimenten am Mauspneumoniemodell mit Pneumokokkenstimulation ebenfalls eine Hochregulation der TLR-2-mRNA-Expression im Lungengewebe nachgewiesen (Knapp *et al.*, 2004). Während im

Mausmeningitismodell eine verminderte Abwehrreaktion TLR-2-defizienter Mäuse dokumentiert wurde, zeigte sich in der Pneumokokkenpneumonie an denselben Tieren eine im Wesentlichen unveränderte Abwehrreaktion. Zwar war im Lungengewebe von Mäusen mit einer TLR-2-Mutation nach intranasaler Inokulation von *S. pneumoniae* eine gering verminderte inflammatorische Antwort, einhergehend mit vermindertem Ödem und eingeschränkter Pleuritis, sowie ein reduzierter Granulozyteninflux zu erkennen, die antibakterielle Abwehr im Vergleich zu Wildtypmäusen stellte sich aber als unverändert heraus. Die Zytokinsekretion TLR-2-negativer Mäuse wies in der frühen Initiationsphase einige signifikante Unterschiede auf zur Zytokinproduktion der Wildtypmäuse, so waren die Konzentrationen von IL-1 $\beta$ , IL-6 und KC signifikant erniedrigt. Die Produktion der Zytokine in späteren Entzündungsphasen entsprach im Wesentlichen derer, welche in Mäusen ohne Mutation gemessen wurde. Dazu vermuten Knapp *et al.*, dass TLR-2 nicht entscheidend zur Entfernung der Pneumokokken beiträgt, da in verschiedenen Beladungsdosen mit *S. pneumoniae* bei TLR-2-negativen Mäusen eine nicht signifikant niedrigere Konzentration der Erreger im Lungengewebe zu finden war, auch hinsichtlich der Inzidenz von Bakteriämie und des Überlebens konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Branger *et al.* deuteten an, dass auch TLR-4 in der Pneumokokkenpneumonie nur eine relativ limitierte protektive Rolle spielt. Nach intranasaler Inokulation von pneumolysinproduzierenden Pneumokokken in TLR-4-defiziente Mäuse zeigten diese Tiere ein reduziertes Überleben nur nach Infektion mit niedrigen Dosen. Die bakterielle Konzentration in der Lunge ist 48 h post-stimulationem signifikant erhöht, nach 24 h jedoch gleich in beiden Mäusestämmen. Keine oder nur eine geringe Differenz wurde hinsichtlich der Granulozytenmigration, der Zytokinsekretion und der Histopathologie dokumentiert (Branger *et al.*, 2004). In Anbetracht der vielfältigen Faktoren, die in die angeborene Immunität einfließen, wie das Komplementsystem und natürliche Antikörper, ist eine Kompensation sowohl der TLR-2-, als auch der TLR-4-Defizienz durch andere Mechanismen wahrscheinlich (Mold *et al.*, 2002). Diese Annahme unterstreicht die Vermutung, dass für die Erkennung und der daraus folgenden Immunreaktion während einer Pneumokokkeninfektion weder TLR-2 noch -4 unerlässlich sind, und dass weitere Rezeptoren in die Detektion des Erregers involviert sind. So wurde für *Toll-like*-Rezeptoren bereits gezeigt, dass sie durch Heterodimerisation eine größere Anzahl pathogener Strukturen (PAMPs) erkennen können (Ozinsky *et al.*, 2000, Takeda und



Akira, 2005). Underhill *et al.* demonstrierten, das TLR-2, zusammen mit TLR-1 und TLR-6, innerhalb phagozytierender Zellen zu den Phagosomen migrieren, und hier nach Prüfung des Phagosomeninhaltes Informationen über Anwesenheit und Art des eindringenden Erregers signalisieren (Underhill *et al.*, 1999b). Dies trifft auch auf die Erkennung von *S. pneumoniae* zu. In infizierten Mauslungen sowie in humanen Bronchialepithelzellen induziert dieser Erreger die Expression von TLR-1 und TLR-2. Zusätzlich wird die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch *S. pneumoniae* synergistisch durch eine Kotransfektion von TLR-1 und TLR-2, aber nicht von TLR-2 und TLR-6 gesteigert (Schmeck *et al.*, 2005). Albiger *et al.* wiesen vor kurzem die Bedeutung eines weiteren *Toll-like* Rezeptors, des TLR-9, für die Pneumokokkenerkennung nach. Dieser Rezeptor induziert eine inflammatorische Antwort durch die Erkennung von unmethylierten CpG(Cytosinphosphat-Guanosin)-Dinukleotiden, welche v. a. in prokaryontischer DNA vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TLR-9-defiziente Alveolarmakrophagen, als auch TLR-9-defiziente Mäuse empfindlicher auf die Applikation von *S. pneumoniae* reagierten und eine deutliche Beeinträchtigung in der Erkennung, Aufnahme und Abtötung des Erregers aufzeigten. Die untersuchten Mäuse und Zelllinien exprimierten TLR-1, TLR-2, TLR-4 und TLR-6, sodass der Effekt auf die TLR-9-Defizienz zurückgeführt werden kann (Albiger *et al.* 2007b).

Darüber hinaus ist für die Erkennung von *S. pneumoniae* eine weitere Rezeptorgruppe der angeborenen Immunität identifiziert worden. Es handelt sich dabei um zytosolische Nod-Proteine (engl.: „nucleotide-binding oligomerization domain proteins“), die an der Erkennung intrazellulär vorhandener Pneumokokken beteiligt sind. In Anlehnung an die Vermutung, dass Nod-Proteine, als eine den *Toll-like* Rezeptoren folgende und durch sie induzierte Defensivlinie fungieren könnten, fanden Opitz *et al.* eine Nod2-abhängigkeit der *S. pneumoniae*-induzierten NF- $\kappa$ B-aktivierung in HEK293-Zellen. Dementsprechend wurde die Nod1- und Nod2-mRNA-Expression sowohl in C57BL/6-Mäuselungen als auch in Bronchialepithelzellen infolge einer Stimulation mit Pneumokokken hochreguliert (Opitz *et al.*, 2004).

### **6.3 Durch *S. pneumoniae* induzierte Signaltransduktionskaskaden**

#### **6.3.1 Die pneumokokkeninduzierte GM-CSF-Expression ist NF- $\kappa$ B-abhängig**

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *S. pneumoniae* eine Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Weges induzieren kann und dadurch eine Regulation der bereits nachgewiesenen pneumokokkeninduzierten GM-CSF-Sekretion stattfindet. NF- $\kappa$ B gilt als einer der wichtigsten Regulatoren der proinflammatorischen Gen-Expression. Seit seiner Entdeckung sind diverse Bindungsstellen in den Promotor- und Enhancerregionen vieler Gene, wie von Zytokinen, akute Phase Proteinen, Zelladhäsionsmolekülen, sowie Rel- und I $\kappa$ B-Proteinen, nachgewiesen worden (Tak *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 1995, Karin und Ben Neriah, 2000). Auch für die GM-CSF-Expression ist bereits eine NF- $\kappa$ B-abhängige Regulation aufgezeigt worden (Schreck *et al.*, 1990). Fitzgerald *et al.* dokumentierten eine NF- $\kappa$ B-abhängige GM-CSF-Freisetzung durch Lungenfibroblasten nach einer Stimulation mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  (Fitzgerald *et al.*, 2003), was durch Zhou *et al.* an humanen Bronchialepithelzellen nachvollzogen werden konnte (Zhou *et al.*, 2003). Die Induktion dieser GM-CSF-Genexpression wird reguliert durch einen, stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle befindlichen, proximalen Promotor, sowie durch einen ebenfalls stromaufwärts gelegenen Enhancer. Der proximale Promoter verfügt über eine Vielzahl von Transkriptionsfaktorbindungsstellen, wie Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B-proteine und AP-1 (Shannon *et al.*, 1997).

Zunächst wurde ein NF- $\kappa$ B-Reporterassay in TLR-2-überexprimierenden HEK293-Zellen durchgeführt. Es konnte eine dosisabhängige Verstärkung der Transkription des NF- $\kappa$ B-abhängigen Reportergens durch die Pneumokokken gezeigt werden. Eine Infektionsdosis von  $10^6$  cfu/ml *S. pneumoniae* erwies sich dabei als ebenso effektiv wie eine Stimulation mit Peptidoglykan (1  $\mu$ g/ml). Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von Schmeck *et al.* hinsichtlich der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation im Mauspneumoniemodell und an Bronchialepithelzellen *in vitro*. Dabei stützte man sich auf die Erkenntnis, dass die Aktivität von NF- $\kappa$ B wesentlich durch seinen Inhibitor I $\kappa$ B (inhibitor of  $\kappa$ B) reguliert wird, an welchen NF- $\kappa$ B in inaktiver Form im Zytoplasma gebunden ist. Die Phosphorylierung und anschließende Degradation der I $\kappa$ B-Proteine durch I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) führt zur Freilegung der Kernlokalisationssequenz von NF- $\kappa$ B, wodurch dieses in den Kern translozieren kann und dort durch die Bindung an Promoter- und Enhancer-Regionen  $\kappa$ B-sites-tragender DNA-Abschnitte die Transkription spezifischer Gene induzieren kann (Karin und Ben Neriah, 2000, Ghosh *et al.*, 1998). Schmeck *et al.* fanden in *S. pneumoniae*-infizierten

Mäuselungen *in vivo*, sowie in BEAS-2B-Zellen *in vitro*, eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation, welche mit einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung einhergeht (Schmeck *et al.*, 2004).

Daran angelehnt wurde hier die Bedeutung des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes, dem zentralen Kinasekomplex des kanonischen NF- $\kappa$ B-Weges, für die pneumokokkenabhängige Gentranskription von GM-CSF in humanen Bronchialepithelzellen analysiert. Für die Inhibition des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes wurde ein zellpermeables Peptid (IKK-Nemo binding Domain, IKK-NBD) verwendet, welches an die regulatorische IKK-Untereinheit IKK $\gamma$ /NEMO bindet. Dadurch wird die Assoziation von NEMO mit dem IKK-Komplex blockiert und die NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression inhibiert, ohne die basale NF- $\kappa$ B-aktivität zu verändern (May *et al.*, 2000). Es konnte demonstriert werden, dass eine solche Inhibition des I $\kappa$ B-Kinase-Komplexes durch Vorinkubation mit dem Inhibitor IKK-NBD die GM-CSF-Freisetzung in BEAS-2B-Zellen nach Pneumokokkenstimulation dosisabhängig blockiert.

Verschiedene Autoren haben bereits die NF- $\kappa$ B-Abhängigkeit der GM-CSF-Freisetzung in Anwesenheit diverser bakterieller Stimuli nachgewiesen. Krüll *et al.* zeigten mithilfe eines NF- $\kappa$ B-Reporterassays, dass *Chlamydomphila pneumoniae* in BEAS-2B-Zellen dosisabhängig die GM-CSF-Sekretion induziert, und dass diese Induktion eine deutliche NF- $\kappa$ B-Abhängigkeit aufweist (Krüll *et al.*, 2006). Auch für *Moraxella catarrhalis* wurde bereits eine NF- $\kappa$ B-abhängige Induktion der GM-CSF-Freisetzung in Bronchialepithelzellen dokumentiert (Slevogt *et al.*, 2006). Darüber hinaus erwiesen sich auch verschiedene Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs), wie LPS, Peptidoglykan und *Staphylococcus aureus*- $\alpha$ -Toxin als NF- $\kappa$ B-aktivierende Stimuli (Koch *et al.*, 2004, Bozinovski *et al.* 2002, Gupta *et al.*, 1996, Rose *et al.*, 2002).

### **6.3.2 Die p38-MAPK ist involviert in die *S. pneumoniae*-induzierte GM-CSF-Expression**

Um die Rolle der p38-MAPK in der pneumokokkeninduzierten GM-CSF-Sekretion genauer zu bestimmen, wurden die spezifischen chemischen p38-MAPK-Inhibitoren SB202190 und SB203580, sowie ein nicht funktionierendes Homolog SB202474 verwendet. Anhand dieses Experimentes konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der p38-MAP-Kinase in Bronchialepithelzellen die GM-CSF-Freisetzung signifikant verminderte, wobei eine Dosisabhängigkeit zu verzeichnen war. Aus diesem

Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die pneumokokkeninduzierte p38-MAPK-Aktivierung für die GM-CSF-Expression kritisch zu sein scheint.

Die p38-MAP-Kinase ist in die Regulation der Expression vieler proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, involviert (Kaminska *et al.*, 2005). Außerdem ist sie beteiligt an der Enzyminduktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 (Chen *et al.*, 2001). Verschiedene Autoren haben dieses Enzym darüber hinaus mit der GM-CSF-Transkription in Verbindung gebracht. Slevogt *et al.* gelang so der Nachweis, dass *Moraxella catarrhalis* in humanen Bronchialepithelzellen die GM-CSF-Sekretion p38-MAPK-abhängig stimuliert (Slevogt *et al.*, 2006). Für *Chlamydomphila pneumoniae* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition der p38-MAPK durch einen spezifischen Inhibitor die durch diesen Keim vermittelte GM-CSF-Freisetzung blockiert (Krüll *et al.*, 2006).

Die Bedeutung der p38-MAPK in der Pathogenese der Pneumokokkenerkrankung wurde von Schmeck *et al.* zeitgleich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitorexperimenten untersucht. So konnte die Phosphorylierung der p38-MAPK, entsprechend einer Aktivierung, in Mäuselungen *in vivo* sowie in humanen Bronchialepithelzellen *in vitro* nach der Stimulation mit *S. pneumoniae* gezeigt werden (Schmeck *et al.*, 2004). Darüber hinaus bestätigte sich die Hypothese, dass die p38-MAPK-Aktivität für eine NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription nötig ist. Beispielsweise blockierte der p38-MAPK-Inhibitor SB202190 die pneumokokkeninduzierte Reporterexpression in HEK293-Zellen, welche mit einem *h*TLR-2-kodierenden Plasmid, sowie einem NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferase-Reporter-Plasmids kotransfiziert wurden, wohingegen inaktive Kontrollkomponenten keinen Effekt hervorriefen (Schmeck *et al.*, 2004). Außerdem führte die Suppression der endogenen MAPK-Expression durch siRNA gegen die wichtigste Isoform der p38-MAPK beim Menschen, der p38 $\alpha$ -Isoform, zu einer signifikanten Reduktion der pneumokokkeninduzierten NF- $\kappa$ B-abhängigen Luciferaseexpression. Zusammen legen diese Experimente nahe, dass die p38-MAPK in die pneumokokkenvermittelte NF- $\kappa$ B-abhängige Gentranskription involviert ist (Schmeck *et al.*, 2004).

### 6.3.3 *S. pneumoniae* aktiviert den Transkriptionsfaktor AP-1

Neben NF- $\kappa$ B spielt auch der Transkriptionsfaktor AP-1 eine Rolle in der Regulation der Immunantwort, indem er beispielsweise die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert (Hess *et al.*, 2004). AP-1 vermittelt dabei die Genregulation in Abhängigkeit einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Stimuli, wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Stresssignalen (Hess *et al.*, 2004). In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob auch *S. pneumoniae* eine Aktivierung von AP-1 bewirken kann. Dazu wurde die bronchiale Epithelzelllinie BEAS-2B mit Pneumokokken stimuliert, und das durch fraktionierte Proteinextraktion gewonnene Kernprotein mithilfe eines EMSA analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* den Transkriptionsfaktor AP-1 zeitabhängig induzierte. Während eine 30-minütige Inkubation mit dem Erreger noch nicht für eine signifikante AP-1-Induktion ausreichte, konnte eine Erhöhung der DNA-bindenden Proteine im Kernextrakt 2, 4 und 7 h post-infectionem nachgewiesen werden. Dabei erwies sich eine Infektionsdosis von  $10^6$  cfu/ml des Pneumokokkenstammes R6x für die AP-1-Induktion als ausreichend. Dieses Ergebnis stimmt mit Versuchen von Schmeck *et al.* überein, wobei hier mittels eines Transkriptionsfaktor-Assay-Kits eine erhöhte DNA-Bindung der phosphorylierten AP-1-Untereinheit c-Jun in humanen Bronchialepithelzellen nach der Stimulation mit *S. pneumoniae* aufgezeigt werden konnte, was wiederum die Aktivierung von AP-1 demonstrierte (Schmeck *et al.*, 2006). Verschiedene Arbeiten haben bisher die Aktivierung von AP-1 durch bakterielle Bestandteile untersucht, um dem Transkriptionsfaktor eine genauer definierte Position in der Immunabwehr gegen eindringende Mikroorganismen zuzuweisen. So gelang Gupta *et al.* erstmals der Nachweis, dass die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) Peptidoglykan und Lipopolysaccharid in Makrophagen die Phosphorylierung von c-Jun transient und dosisabhängig induzieren, was einer Aktivierung von c-Jun entspricht (Gupta *et al.*, 1999). Darüber hinaus steigern diese bakteriellen Bestandteile die Proteinsynthese von JunB und c-Fos dosisabhängig. Außerdem konnte eine durch Peptidoglykan und Lipopolysaccharid induzierte Steigerung der Transkriptionsaktivität eines AP-1-Reporterplasmid durch die Transfektion eines dominant-negativen c-Fos (A-Fos) inhibiert werden (Gupta *et al.*, 1999).

Zusätzlich zum Nachweis der verstärkten DNA-Bindung von AP-1 durch *S. pneumoniae* wurden in dieser Arbeit A-Fos-Überexpressionsexperimente an TLR-2-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt, um die Beteiligung von AP-1 an der Regulation der Abwehrreaktion gegen Pneumokokken genauer zu bestimmen. Das dominant-negative Fos-Protein A (acidic extension)-Fos inhibierte die sequenzspezifische DNA-Bindung von AP-1, indem es mit Jun-Proteinen, in Konkurrenz mit intakten Fos-Proteinen, heterodimerisiert. Die Untersuchung der molekularen Signalwege sollte hier unter Benutzung von IL-8 als Zytokinmodell durchgeführt werden. Für dieses stark chemotaktisch wirkende Chemokin wurde die Bedeutung in der Steuerung der Immunreaktion bereits genauer definiert, auch konnte hier die Induktion seiner Sekretion durch Pneumokokken bereits nachvollzogen werden. Es wurde gezeigt, dass dominant-negatives A-Fos die pneumokokkeninduzierte IL-8-Sekretion deutlich reduzierte. Auf die TNF $\alpha$ -vermittelte IL-8-Freisetzung hatte A-Fos dagegen keinen inhibitorischen Effekt.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 wurde bereits mit der Regulation der IL-8-Expression in Anwesenheit infektiöser Stimuli in Zusammenhang gebracht. Dazu passt, dass der Interleukin-8-Promoter Bindesequenzen nicht nur für NF- $\kappa$ B, sondern auch für AP-1 besitzt (Holtmann *et al.*, 1999). Allerdings sind der Stellenwert, den beide Transkriptionsfaktoren in der Regulation der Immunantwort einnehmen, sowie ihr Verhältnis zueinander, noch nicht geklärt. Einige Studien haben gezeigt, dass NF- $\kappa$ B für die Initiierung der IL-8-Expression essentiell ist, und AP-1 nur eine potentielle Rolle eingeräumt werden kann (Holtmann *et al.*, 1999). Dabei scheint das Ausmaß der Involvierung von AP-1 an der IL-8-Regulation von der Art des Stimulus, sowie vom stimulierten Zelltyp abhängig zu sein. Während beispielsweise Mukaida *et al.* einer Beteiligung von AP-1 an der IL-1 $\beta$ -stimulierten IL-8-Sekretion durch Glioblastomzellen keine Bedeutung beimessen (Mukaida *et al.*, 1994), war die RSV (engl.: respiratory syncytial virus)-induzierte IL-8-Expression in A549-Zellen vergesellschaftet mit einer erhöhten DNA-Bindung von AP-1 (Mastrorade *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis konnte für die CMV-induzierte IL-8-Gentranskription in humanen Monozyten, sowie für *Helicobacter pylori* in Magenzellen analog nachvollzogen werden (Murayama *et al.*, 1997, Aihara *et al.*, 1997). Eine Beteiligung beider Transkriptionsfaktoren in äquivalentem Verhältnis konnte für die *Salmonella typhimurium*-Stimulation von intestinalem Epithel demonstriert werden (Hobbie *et al.*,

1997). In welchem Verhältnis NF- $\kappa$ B und AP-1 an der pneumokokkenbedingten IL-8-Sekretion durch bronchiale Epithelzellen beteiligt sind, muss noch geklärt werden.

#### **6.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Die durchgeführten *in vitro*-Experimente konnten zeigen, dass Bronchialepithelzellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* verschiedene Mediatoren mit unterschiedlicher Funktion nach einem bestimmten zeitlichen Muster freisetzen und so aktiv an der Feinregulation der Immunantwort beteiligt sind. Weiterführende *in vivo*-Versuche an primären Lungenepithelzellen könnten in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse liefern. Außerdem wäre die Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse an anderen, im Lungengewebe zu findenden Zellen, wie Alveolarmakrophagen, interstitiellen Fibroblasten oder Endothelzellen, für ein integriertes Verständnis der komplexen pathophysiologischen Vorgänge während der Abwehrreaktion der Lunge wünschenswert.

Desweiteren zeigten die Experimente, dass sowohl die Detektion der Pneumokokken durch TLR-2 als des Virulenzfaktors Pneumolysin durch TLR-4 zu einer Signaltransduktion mit konsekutiver NF- $\kappa$ B-Aktivierung führte. Dadurch konnte das Wissen über die Interaktion der Pneumokokken mit dem Wirtsorganismus über Rezeptoren weiter vertieft werden. Dies ist hinsichtlich der zukünftigen Entwicklung neuer Therapiestrategien bedeutsam. Die *Toll-like* Rezeptoren könnten bei diesen Therapiestrategien eine zentrale Rolle einnehmen. TLR-Antagonisten wären dann von Nutzen, um der schädlichen proinflammatorischen Antwort entgegenzuwirken. In Anbetracht der Vielzahl der, an der Pneumokokkenerkennung beteiligten, Rezeptoren (z. B. TLR-1, -2, -4, -6 und Nod), muss der Stellenwert der hier untersuchten Rezeptoren noch genauer untersucht und kritisch bewertet werden. Die anhand von Mauspneumonie- und Mausmeningitismodellen gewonnenen, z. T. widersprüchlichen Erkenntnisse bezüglich der Rolle der TLRs in der Abwehr der Pneumokokken machen deutlich (Echchannaoui *et al.*, 2002, Koedel *et al.*, 2003, Knapp *et al.*, 2004, Branger *et al.*, 2004), dass weiterführenden Untersuchungen auch im Hinblick auf die Involvierung anderer Rezeptoren eine zentrale Bedeutung zukommt. Dabei sind beispielsweise *in-vivo*-Versuche an Mäusen mit Rezeptordefizienzen für TLR-6, TLR-1 oder auch für Nod-Proteine denkbar. Lorenz *et al.* konnten anhand einer klinischen Studie zeigen, dass bei zirka 3 % der

Menschen eine Mutation im *Toll-like* Rezeptor 2 vorliegt, was mit einer Prädisposition für lebensbedrohliche bakterielle Erkrankungen vergesellschaftet war (Lorenz *et al.*, 2000). Bis heute liegen Untersuchungen bezüglich der Pneumokokkenpneumonie solcher Patienten, sowie deren Verlaufsformen und ein möglicher Zusammenhang mit TLR-Mutationen nicht vor.

Einen weiteren zentralen Punkt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der durch Pneumokokken induzierten Signaltransduktionskaskaden und Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 dar, welche die inflammatorische Antwort steuern. Weiterführende Studien mit Inhibitoren des NF- $\kappa$ B- oder p38-MAPK-Signalweges im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Nutzen wurden von verschiedenen Autoren bereits vorgenommen (Branger *et al.*, 2002, Branger *et al.*, 2003). Gerade in Anbetracht der zunehmenden Resistenzen und der limitierten Effizienz der Schutzimpfung bei gleichzeitig hoher medizinischer Relevanz von *S. pneumoniae* erscheint die Entwicklung solcher alternativer Therapiestrategien sinnvoll.



## 7 Zusammenfassung

Die durch *S. pneumoniae* induzierte Zytokinproduktion humaner Bronchialepithelzellen involviert die p38-MAPK, sowie die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1. Dabei wird *S. pneumoniae* über Toll-like Rezeptor 2, Pneumolysin über TLR-4 erkannt.

Die ambulant erworbene Pneumonie zählt zu den weltweit am häufigsten diagnostizierten Infektionskrankheiten und wird in ca. einem Drittel der Fälle durch *S. pneumoniae* ausgelöst. Der hohen klinischen Relevanz dieses Erregers stehen dabei die Problematik der zunehmenden Resistenzentwicklung und die eingeschränkt wirksame Impfstrategie gegenüber. Zur Entwicklung innovativer Therapiestrategien kann die Erforschung der Wirt-Erreger-Interaktion wesentlich beitragen.

Verschiedene Studien legten nahe, dass dem Epithel, neben seiner Rolle als mechanische Barriere, durch die Erkennung eindringender Keime und die daraus resultierende Zytokinaktivierung eine wichtige „Wächter“-Funktion zukommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation humaner Bronchialepithelzellen mit *S. pneumoniae* zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der Expression von GM-CSF und weiterer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) führt. Mithilfe eines Mauspneumoniemodells konnte die pneumokokkenvermittelte GM-CSF-Induktion *in vivo* nachvollzogen werden. Auch der isolierte Virulenzfaktor Pneumolysin führte zu einer GM-CSF-Expression. Sowohl die Detektion der Pneumokokken durch TLR-2 als auch von Pneumolysin durch TLR-4 führte zur Expression von GM-CSF. In Folge kam es zu einer Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalpfades sowie von AP-1, zwei Transkriptionsfaktoren, die wesentlich zur beobachteten Zytokinbildung beitragen.

Zusammenfassend führt eine komplexe, zumindest in Teilen TLR-2- und TLR-4-abhängige Stimulation von Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, AP-1) zur Expression von Zytokinen in pneumokokkeninfizierten Epithelzellen. Weiterführende Untersuchungen, welche die Verifizierung dieser *in vitro* gewonnenen Experimente *in vivo* beinhalten sollten, sind notwendig, um das Verständnis der komplexen Pneumokokken-Wirts-Interaktion zu vertiefen.

## 8 Literatur

Abdelaziz MM, Devalia JL, Khair OA, *et al.* The effect of conditioned medium from cultured human bronchial epithelial cells on eosinophil and neutrophil chemotaxis and adherence *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995; 12:728–737.

Aderem A. Role of *Toll-like* receptors in inflammatory response in macrophages. *Crit Care Med* 2001; 29:16-18.

Aderem A and Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.

Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, *et al.* Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997; 65:3218-24.

Akashi S, Shimazu R, Ogata H, *et al.* Cell surface expression and LPS signaling via the *toll-like* receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000; 164:3471-3475.

Akira S, Sato S. *Toll-like* receptors and their signalling mechanisms. *Scand J Inf Dis* 2003; 35:555-562.

Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, *et al.* Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the *Toll-like* receptors. *J Intern Med* 2007a; 261:511-528.

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, *et al.* *Toll-like* receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Mikrobiol* 2007b; 9:633-44.

Anderson KV, Jurgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell* 1985a; 42:779-89.

Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985b; 42:791-8.

Andersson B, Eriksson B, Falsen E, *et al.* Adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal epithelial cells in vitro: differences in adhesive capacity among strains isolated from subjects with otitis media, septicemia, or meningitis or from healthy carriers. *Infect Immun* 1981; 32:311-317.

Ankermann T, Reisner A, Wiemann T, *et al.* Topical inhibition of nuclear factor-kappaB enhances reduction in lung edema by surfactant in a piglet model of airway lavage. *Crit Care Med* 2005; 33:1384-91.

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, *et al.* TLR-4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25:187-91.

Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:4491-4508.

Badger AM, Bradbeer JN, Votta B, *et al.* Pharmacological profile of SB 203580, a selective inhibitor of cytokine suppressive binding protein/p38 kinase, in animal models of arthritis, bone resorption, endotoxin shock, and immune function. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279:1453-1461.

Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, *et al.* The autolytic enzyme LytA of *S. pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bact* 2001; 183:3108-3116.

Bals R, Hiemstra PS. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 2004; 23:327-33.

Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, *et al.* The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:441-448.

Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; 12:393-416.

Berry AM, Yother J, Briles DE, *et al.* Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1989; 57:2037-2042.

Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF $\alpha$ - a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:625-55.

Bosson J, Stenfors N, Bucht A, *et al.* Ozone-induced bronchial epithelial cytokine expression differs between healthy and asthmatic subjects. *Clin Exp Allergy* 2003; 33:777-82.

Boutten A, Dehoux MS, Seta N, *et al.* Compartmentalized IL-8 and elastase release within the human lung in unilateral pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:336-42.

Bozinovski S, Jones JE, Vlahos R, *et al.* Granulocyte/Macrophage-Colony-stimulating Factor (GM-CSF) Regulates Lung Innate Immunity to Lipopolysaccharide through Akt/Erk Activation of NF- $\kappa$ B and AP-1 *in vivo*. *J Biol Chem* 2002; 277:42808-42814.

Branger J, van den Blink B, Weijer S, *et al.* Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *J Immunol* 2002; 168:4070-4077.

Branger J, van den Blink B, Weijer S, *et al.* Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *Blood* 2003; 101:4446-4448.

Branger J, Knapp S, Weijer S, *et al.* Role of *toll-like* receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect Immun* 2004; 72:788-794.

Braun JS, Hoffmann O, Schickhaus M, *et al.* Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun* 2007; 75:4245-54.

Brieland JK. *In vivo* regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect Immun* 1995; 63:3253-3258.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, *et al.* Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999; 285:732-736.

Burg J, Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, *et al.* GM-CSF expression by human lung microvascular endothelial cells: *in vitro* and *in vivo* findings. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: 460-467.

Burgess AW und Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* 1980; 56:947–958.

Buttery J und Moxon ER. Capsulate bacteria and the lung. *British Medical Bulletin* 2002; 61:63-80.

Cao Z , Xiong J, Takeuchi M, *et al.* TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383:443-446.

Casal J und Tarrago D. Immunity to *Streptococcus pneumoniae*: factors affecting production and efficacy. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:219–224.

Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, *et al.* Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol* 1995; 155:3538-3545.

Chen Z, Gibson TB, Robinson F, *et al.* MAP Kinases. *Chem Rev* 2001; 101:2449-2476.

Chung KF und Barnes PJ. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54:825–857.

Clemans DL, Bauer RJ, Hanson JA, *et al.* Induction of proinflammatory cytokines from human respiratory epithelial cells after stimulation by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* 2000; 68:4430-4440.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-91.

Cockeran R, Durandt C, Feldman C, *et al.* Pneumolysin activates the synthesis and release of interleukin-8 by human neutrophils *in vitro*. *Journal Infect Dis* 2002; 186:562-5.

Cromwell O, Hamid Q, Corrigan CJ, *et al.* Expression and generation of interleukin-8, interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by bronchial epithelial cells and enhancement by IL-1beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 1992; 77:330-7.

Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, *et al.* Positive and negative regulation of I $\kappa$ B kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science* 1999; 284:271-273.

Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, *et al.* *Toll-like* receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation. *J Infect Dis* 2002; 186:798-806.

Epstein J, Eichbaum Q, Sheriff S, *et al.* The collectins in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1996; 8:29-35.

Fantuzzi G, *et al.* Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice. *J Immunol* 1996; 157:291-296.

Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 2004; 16:769-779.

Fickl H, Cockeran R, Steel HC, *et al.* Pneumolysin-mediated activation of NF- $\kappa$ B in human neutrophils is antagonized by docosahexaenoic acid. *Clinical and Experimental Immunology* 2005; 140:274-281.

Fitzgerald SM, Chi DS, Hall HK, *et al.* GM-CSF induction in human lung fibroblasts by IL-1beta, TNF-alpha, and macrophage contact. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23:57-65.

Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998; 10:363-72.

Fuhrmann M, Jahn HU, Seybold J, *et al.* Identification and function of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20:292-302.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:710-20.

Gay NJ und Keith FJ. *Drosophila Toll* and IL-1 receptor. *Nature* 1991; 351:355-6.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappaB and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225-60.

Gilbert RJC, Rossjohn J, Parker MW, *et al.* Self-interaction of pneumolysin, the pore-forming protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* 1999; 284:1223-1237.

Goedert M, Cuenda A, Craxton M, *et al.* Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6): comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* 1997; 16:3563-3571.

Gon Y, Hashimoto S, Hayashi S, *et al.* Lower serum concentrations of cytokines in elderly patients with pneumonia and the impaired production of cytokines by peripheral blood monocytes in the elderly. *Clin Exp Immunol* 1996; 106:120-6.

Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, *et al.* CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem* 1996; 271:23310-23316.

Gupta D, Wang Q, Vinson C, *et al.* Bacterial peptidoglycan induces CD14-dependent activation of transcription factors CREB/ATF and AP-1. *J Biol Chem* 1999; 274:14012-20.

Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, *et al.* *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, Springer 1999, 223-229.

Hale KK, Trollinger D, Rihaneck M, *et al.* Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol* 1999; 162:4246-4252.

Hammerschmidt S. Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9:12-20.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-79.

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis* 2005; 5:83-93.

Hayden MS und Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes and Development* 2004; 18:2195-2224.

Hebert JC, O'Reilly M, Gamelli RL. Protective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor against pneumococcal infections in splenectomized mice. *Arch Surg* 1990; 125:1075-8.



Heine H, Kirschning CJ, Lien E, *et al.* Cutting edge: cells that carry a null allele for *toll-like* receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol* 1999; 162:6971-5.

Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2759.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Science* 2004; 117:5965-5973.

Hobbie S, Chen LM, Davis RJ, *et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol* 1997; 159:5550-5559.

Höffken G. Leitlinien der DGP/PEG/DGI für die ambulant erworbene Pneumonie (CAP). 2005.

Hollenbach E, Neumann M, Vieth M, *et al.* Inhibitors of p38 MAP kinase- and RICK/NF-kappaB-signaling suppresses inflammatory bowel disease. *FASEB J* 2004, 18:1550-1552.

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

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, *et al.* Quantitative expression of *Toll-like* receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* Cutting edge: *Toll-like* receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol* 1999; 162:3749-52.

Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 $\beta$  by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1994; 62:1501-1503.

Huntemann I, Lorenz J, *Ambulante Erworbene Pneumonie (AEP), Community Acquired Pneumonia (CAP)*, Capnetz 2004.

International Symposium on Pneumococci and Pneumococcal Diseases, <http://www.slidesonline.com/isppd02/welcome.htm>.

Jagels MA, Daffern PJ, Zuraw BL, *et al.* Mechanisms and regulation of polymorphonuclear leukocyte and eosinophil adherence to human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:418-427.

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.

Janeway CA Jr. The role of self-recognition in receptor repertoire development. *Members of the Janeway Laboratory. Immunol Res* 1999; 19:107-118.

Jany B, Betz R, Schreck R. Activation of the transcription factor NF-kappa B in human tracheobronchial epithelial cells by inflammatory stimuli. *Eur Respir J* 1995; 8:387-91.

Jedrzejewski MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:187-207.

Jiang Y, Chen C, Li Z, *et al.* Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta) *J Biol Chem* 1996; 271:17920-17926.

Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and *Toll-like* receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J Immunol* 2000; 165:3541-44.

Jones MR, Simms BT, Lupa MM, *et al.* Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signalling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 2005; 175:7530-5.

Kadioglu A, Gingles NA, Grattan K, *et al.* Host cellular immune response to pneumococcal lung infection in mice. *Infect Immun* 2000; 68:492-501.

Kadioglu A und Andrew PW. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immunology* 2004; 25:143-149.

Kaminska B. MAPK signaling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy- from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1754:253-262.

Karin M und Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF- $\kappa$ B activity. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:621-663.

Kirschning CJ, Wesche H, Merrill AT, *et al.* Human *Toll-like* receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1998; 188:2091-2097.

Knapp S, Hareng L, Rijneveld AW, *et al.* Activation of neutrophils and inhibition of the proinflammatory cytokine response by endogenous granulocyte colony-stimulating factor in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 2004; 189:1506-14.

Koch A, Giembycz M, Ito K, *et al.* Mitogen-activated protein kinase modulation of nuclear factor- $\kappa$ B-induced granulocyte macrophage-colony-stimulating factor release from human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30:342-349.

Koedel U, Angele B, Rupprecht T, *et al.* *Toll-Like* receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *J Immunology* 2003; 170:438-444.

Koyama S, Sato E, Masubuchi T, *et al.* Human lung fibroblasts release chemokinetic activity for monocytes constitutively. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998; 275: 223-230.

Krüll M, Bockstaller P, Wuppermann FN, *et al.* Mechanisms of *Chlamydomophila pneumoniae*-mediated GM-CSF release in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34:375-382.

Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001; 81:807-869.

Laichalk LL, *et al.* Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 1996; 64:5211-5218.

Lee SC, Hsu JY, Fu LS, *et al.* Comparison of the activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8 secretion between two lung epithelial cell lines. *J Microbiol Immunol Infect* 2005; 38:327-331.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83.

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, *et al.* Toll-like receptor 2 functions as a pattern of recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999; 274:33419-33425.

Lorenz E, Mira JP, Cornish KL, *et al.* A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection *Infect Immun* 2000; 68:6398-6401.

Machida I, Matsuse H, Kondo Y, *et al.* Acetaldehyde induces granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in human bronchi through activation of nuclear factor-kappa B. *Allergy Asthma Proc* 2003; 24:367-71.

Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor  $\kappa$ B binding sites. *J Exp Med* 1991; 174:1517-26.

Magee DM, Williams DM, Wing EJ, *et al.* Production of colony-stimulating factors during pneumonia caused by *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1991; 59:2370-5.

Malley R, Henneke P, Morse SC, *et al.* Recognition of pneumolysin by *Toll-like* receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1966-1971.

Marini M, Vittori E, Hollemborg J, *et al.* Expression of the potent inflammatory cytokines granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8 in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 89:1001-9.

Mastrorade JG, Monick MM, Mukaida N, *et al.* Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J Infect Dis* 1998; 177:1275-81.

May MJ, D'Acquisto F, Madge LA, *et al.* Selective Inhibition of NF- $\kappa$ B activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the I $\kappa$ B kinase complex. *Science* 2000; 289:1550-54.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.

Medzhitov R und Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91:295-298.

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998; 2:253-258.

Medzhitov R und Janeway CA Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Immunology* 1998; 10:351-353.

Medzhitov R und Janeway CA Jr. The *Toll* receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* 2000a; 8:452-456.

Medzhitov R und Janeway CA Jr. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000b; 343:338-344.

Medzhitov R und Janeway CA Jr. Decoding the Patterns of Self and Nonself by the Innate Immune System. *Science* 2002; 296:298-300.

Miyake K, Ogata H, Nagai Y, *et al.* Innate recognition of lipopolysaccharide by *toll-like* receptor 4/MD-2 and RP105/MD-1. *J Endotoxin Res* 2000; 5:389-391.

Mold C, Rodic-Polic B, Du Clos TW. Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fcγ-receptors. *J Immunol* 2002; 168:6375.

Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994; 56:554-8.

Murayama T, Ohara Y, Obuchi M, *et al.* Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol* 1997; 71:5692-5.

Nakamura Y, Azuma M, Okano Y, *et al.* Upregulatory effects of interleukin-4 and interleukin-13 but not interleukin-10 on granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15:680-7.

Nelson S, Heyder AM, Stone J, *et al.* A randomized controlled trial of filgrastim for the treatment of hospitalized patients with multilobar pneumonia. *J Infect Dis* 2000; 182:970-3.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, *et al.* The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999; 398:252-256.

Olive M, Krylov D, Echlin DR, *et al.* A dominant negative to activation protein-1 (AP-1) that abolishes DNA binding and inhibits oncogenesis. *J Biol Chem* 1997; 272:18586-18594.

Opitz B, Puschel A, Schmeck B, *et al.* Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 2004; 279:36426-32.

Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, *et al.* Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:17-21.

Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, *et al.* The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between *toll-like* receptors. *Proc Nat Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-13771.

Paine R 3rd, Preston AM, Wilcoxon S. Granulocyte-macrophage colony-stimulating

factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. J Immunol 2000; 164:2602-9.

Paton JC, Lock RA, Lee C-J, *et al.* Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. Infect Immun 1991; 59:2297-2304.

Paterson GK, Mitchell TJ. Innate immunity and the pneumococcus. Microbiology 2006; 152: 285-293.

Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in *Tlr4* gene. Science 1998; 282:2085-2088.

Pramanik R, Qi X, Borowicz S, *et al.* p38 Isoforms have opposite effects on AP-1-dependent transcription through regulation of c-jun. J Biol Chem 2003; 279:4831-4839.

Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, *et al.* Endotoxin-tolerant mice have mutations in *Toll-like* receptor 4 (*Tlr4*). J Exp Med 1999; 189:615-625.

Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, *et al.* MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen activated protein kinase signal transduction pathway. Mol Cell Biol 1996; 16:1247-1255.

Reddel RR, Ke Y, Gerwin BE, *et al.* 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 gene. Cancer Res 1988; 48:1904-1909.

Remick DG. Interleukin-8. Crit Care Med 2005; 33:466-467.

Ritter M, Mennerich D, Weith A, *et al.* Characterization of *Toll-like* receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the



regulation of *Toll-like* receptors, adaptor proteins and inflammatory response. Journal of Inflammation 2005; 2:16.

Robb L, Drinkwater CC, Metcalf D, *et al.* Hematopoietic and lung abnormalities in mice with a null mutation of the common beta subunit of the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukins 3 and 5. Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92:9565-9569.

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, *et al.* A family of human receptors structurally related to *Drosophila Toll*. Proc Nat Acad Sci U S A 1998; 95:588-593.

Root RK, Lodato RF, Patrick W, *et al.* Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. Crit Care Med 2003; 31:367-73.

Rose F, Dahlem G, Guthmann B, *et al.* Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by *S. aureus* alpha-toxin. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 282:207-14.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol 2000; 18:217-42.

Rossjohn J, Gilbert RJC, Crane D. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. J Mol Biol 1998; 284:449-461.

Rubins JB, Duane PG, Charboneau D, *et al.* Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells *in vitro*. Infect Immun 1992; 60:1740-1746.

Rubins JB, Duane PG, Clawson D, *et al.* Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. Infect Immun 1993; 61:1352-1358.

Rubins JB und Janoff EN. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. J Lab Clin Med 1998; 131:21-27.

Schmeck B, Zahlten J, Moog K, *et al.* *Streptococcus pneumoniae*-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of relA at the interleukin-8 promoter. *J Biol Chem* 2004; 279:53241-53247.

Schmeck B, Huber S, Moog K, *et al.* Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 290:730-737.

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

Schreck R, Baeuerle PA. NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1281-1286.

Schröder NW, Morath S, Alexander C, *et al.* Lipoteichoic acid 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. *J Biol Chem* 2003; 278:15587-15594.

Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, *et al.* Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-1431.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, *et al.* Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by *toll-like* receptor 2. *J Biol Chem* 1999; 274:17406-17409.

Schwarzer N, Nöst R, Seybold J, *et al.* Two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* induce ceramide generation, nuclear factor- $\kappa$ B activation, and E-selectin expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1998; 161:3010-3018.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46:705-16.

Shannon MF, Coles LS, Vadas MA, *et al.* Signals for activation of the GM-CSF promoter and enhancer in T cells. *Crit Rev Immunol* 1997; 17:301-323.

Shearer WT, Rosenwasser LJ, Bochner BS, *et al.* Biology of common  $\beta$  receptor-signaling cytokines IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:653-665.

Shimazu R, Akashi S, Ogata H, *et al.* MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on *Toll-like* receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777-82.

Slevogt H, Schmeck B, Jonat C, *et al.* *Moraxella catarrhalis* induces inflammatory response of bronchial epithelial cells via mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB activation and histone deacetylase activity reduction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:818-26.

Sohn MH, Lee KE, Choi SY, *et al.* Effect of *Mycoplasma pneumoniae* lysate on interleukin-8 gene expression in human respiratory epithelial cells *Chest* 2005; 128:322-326.

Srivastava A, Henneke P, Visintin A, *et al.* The apoptotic response to pneumolysin is *Toll-like* receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect Immun* 2005; 75:6479-6487.

Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1994; 91:5592-5596.

Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283:688-689.

Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:193-198.

Sweeney SE, Firestein GS. Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16:231-237.

Tak PP und Firestein GS. NF- $\kappa$ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107:7-11.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. *Toll-like* receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:335-376.

Takeda K und Akira S. *Toll-like* receptors in innate immunity. *Internat Immunology* 2005; 17:1-14.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999; 11:443-451.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. Cutting Edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol* 2000; 165:5392-96.

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by *Toll-like* receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13:933-40.

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, *et al.* Cutting edge: role of *Toll-like* receptor-1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169:10-4.

Takizawa H. Airway epithelial cells as regulators of airway inflammation. *Int J Mol Med* 1998; 1:367-78.

Tapping RI, Akashi S, Miyake K, *et al.* *Toll-like* receptor 4, but not *toll-like* receptor 2, is a signalling receptor for *Escherichia* and *Salmonella* lipopolysaccharides. *J Immunol* 2000; 165:5780-7.

Tazi A, Bouchonnet F, Grandsaigne M, *et al.* Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. *J Clin Invest* 1993; 91:566-76.

Thompson JE, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, *et al.* I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell*. 1995; 80:573-582.

Tong L, Pav S, White DM, *et al.* A highly specific inhibitor of human p38 MAP kinase binds in the ATP pocket. *Nat Struct Biol* 1997; 4:311-316.

Tosi MF. Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:241-9.

Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *Am Rev Respir Dis* 1987; 135:869-74.

Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:437-457.

Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, *et al.* *Toll-like* receptors-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Nat Acad Sci U S A* 1999a; 96:14459-14463.

Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, *et al.* The *Toll-like* receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999b; 401:811.

Wagner EF. AP-1-Introductory remarks. *Oncogene* 2001; 20:2334-5.

Wang E, Ouellet N, Simard M, *et al.* Pulmonary and systemic host response to *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in normal and immunosuppressed mice. *Infect Immun* 2001; 69:5294-5304.

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, *et al.* MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 1997; 7:837-847.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, *et al.* Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999; 79:143-180.

Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, *et al.* The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *Embo J* 1997; 16:6120-6130.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, *et al.* CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science* 1990; 249:1431-1433.

Yang RB, Mark MR, Gray A, *et al.* *Toll-like* receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* 1998; 395:284-288.

Yamamoto M, Takeda K, Akira S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signalling. *Molecular Immunology* 2004; 40:861-868.

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, *et al.* Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via *Toll-like* receptor 2. *J Immunol* 1999; 163:1-5.

Zhou L, Tan A, Iasvovskaia S, *et al.* Ras and mitogen-activated protein kinase kinase-1 coregulate activator protein-1 and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated gene expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:762-769.

Zimmerman RK. If pneumonia is the “old man’s friend”, should it be prevented by vaccination? An ethical analysis. *Vaccine* 2005; 23:3843-3849.

Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH, *et al.* Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 2001; 69:845-852.



## 9 Anhang

### 9.1 Danksagung

Für die Auswahl des Themas und die Bereitstellung der für die Laborarbeit benötigten Mittel möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Suttrop bedanken. Die Tätigkeit im Labor gab mir die Möglichkeit, wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen, und Ergebnisse besser einzuschätzen, eine Fähigkeit, welche mir in meiner zukünftigen beruflichen Laufbahn sicherlich oft behilflich sein wird.

Herrn Dr. Bernd Schmeck danke ich für die fachliche Beratung während meiner gesamten Tätigkeit im Labor sowie beim Verfassen meiner Arbeit.

Frau Dr. Simone Rosseau und Herrn Dr. Andreas Hocke danke ich für die Bereitstellung der Mäuselungen. Herrn Dr. Sven Hammerschmidt (Forschungszentrum für Infektionskrankheiten, Universität Würzburg, Deutschland) bin ich für die Bereitstellung der verwendeten Pneumokokkenstämme R6x, R6xply-, SPN232 sowie SP37 sowie des Pneumolysins sehr dankbar.

Mein besonderer Dank gebührt den zahlreichen Mitarbeitern des Labors des Campus Virchow, in erster Linie Dr. Janine Zahlten, Dr. Bastian Opitz, Vincent van Laak und Dr. Rolf Weidmann für die kompetente fachliche Beratung und vielfache technischen Hilfestellungen.

Schließlich bin ich meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung, ihre Geduld und die unermüdliche Fähigkeit zur Motivation sehr dankbar.



## 9.2 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kerstin Moog, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Die Bedeutung von TLR-2 und TLR-4 und der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 für die *S. pneumoniae*-induzierte Aktivierung pulmonaler Epithelzellen“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

### 9.3 Publikationsverzeichnis

1. Schmeck B, Moog K, Zahlten J, van Laak V, N'Guessan PD, Opitz B, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae* induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res.* 2006; 7:98.
2. Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, Opitz B, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 290:730-737.
3. Schmeck B, Zahlten J, Moog K, van Laak V, Huber S, Hocke AC, Opitz B, Hoffmann E, Kracht M, Zerrahn J, Hammerschmidt S, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. *Streptococcus pneumoniae*-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promotor. *J Biol Chem* 2004; 279:53241.

#### **9.4 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.