

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

## Dissertation

Molekulare Mechanismen der *Streptococcus pneumoniae* induzierten  
Glucocorticoid Rezeptor  $\alpha$  Translokationshemmung in pulmonalen  
Epithelzellen

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von  
Aline le Claire  
aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

# Inhaltsverzeichnis

Verzeichnisse.....	4
Abbildungsverzeichnis .....	4
Tabellenverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
Zusammenfassung.....	9
Abstract.....	10
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Ambulant erworbene Pneumonie - eine Volkskrankheit .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	14
1.2.2 Pneumokokkenvirulenzfaktoren.....	15
1.2.3 Pulmonale Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie .....	21
1.2.4 Pathogenerkennung .....	22
1.2.5 Intrazelluläre Signaltransduktion .....	23
1.2.6 Zytokine in der angeborenen Immunabwehr von <i>S. pneumoniae</i> .....	26
1.2.7 Auswirkung einer pulmonalen Hyperinflammation.....	27
<b>1.3 Glucocorticoide.....</b>	<b>29</b>
<b>1.4 Glucocorticoid Rezeptor <math>\alpha</math> .....</b>	<b>30</b>
1.4.1 Antiinflammatorische GR $\alpha$ -Signalstransduktion.....	32
1.4.2 Posttranslationale GR $\alpha$ -Modifikationen .....	34
<b>1.5 Glucocorticoidrezeptor <math>\beta</math>.....</b>	<b>34</b>
<b>1.6 Glucocorticoide in der Therapie der CAP .....</b>	<b>35</b>
<b>1.7 Fragestellung.....</b>	<b>38</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>39</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>39</b>
2.1.1 Humane Alveolar Typ II Epithelzellen, Zelllinie A549.....	39
2.1.2 Primäre humane Alveolar Typ II Epithelzellen, phAEC II.....	39
2.1.3 Human embryonic kidney cells, HEK293.....	39
2.1.4 Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen.....	40
2.1.5 Zellkulturmedien, Kryomedien und Isolationsreagenzien .....	40

2.1.6	Bakterien .....	41
2.1.7	Bakterienkultur und -anzucht .....	42
2.1.8	Stimulanzen, chemische Inhibitoren und Enzyme .....	43
2.1.9	Puffer, Lösungen, Gele.....	44
2.1.10	Primäre und sekundäre Antikörper Westernblot und Konfokalmikroskopie.....	47
2.1.11	Primer .....	49
2.1.12	Geräte .....	50
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>51</b>
2.2.1	Zellkultur .....	51
2.2.2	Bakterienkultur .....	54
2.2.3	Zellinfektion .....	56
2.2.4	Zellstimulation .....	57
2.2.5	Konfokale Immunfluoreszenz .....	58
2.2.6	Western Blot.....	59
2.2.7	RT-Polymerasekettenreaktion (PCR).....	61
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b><i>S. pneumoniae</i> induziert eine Hemmung der GR<math>\alpha</math>-Translokation in humanen Alveolarepithelzellen .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2</b>	<b><i>S. pneumoniae</i> inhibiert die transkriptionelle GR<math>\alpha</math>-Aktivität .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3</b>	<b>Typische, durch <i>S. pneumoniae</i> aktivierte inflammatorische Signalkaskaden scheinen nicht in die GR<math>\alpha</math>-Translokationshemmung involviert zu sein.....</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Hitzeinaktivierte <i>S. pneumoniae</i> lösen keine GR<math>\alpha</math>-Translokationshemmung aus... </b>	<b>69</b>
<b>3.5</b>	<b>Ein löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor induziert eine GR<math>\alpha</math>-Translokationsinhibition .....</b>	<b>70</b>
<b>3.6</b>	<b>Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hat keinen Effekt auf die GR<math>\alpha</math>-Translokation in A549-Zellen .....</b>	<b>72</b>
<b>3.7</b>	<b>Lytisches Pneumolysin verursacht eine Inhibition der GC abhängigen GR<math>\alpha</math>-Translokation.....</b>	<b>73</b>
<b>3.8</b>	<b>Die Infektion mit <i>L. pneumophila</i> hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die GR<math>\alpha</math>-Translokation in A549-Zellen .....</b>	<b>75</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Dysbalancierte Entzündungsreaktion bei der sCAP.....</b>	<b>77</b>

<b>4.2 Bedeutung inflammatorischer Signalwege bei der durch <i>S. pneumoniae</i> verursachten GR<math>\alpha</math>-Translokationshemmung .....</b>	<b>78</b>
<b>4.3 Die Auswirkung der Virulenzfaktoren Wasserstoffperoxid und Pneumolysin auf die GR<math>\alpha</math>-Translokation .....</b>	<b>81</b>
<b>4.4 Fazit und Ausblick .....</b>	<b>85</b>
4.4.1 Bestätigung der Ergebnisse im Lungenmodell.....	85
4.4.2 Erregerdifferenzierung in Studien zum GC-Einsatz bei CAP-Patienten .....	86
4.4.3 Überprüfung des Effekts von anderen Pneumonieerregern auf die GR $\alpha$ -Funktion..	87
4.4.4 Pneumolysin als Ziel in der Entwicklung neuer Therapeutika .....	88
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>116</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>117</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>118</b>

## Verzeichnisse

### Abbildungsverzeichnis

Abb. 0.1: Durchschnittliche Letalität einer CAP in Prozent, erhoben in klinischen Studien in den USA und Deutschland von 1952-2012.....	13
Abb. 0.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer <i>S. pneumoniae</i> Diplokokke.....	15
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der MyD88 abhängigen und –unabhängigen TLR-Signalkaskade.....	24
Abb. 0.4: Schematische Darstellung der Phosphorylierungskaskade von MAP Kinase Signalwegen .....	25
Abb. 1.5: Schematische Darstellung des GR. ....	30
Abb. 1.6: Schematische Darstellung der GR $\alpha$ -Proteinfaltung und Überführung in die Liganden bindende Form.....	32
Abb. 3.1: <i>S. pneumoniae</i> induziert eine Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen und in phAEC II. ....	65
Abb. 3.2: <i>S. pneumoniae</i> inhibiert die transkriptionelle Aktivität von GR $\alpha$ . ....	66
Abb. 3.3: Weder TLR-Liganden und inflammatorische Zytokine noch MAPK-Wege hatten einen Einfluss auf die GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen.....	68
Abb. 3.4: Die GR $\alpha$ -Translokation wird durch hitzeinaktivierte <i>S. pneumoniae</i> nicht inhibiert. ..	70
Abb. 3.5: Ein löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor verursacht eine Inhibition der GR $\alpha$ -Translokation.....	72
Abb. 3.6: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> hatte keinen Effekt auf die GR $\alpha$ -Kerntranslokation in A549-Zellen. ....	73
Abb. 3.7: Lytisches Ply ist für eine Hemmung der Dex induzierten GR $\alpha$ -Translokation verantwortlich.....	75
Abb. 3.8: <i>L. pneumophila</i> induzierte keine GR $\alpha$ -Translokationshemmung in A549-Zellen. ....	76

## Verzeichnisse

### **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1.1: <i>S. pneumoniae</i> Virulenzfaktoren .....	16
Tabelle 2.1: Kulturmedium, Stimulationsmedium und Kryokonservierungsmedium für A549-Zellen.....	40
Tabelle 2.2: Kultur- und Stimulationsmedium, Isolationsreagenzien für phAEC II .....	40
Tabelle 2.3: Kultur- und Stimulationsmedium für HEK293-Zellen .....	41
Tabelle 2.4: Materialien für die Transduktion .....	41
Tabelle 2.5: Medien und Anzuchtplatten in der Bakterienkultur.....	42
Tabelle 2.6: Stimulanzen.....	43
Tabelle 2.7: Inhibitoren .....	43
Tabelle 2.8: Enzyme.....	44
Tabelle 2.9: Western Blot Puffer und -Lösungen .....	45
Tabelle 2.10: Western Blot Gele .....	46
Tabelle 2.11: PCR-Puffer .....	46
Tabelle 2.12: PCR-Gel .....	46
Tabelle 2.13: Primäre Antikörper Western Blot .....	47
Tabelle 2.14: Sekundäre Antikörper Western Blot .....	47
Tabelle 2.15: Primäre Antikörper Immunfluoreszenz.....	47
Tabelle 2.16: Sekundäre Antikörper Immunfluoreszenz .....	47
Tabelle 2.17: Reagenzien Immunfluoreszenz .....	48
Tabelle 2.18: Primer PCR .....	49
Tabelle 2.19: Geräte .....	50
Tabelle 2.20: Sonstige Verbrauchsmaterialien.....	51
Tabelle 2.21: Stimulanzen mit eingesetzten Konzentration.....	58

## Verzeichnisse

### Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (usw., bzw., etc.) sowie SI- (Système International d'unités) Einheiten und deren Präfixe.

AEC II	Alveolar Typ II Epithelzellen
phAEC II	primär humane Alveolar Typ II Epithelzellen
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i> Erworbenes Immundefizienzsyndrom
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest	Aqua destillata
CAP	<i>Community acquired pneumonia</i> Ambulant erworbene Pneumonie
Ca	Kalzium
CBP	Cholin bindendes Protein
CDCs	<i>Cholesterol depending Cytolysines</i>
ChoP	Phosphorylcholin
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i> Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX2	Cyclooxygenase 2
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DBD	DNA bindende Domäne
Dex	Dexamethason
ERK	Extrazellulär signalregulierten Kinase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoide
GBG	Glucocorticoid bindendes Globulin
GR	Glucocorticoid Rezeptor
GTP	Guanintriphosphat
HAP	<i>Hospital associated pneumonia</i> Nosokomiale Pneumonie
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>

## Verzeichnisse

	Humanes Immunmangelvirus
HSP	Hitzeschockprotein
IRF	<i>Interferone regulatory transcription factor</i>
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LIS	<i>Lung injury score</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LytA	Autolysin A
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
MPK-1	Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Phosphatase 1
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear transcriptionfactor <math>\kappa</math>B</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBL	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion
Ply	Pneumolysin
PPV23	Pneumokokken Polysaccharid Vakzin, 23-valent
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PsaA	<i>Pneumococcal surface antigen A</i>
PspA/ C	<i>Pneumococcal surface protein A/ C</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
ROS	<i>Reactive oxygene species</i>
sCAP	<i>Severe community acquired pneumonia</i> Schwere ambulant erworbene Pneumonie
<i>S. pneumoniae, S. p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
spp.	Species pluralis
SpxB	<i>Streptococcus pneumoniae</i> Pyruvat Oxygenase



## Verzeichnisse

SEB	Staphylokokken Exotoxin B
STIKO	Ständige Impfkommission
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TLR	Toll-like Rezeptor

### Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (*Community acquired pneumonia*, CAP) nimmt weltweit eine führende Position unter den häufigsten zum Tode führenden Erkrankungen ein. *S. pneumoniae* ist dabei der am häufigsten isolierte kausative Erreger. Weltweit wachsende Resistenzzahlen von Pneumokokken gegenüber verfügbaren Antibiotika erschweren die Therapie. Unabhängig davon kommt es jedoch in einem bedeutenden Anteil der Fälle im Verlauf einer CAP zu Komplikationen wie einem akuten Lungenversagen, Sepsis und Multiorganversagen trotz Einsatz nachweislich wirksamer Antibiotika. Als ursächlich wird hierfür eine dysregulierte und übermäßige pulmonale sowie systemische Reaktion des Immunsystems angesehen. Glucocorticosteroide (GC) tragen als natürliche antiinflammatorische Hormone maßgeblich zur Terminierung inflammatorischer Prozesse bei und wurden daher in zahlreichen klinischen Studien innerhalb der letzten 5 Jahrzehnte in Bezug auf ihre Wirksamkeit in der Therapie der CAP in den Fokus genommen. Bislang konnte jedoch ein Nutzen eines adjunktiven Einsatzes von GC in der Therapie der CAP nicht überzeugend belegt werden. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber GC ist ein bekanntes Problem in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen. Aber auch mikrobiell verursachte GC-Resistenzen wurden in der Literatur beschrieben.

Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob *S. pneumoniae* eine Inhibition der Signalkaskade des Glucocorticoid Rezeptor  $\alpha$  in pulmonalem Gewebe hervorrufen können. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals am Zellmodell anhand von Immunfluoreszenzfärbungen demonstriert werden, dass *S. pneumoniae* die Dexamethason induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation in humanen Alveolar Typ II Epithelzellen inhibieren. Es ist dabei von einer funktionellen Inhibition des Rezeptors auszugehen, da weder das mRNA- noch das Proteinexpressionsniveau des GR $\alpha$  durch eine Pneumokokkeninfektion verändert wurde. Darüber hinaus konnte der Pneumokokken Virulenzfaktor Pneumolysin und zwar durch seine porenbildende Eigenschaft als hierfür ursächlicher Faktor identifiziert werden. Hierbei scheinen typische, durch *S. pneumoniae* aktivierte inflammatorische Signalkaskaden der angeborenen Immunität nicht involviert zu sein. Schlussfolgernd bieten die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen möglichen Hinweis, warum GC in der adjunktiven Therapie der CAP im pulmonalen Gewebe nicht hinreichend wirken können. Darüber hinaus ergibt sich durch die Identifikation von Ply als ursächlichen Pneumokokkenvirulenzfaktor einer *S. pneumoniae* induzierten GC-Resistenz ein Ziel für die Entwicklung möglicher alternativer Substanzen in der Pneumonietherapie.

## Abstract

Community acquired pneumonia (CAP) takes a leading position among the most common causes of death worldwide. *S. pneumoniae* is the most common isolated causative pathogen of CAP. Increasing resistance of pneumococci to available antibiotics impedes the therapy. Irrespective of this, complications as lung injury, sepsis and multiorgan failure in the course of CAP occur in a considerable part of pneumonia patients despite the use of antibiotics which has been proven to be effective. The underlying reason seems to be an excessive local and systemic host inflammatory response. Glucocorticoids (GCs), as effective natural antiinflammatory steroids, contribute to the termination of inflammatory processes. Therefore their use in CAP-treatment has been addressed in numerous clinical trials for the last 5 decades. However, so far no convincing evidence of a beneficial effect of the adjunctive use of GC in pneumonia treatment has been revealed.

GC-resistance is a well known problem in the treatment of several common inflammatory diseases. Even microbial induced GC-resistance has been described by some authors. Based on these circumstances the question was raised whether *S. pneumoniae* could cause an inhibition of the GC-GR $\alpha$ -pathway in pulmonary tissue.

The present doctoral thesis shows for the first time that *S. pneumoniae* inhibit the dexamethasone induced GR $\alpha$ -translocation into the nucleus in human alveolar epithelial type II cells. Since neither mRNA- or protein expression levels are reduced by pneumococcal infections, a functional inhibition of the GR $\alpha$  is assumed. Furthermore pneumolysine with its pore forming properties could be identified as the responsible virulence factor of the inhibited GR $\alpha$ -translocation. It seems that proinflammatory signal pathways are not involved in the process.

In summary results of the present study indicate a potential explanation why adjunctive use of GC might not be sufficiently effective in CAP-treatment in pulmonary tissue. Moreover the identification of Ply as a possible virulencefactor responsible for GC-resistance caused by *S. pneumoniae* reveals a new target in the future development of alternative substances in CAP-treatment.

## 1 Einleitung

### 1.1 Ambulant erworbene Pneumonie - eine Volkskrankheit

Die ambulant erworbene Pneumonie (*Community acquired pneumonia*, CAP) ist weltweit eine der häufigsten Infektionskrankheiten und stellt aufgrund der mit ihr einhergehenden hohen Morbidität und Letalität eine große sozialmedizinische und ökonomische Belastung dar<sup>1</sup>. Sie steht an vierter Stelle der 10 häufigsten Todesursachen weltweit<sup>2</sup>. In Industrieländern gilt die ambulant erworbene Pneumonie als die häufigste zum Tode führende Infektionskrankheit<sup>3,4</sup>. Die Inzidenz in Deutschland wird auf 3-10 pro 1000 Einwohner und Jahr geschätzt<sup>5,6</sup>. Etwa 10,1 Milliarden Euro pro Jahr erfordert die Versorgung von an Pneumonie erkrankten Patienten in Europa. Der Großteil der Ausgaben wird für die Versorgung hospitalisierter und alter Patienten benötigt<sup>5</sup>. Besonders betroffen sind ältere Menschen über 65 Jahren und Kinder unter 5 Jahren, von denen weltweit jährlich ca. 2 Mio. an einer Pneumonie versterben<sup>2,3</sup>. Das sind mehr Todesfälle als durch Malaria, AIDS und Masern zusammen<sup>7</sup>.

Als Pneumonie begünstigende Faktoren zählen neben dem Alter und männlichem Geschlecht Ernährungsfaktoren (z.B. Alkohol- und Nikotinabusus, Unterernährung und Vitamin B12 Mangel), Komorbiditäten (z.B. chronisch pulmonale Erkrankungen, Herzerkrankungen, zerebrovaskuläre Erkrankungen, Diabetes mellitus) und eine Immunsuppression (z.B. HIV, Asplenismus, medikamentöse TNF $\alpha$ -Blockade), aber auch soziale Umstände (beengter Wohnraum, enger Kontakt zu Kleinkindern) und die dauerhafte Einnahme von Pneumonie begünstigenden Medikamenten (z.B. Protonenpumpen Inhibitoren)<sup>8</sup>.

Die CAP wird pathophysiologisch definiert als eine akute mikrobielle Infektion von Lungenparenchym und angrenzenden Organen<sup>9</sup>. Das klinische Bild ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Beginn mit Fieber oder Hypothermie und allgemeinem Krankheitsgefühl sowie Gliederschmerzen. Hinzu kommen Husten mit eitrigem Auswurf und Dyspnoe. Als Begleitsymptome können Bewusstseinsstörungen und Verwirrtheit auftreten<sup>3,10,11</sup>. In schweren Verlaufsformen (*severe CAP*, sCAP) kann es zum respiratorischen Versagen, septischen Schock mit Multiorganversagen und zum Tod führen<sup>3,9</sup>.

In der körperlichen Untersuchung stellen Ohr nahe Rasselgeräusche, eine umschriebene Klopfchalldämpfung oder ein verschärftes Atemgeräusch klinische Korrelate des lobären pneumonischen Infiltrates dar. In der Thorax Röntgenaufnahme kann das Infiltrat als Teilverschattung imponieren<sup>3,10,11</sup>.

Für die Einschätzung des Schweregrades einer CAP wurde unter Einbeziehung einfacher klinischer Parameter der CRB-65-Index entwickelt<sup>12</sup>. Hierbei stellen die klinischen Variablen

## Einleitung

Verwirrtheit, Atemfrequenz, Blutdruck und Alter unabhängige Prädiktoren für das individuelle Letalitätsrisiko im Verlauf einer CAP dar<sup>9,12</sup>. Anhand eines Punktesystems, wobei für jede Variable ein Punkt addiert wird, erfolgt die Einteilung in leichtgradig, mittelgradig und schwergradig. Diese Einteilung soll bei der Entscheidung zur Wahl des Behandlungsortes, also ambulant, im Krankenhaus auf Normalstation oder Intensivstation, helfen<sup>9,12</sup>.

Um für die adäquate Therapie dem zu erwarteten Keimspektrum gerecht zu werden, teilt man Pneumonien in ambulant oder im Krankenhaus erworbene ein<sup>13</sup>. Hierbei wird die ambulant erworbene Pneumonie durch Erreger verursacht, die im privaten oder beruflichen Umfeld aufgenommen wurden. Demgegenüber bezeichnet man eine Pneumonie, die mindestens 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftritt, als nosokomial (*Health care associated, HAP*)<sup>13</sup>.

Der häufigste ursächliche Erreger der CAP ist *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae, S. p.*)<sup>13</sup>. Neben *S. pneumoniae* werden in absteigender Häufigkeit und abhängig von der untersuchten Studienpopulation und dem untersuchten Probenmaterial *Haemophilus influenzae, Legionella spp., Staphylococcus aureus, Moraxella catarrhalis*, gramnegative Bakterien, *Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia spp.* und Viren isoliert<sup>5,14</sup>.

Die wichtigste Therapie bakterieller Pneumonien stellt der kalkulierte Einsatz von Antibiotika dar, wobei Penicillin und dessen Derivate Antibiotika der Wahl in der Therapie der CAP in Deutschland sind<sup>13</sup>.

Ein weltweites Problem besteht durch zunehmende Antibiotikaresistenzen. Dies betrifft v.a. Resistenzen gegenüber Beta-Lactam Antibiotika, Makrolide und Fluorchinolone<sup>10</sup>. Derzeit gelten weltweit 20-30% der Pneumokokken als multiresistent, d.h. resistent gegen mehr als drei unterschiedlicher Antibiotikaklassen<sup>15</sup>.

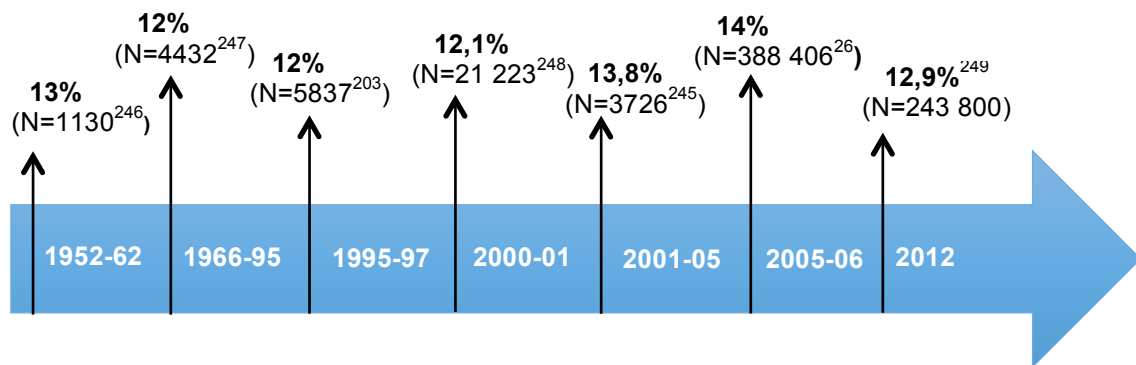
Erstmals wurde Ende der 1960er und in den frühen 1970er Jahren in Australien und Neuguinea von penicillinresistenten Pneumokokkenstämmen berichtet<sup>16,17</sup>. Seit den 1990er Jahren spielen diese auch in Europa eine zunehmende Rolle<sup>18</sup>. Die Inzidenz variiert in den verschiedenen Ländern. In Deutschland weisen aktuell nur ca. 6% der Pneumokokkenstämmen Resistenzen gegenüber Penicillin auf, während besonders hohe Pneumokokkenresistenzraten gegen Penicillin z.B. in Frankreich (47%) und Spanien (62%) bestehen<sup>19</sup>. Die Bedrohung durch wachsende Resistenzzahlen erhöht die Dringlichkeit der Entwicklung alternativer Therapieformen und der Prophylaxe der Pneumonie.

Es stehen derzeit zwei Pneumokokkenimpfstoffe zu Verfügung, dessen klinische Wirksamkeit jedoch begrenzt bleibt<sup>20</sup>. Der Kapselpolysaccharid basierte Impfstoff PPV23 deckt die 23 wichtigsten für invasive Infektionen verantwortlichen Serotypen ab, induziert hierdurch jedoch eine rein serotypenspezifische Immunität<sup>20,21</sup>. Dieser Impfstoff ist lediglich für Erwachsene

## Einleitung

zugelassen<sup>22</sup>. Der Konjugatimpfstoff PCV13 wird v.a. bei Kindern eingesetzt und schützt vor den 13 häufigsten Serotypen<sup>22</sup>. Laut aktueller Empfehlungen der „Ständigen Impfkommission“, STIKO, sollen alle Kinder bis zum 2. Lebensjahr, Erwachsene >60 Jahren und Menschen mit chronischen Krankheiten oder Immundefekten gegen Pneumokokken geimpft werden<sup>23</sup>. Dank des breiten Einsatzes konnte ein Rückgang schwerer Pneumokokkeninfektionen bei Kleinkindern verzeichnet werden<sup>24</sup>. Nachteil dieser Impfung ist das Risiko des sogenannten „Serotypen Replacements“, das heißt eine zunehmende Besiedlung der nasopharyngealen Nische durch nichtvakzine Serotypen und dadurch deren Verbreitung<sup>25</sup>.

Darüber hinaus muss festgehalten werden, dass seit der Einführung der Antibiotikatherapie in den 1930er Jahren eine weitere Senkung der CAP induzierten Letalität trotz Weiterentwicklung der supportiven Intensivmedizin sowie des breiten Einsatzes von Pneumokokkenvakzinen nicht geglückt ist. Nach wie vor versterben etwa 10-20% der stationär behandelten Pneumonienpatienten<sup>5,26</sup>.



**Abb. 1.1: Durchschnittliche Letalität einer CAP in Prozent, erhoben in klinischen Studien in den USA und Deutschland von 1952-2012.**

In den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts stellte die Entdeckung und Einführung von Antibiotika in der Therapie der CAP einen Durchbruch bezogen auf die Morbidität und Letalität dar. 1938 veröffentlichten G.M. Evans und W.F. Gaisford im Lancet ihre Studie an 200 Patienten mit einer Lobärpneumonie. Durch den Einsatz von Sulfapyridinen (früher Sulfonamide) gelang eine Senkung der Letalitätsrate von 27% auf 8% im Vergleich zu Plazebo<sup>27</sup>.

Diese Daten deuten jedoch gleichzeitig auch auf die zentrale Bedeutung des Immunsystems für den Verlauf einer CAP hin: Rund 70% der Patienten überleben auch ohne Antibiotikatherapie. Gleichzeitig gelang seit ihrer Einführung bei der CAP keine weitere Reduktion der Letalität, und

zwar trotz erfolgreicher medikamentöser Erregerelimination. Während die Letalität aktuellen Daten zufolge bei ambulant behandelten Pneumoniekapatienten mit rund 2% gering ausfällt, versterben nach wie vor 10-20% der stationär behandelten CAP-Patienten trotz Antibiotikatherapie und modernen supportiven Intensivmaßnahmen<sup>26,28</sup>. Es wird hierbei von einer überschießenden inflammatorischen Reaktion als Ursache für ein weiterhin häufiges Therapieversagen bei Patienten mit einer sCAP ausgegangen<sup>29,30</sup>.

Hinzu kommt die wachsende Bedrohung durch resistente Erreger, die das Verständnis der Pathophysiologie der CAP, insbesondere der Wirts-Pathogen-Interaktion, und die Entwicklung adjunktiver, immunmodulatorischer Therapiestrategien dringend erforderlich macht.

### **1.2 Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie**

Pneumokokken nutzen neben anderen Bakterien wie *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* und hämolytischen Streptokokken die nasopharyngeale Schleimhaut als ökologische Nische und führen so als Kommensale zur asymptomatischen Kolonisation<sup>3,31</sup>. Die Kolonisierung dieser Nische wird in den ersten Lebensjahren vollzogen. Hierbei erreicht die Kolonisationsrate durch Pneumokokken ihren Höhepunkt im Alter von drei Jahren, wo laut einer holländischen Studie eine Inzidenz von 55% besteht<sup>32</sup>. Die Verbreitung und Übertragung von Pneumokokken durch den Kontakt mit kontaminierten respiratorischen Sekreten wird begünstigt durch enge Kontakte in überfüllten Räumen, wie es z.B. in Kindertagesstätten vorkommt<sup>3,31</sup>. Daher gelten Kinder im Kindergartenalter als Hauptvektoren für die Verbreitung von Pneumokokkenstämmen in der Gesellschaft<sup>31</sup>. Die Pneumokokkenträgerschaft an sich ist nicht obligat mit einer invasiven Infektion assoziiert. Die Virulenz der kolonisierenden Serotypen und die Fähigkeit, Mechanismen der initialen Immunabwehr zu entkommen, tragen zur Entwicklung einer invasiven Infektion bei<sup>3,33,34</sup>. Zu einer Pneumonie kommt es, wenn die Erreger in die tieferen, normalerweise sterilen Anteile des Respirationstraktes gelangen<sup>11</sup>.

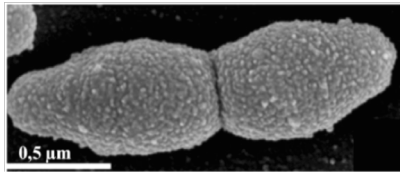
#### **1.2.1 *Streptococcus pneumoniae***

1881 beschrieben Georges M. Sternberg (1838-1915) in den USA und Louis Pasteur (1822-1895) in Frankreich unabhängig voneinander erstmals Pneumokokken. Es handelt sich um ca. 1 µm große, bekapselte, grampositive, mikroaerophile Bakterien, die in gramgefärbten Sputumproben als Kettenkokken oder als charakteristische lanzettförmige Diplokokken nachweisbar sind<sup>35</sup> (Abb. 1.2).

Bereits in den 1880er Jahren schrieben Wissenschaftler wie C. Friedländer, C. Talamon oder A. Fraenkel Pneumokokken eine kausative Rolle in der Ätiologie der Lobärpneumonie zu<sup>36</sup>. 1974

## Einleitung

kamen die Bakterien aufgrund des charakteristischen Wachstumsmusters in flüssigem Medium zu ihrem aktuellen Namen, *S. pneumoniae*.



**Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer *S. pneumoniae***

### **Diplokokke**

Die Abbildung wurde modifiziert übernommen von Hammerschmidt, S<sup>37</sup>.

### **1.2.2 Pneumokokkenvirulenzfaktoren**

Derzeit sind mehr als 90 verschiedene Pneumokokkenserotypen bekannt, die strukturell unterschiedliche Kapselpolysaccharide exprimieren. Ca. 20 der 90 Serotypen scheinen für mehr als 80% der invasiven Pneumokokkeninfektion verantwortlich zu sein<sup>34,38,39</sup>. Voraussetzung für die Kolonisation der nasopharyngealen Schleimhaut, die Wirtszelladhäsion und eine erfolgreiche Gewebeinvasion ist die Expression von verschiedenen Virulenzfaktoren<sup>40</sup>. Hierzu zählen die antiphagozytische Eigenschaft der Bakterienkapsel, Oberflächenstrukturen und Adhäsionsfaktoren, Enzyme zur Wirtszellinvasion, Eisentransportmoleküle sowie Mechanismen, der Immunabwehr zu entkommen, oder auch direkt zytotoxische Faktoren, wie durch das Zytolysin Pneumolysin (Ply) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) verursacht<sup>3,34,39,41</sup>. In Tabelle 1.1 sind die wichtigsten Pneumokokkenvirulenzfaktoren und ihre pathogene Funktion aufgelistet.



## Einleitung

Virulenzfaktor	Funktion
Polysaccharidkapsel	Schutz vor mukosaler Clearance, antiphagozytotisch
PspA	Verhindert durch elektronegative Eigenschaften die Komplement vermittelte Opsonierung
CbpA oder PspC	Bindet an den polymerischen Immunglobulinrezeptor während der Bakterieninvasion
PsaA	Schützt durch Metallionenaufnahme (Zink, Magnesium) vor oxidativem Stress
Neuraminidase	Spaltung von Glykopeptiden, Lipoproteinen und Oligosacchariden, dadurch Demaskierung von Adhäsionsstellen
Autolysin	Freigabe von Ply, Peptidoglykanen, Teichonsäure und anderen intrazellulären Produkten
Pneumolysin	Zytolytisch, potentieller TLR4-Ligand, Aktiviert Zytokin- und Chemokinproduktion, aktiviert Komplement
Wasserstoffperoxid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zytotoxisch durch oxydativen Stress

**Tabelle 1.1: *S. pneumoniae* Virulenzfaktoren**

Modifiziert nach van der Poll et al. 2009<sup>3</sup>.

In den unterschiedlichen Pneumokokkenserotypen, sowie abhängig vom Zielgewebe und dem Pneumokokkenphänotyp (kolonisierend oder invasiv) variiert die Zusammensetzung der exprimierten Virulenzfaktoren<sup>3</sup>.

Im Weiteren soll lediglich auf die in der vorliegenden Arbeit adressierten Pneumokokkenvirulenzfaktoren näher eingegangen werden.

### **Pneumolysin: Struktur und Funktion**

Ply, ein zytoplasmatisches Pneumokokkentoxin, gehört zur Gruppe der Cholesterol abhängigen Zytolysine (*Cholesterol depending cytolysines*, CDCs), die ursprünglich als Hämolysine beschrieben wurden und von mehr als 20 anderen grampositiven Bakterienspezies ebenfalls produziert werden<sup>41-43</sup>. Allen CDCs ist die Eigenschaft gemeinsam, besonders große, bis maximal 45 nm im Durchmesser messende Poren in der Zielzellmembran zu formen<sup>44</sup>. Somit ist Ply von essentieller Bedeutung für den Progress einer Pneumokokkeninfektion. Alle klinisch

## Einleitung

relevanten Pneumokokkenisolate setzen Ply frei<sup>42-45</sup>. Ply defiziente *S. pneumoniae* Mutanten sind in ihrer Virulenz deutlich gemindert und vermutlich apathogen<sup>43,44,46</sup>.

Das 53 kDa große Protein besteht aus 471 Aminosäuren und ist wie andere CDCs aus vier Domänen zusammengesetzt, wobei die C-terminale Domäne (Domäne 4) die Cholesterol bindende Einheit bildet<sup>40,42,44</sup>. Im Unterschied zu anderen CDCs besitzt Ply keine N-terminale Exportsequenz und wird nicht aktiv sezerniert<sup>46,47</sup>. Das in der Bakterienzelle gespeicherte Protein wird durch einen weiteren Pneumokokkenvirulenzfaktor, Autolysin, im Rahmen der Bakterienlyse oder unter dem Einfluss von bakteriolytischen Antibiotika freigesetzt<sup>42,46,47</sup>. Die genauen molekularen Mechanismen der Autolysin unabhängigen Ply-Freisetzung sind nicht vollständig verstanden<sup>42</sup>. Autolysin wird bei Erreichen der stationären Bakteriumwachstumsphase produziert. Zudem wird das Enzym durch Komponenten des Immunsystems, Antibiotika oder andere bakterielle Virulenzfaktoren aktiviert<sup>40-42</sup>.

Die Freisetzung von Ply erfolgt als Monomer, in der Zielzellmembran kommt es zur Oligomerisierung durch die Vereinigung von 20 bis 80 Toxinmolekülen<sup>34,47,48</sup>. Über eine Konformationsänderung entsteht dann der eigentliche Porenkomplex, wobei die Domäne 4 von Ply mit der Plasmamembran interagiert und so die Transmembranpore in der Zielzellmembran bildet<sup>42,48</sup>. Durch die Porenformation kommt es zur Destabilisierung der Zellmembran und des osmotischen Gleichgewichts, was zum freien Durchtritt von Ionen und zytoplasmatischen Proteinen führt<sup>40,42</sup>. Durch einen massiven Einstrom von Calcium kommt es hierbei konsekutiv zur Aktivierung von Zelltodmechanismen<sup>42,49</sup>.

Neben der direkt zytotoxischen Wirkung besitzt Ply die Eigenschaft der Komplement Aktivierung, was die Persistenz und weitere Invasion des Erregers im pulmonalen Gewebe und in die Blutstrombahn erleichtert<sup>42,47,50</sup>. Über die Bindung des FC-Teils von Immunglobulin G und auch C1q aktiviert Ply die klassische Kaskade des Komplementsystems und verhindert so die Komplement vermittelte Opsonophagozytose des Bakteriums<sup>42,47</sup>. Mutmaßlich führt der kontinuierliche Verbrauch an Komplementfaktoren durch die Ply induzierte Aktivierung der Komplementkaskade zu einer verminderten Verfügbarkeit an Komplement für die Opsonierung intakter Organismen<sup>50</sup>. Hierfür sprechen Ergebnisse einer Studie von Giebink *et al.* an Serumproben von Patienten mit Pneumokokkeninfektionen, die zeigen konnte, dass Patienten mit besonders schweren Verläufen eine reduzierte Konzentration an Komplementfaktor im Serum hatten<sup>51</sup>. Alcantara *et al.* hoben die Auswirkung der Komplement depletierenden Wirkung von Ply auf den hypokomplementären Wirt hervor. So zeigte sich die Opsonophagozytoseaktivität von Sera von leberzirrhotischen Ratten mit Komplementmangel unter der Infektion mit *S. pneumoniae* deutlich reduziert im Vergleich mit Proben von Wildtyp

Ratten. Dagegen hatte die Infektion mit Ply defizienten Pneumokokken keinen signifikanten Effekt auf die Erregerelimination in den hypokomplementären im Vergleich mit gesunden Ratten. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Komplement verbrauchende Eigenschaft von Ply im immunsupprimierten Wirt besonders schädliche Auswirkung auf die Fähigkeit der Erregerbeseitigung haben könnte<sup>50</sup>.

Die Aminosäuresequenz von Ply gilt generell als hochkonserviert für alle Pneumokokkenserotypen<sup>52,53</sup>. Dennoch wurden durch Sequenzanalysen bisher mindestens 15 verschiedene Proteinvarianten mit variabler zytolytischer Aktivität beschrieben<sup>42,53,54</sup>. Allel 5 bspw., welches u.a. von Serotyp 1, Sequenztyp 203 exprimiert wird, produziert ein nicht- bzw. minderzytolytisches Ply<sup>53</sup>. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass gerade Serotypen, die häufig für Ausbrüche invasiver Pneumokokkeninfektionen verantwortlich gemacht wurden, wie Serotyp 1, -7 und -8, nichtzytolytische Ply Allele exprimieren, was die Bedeutungen nicht zytolytischer Eigenschaften von Ply in der Pathophysiologie von Pneumokokkeninfektionen hervorhebt<sup>53-55</sup>. In diesem Zusammenhang konnte kürzlich in einer Studie an humanem Lungengewebe demonstriert werden, dass in Abhängigkeit des exprimierten Ply Allels unterschiedliche Pneumokokkenstämme verschiedene Signalwege der angeborenen Immunität aktivieren. So zeigte sich, dass z.B. die durch das *NLR family pyrin domain-containing 3* Inflammasom (NLRP3) vermittelte Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-18 nur durch Pneumokokken induziert wird, die zytolytisches Ply exprimieren<sup>56</sup>. Die Autoren spekulierten, dass die Expression nicht zytolytischen Plys zur Virulenz von *S. pneumoniae* beitragen könnte, da hierdurch eine Detektion durch Inflammasom abhängige Signalwege umgangen wird und somit eine Invasion steriler Kompartimente ermöglicht werden kann<sup>56</sup>.

### **Pneumolysin: Bedeutung für den Progress einer invasiven Infektion**

Ply ermöglicht durch seine zytolytischen Eigenschaften auf das alveoläre Epithel das Eindringen der Bakterien aus dem Alveolarraum ins Interstitium sowie die Verbreitung über die Blutstrombahn<sup>43,45</sup>. Erreicht wird dies über die Zerstörung epithelialer Zell-Zell Kontakte sowie eine Zunahme der endothelialen Permeabilität<sup>44,57</sup>. In sublytischen Konzentrationen nimmt das Toxin über die Membrandestabilisierung in der Zielzelle und dadurch erhöhten Einstrom von Kalzium (Ca) differenziert Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden<sup>44,57</sup>. Über die Aktivierung von GTPasen kommt es zu Konformationsänderungen des Zytoskeletts<sup>44,58</sup>. In der Folge führen Veränderungen der Zellmorphologie zum Aufbrechen von Zellverbänden<sup>57</sup>.

Ply hat eine ausgeprägte proinflammatorische Wirkung und aktiviert eine Vielzahl von Genen in eukaryotischen Zellen<sup>42,59</sup>. In molekulargenetischen Untersuchungen an einer

## Einleitung

Monozytenzelllinie (THP-Zellen), die mit Wildtyp Pneumokokken oder Ply defizienten Pneumokokken infiziert wurden, zeigte sich, dass mehr als 140 Gene durch Ply induziert werden. Zu den aktivierten Genen gehörten v.a. inflammatorische Proteine wie z.B. IL-8, Mannose bindendes Lectin 1, Makrophagen inflammatorisches Protein 1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), IL-15 Rezeptor  $\alpha$  (IL-15R $\alpha$ ) und IL2 Rezeptor  $\beta$  (IL-2R $\beta$ )<sup>59</sup>.

Eine Ply induzierte Abwehrreaktion involviert u.a. den Toll-like Rezeptor 4 Signalweg (TLR4), während Zellwandbestandteile wie Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid*, LTA) oder Lipoproteine TLR2 aktivieren<sup>57,60,61</sup>. So haben TLR4 defiziente Mäuse eine signifikant höhere Anfälligkeit gegenüber invasiven Pneumokokkeninfektionen und letale Verläufe von Pneumokokkenpneumonien im Vergleich zu Wildtyp Mäusen<sup>60</sup>. Andererseits induziert allein die endotracheale Instillation von Ply in Mäusen eine für Pneumokokkenpneumonien typische inflammatorische Reaktion, wie in mehreren Studien gezeigt werden konnte<sup>45,62,63</sup>. Es zeigten sich ein Anstieg von Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin 6 (IL-6), ein Einstrom phagozytischer Zellen sowie eine Veränderung der Permeabilität der alveo-endothelialen Barriere bis hin zur Ausbildung eines Lungenödems<sup>45,62</sup>.

Die Freisetzung von IL-1 $\beta$  und verwandten Interleukinen wie IL-17 und IL-18 erfolgt nicht nur TLR vermittelt, sondern erfordert darüber hinaus das NLRP3-Inflammasom, welches von zytolytischem Ply aktiviert wird, wie kürzlich demonstriert werden konnte<sup>62,64</sup>.

Weiterhin aktiviert Ply in sublytischen Konzentrationen über osmotischen Stress den p38 MAP-Kinase Signalweg<sup>57</sup>. Hierfür spricht, dass alveoläre Epithelzellen, die durch Dextran vor osmotischem Stress geschützt wurden, keine p38 MAPK Aktivierung aufweisen, wie sich in einer *in vitro* Studie von Ratner *et. al* darstellte<sup>65</sup>.

Durch seine lytische Eigenschaft induziert Ply Apoptose in verschiedenen Zelltypen<sup>57</sup>. Zellstudien an neuronalem Gewebe erbrachten bspw., dass Ply, vermittelt durch einen intrazellulären Kalziumanstieg, zu einer Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors (AIF) aus Mitochondrien führt und hierüber maßgeblich zum Gewebsschaden beiträgt. Eine Kalziumchelatierung blockierte die Freisetzung des AIF<sup>66</sup>.

### **Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS) entstehen durch enzymatische Reaktionen unter Verbrauch von Sauerstoff (O<sub>2</sub>)<sup>67,68</sup>. Zu den ROS gehören neben Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) das Hyperoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) oder Hydroxylradikale (OH<sup>·</sup>). Sie entstehen durch Elektronentransfer auf O<sub>2</sub> und wirken schädigend auf alle Arten von Biomolekülen wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren, sie haben aber auch eine physiologische

## Einleitung

Funktion als Signalmoleküle<sup>67-69</sup>. Normalerweise wird im humanen System dem ständigen akzidentiellen Anfall von ROS durch die Bildung von Antioxidantien entgegengewirkt<sup>69</sup>. Hierzu gehören z.B. Enzyme wie Katalase oder Gluthationperoxidase, aber auch niedrigmolekulare Moleküle wie Vitamin E und Ascorbinsäure<sup>69</sup>. Ein Gewebsschaden durch ROS entsteht, wenn das Gleichgewicht zwischen Oxidant und Antioxidant zu Gunsten der Entstehung freier Radikale gestört wird. Neben dem Zellmembran- und DNA-Schaden, der unter ROS-Einwirkung entsteht, induzieren Radikale die Produktion von Zytokinen wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die wiederum die Expression von Antioxidantien stimulieren können<sup>70</sup>. In pulmonalem Gewebe hat ein vermehrter Anfall von ROS eine Steigerung der alveolo-vaskulären Permeabilität zur Folge<sup>69</sup>. Stimuliert durch Bakterien, Zytokine oder Endotoxine produzieren alveoläre Phagozyten und neutrophile Granulozyten ROS im Rahmen einer pulmonalen Inflammation und tragen hierdurch entscheidend zur Abtötung von Pathogenen bei<sup>67,69,71</sup>.

### **Wasserstoffperoxid als Pneumokokkenvirulenzfaktor**

P. Duane *et al.* identifizierten 1993 in einer *in vitro* Studie an AEC II H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> neben Ply als einen unabhängigen, hitzestabilen, löslichen Pneumokokkenvirulenzfaktor mit direkt zytotoxischer Wirkung<sup>72</sup>. Die Menge an freigesetztem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus *S. pneumoniae* erreichte in dieser Studie ähnliche Werte wie die von aktivierten Neutrophilen im Rahmen einer Infektion. Vom Pathogen freigesetztes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schien im frühen Stadium einer Pneumokokkeninfektion noch vor Einstrom inflammatorischer Zellen zum Alveolarepithelschaden beizutragen<sup>72</sup>.

Experimentelle Studien an Ko-Kulturen konnten bereits früher demonstrieren, dass Pneumokokken H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als bakterizide Substanz freisetzen und dadurch das Wachstum konkurrierender Bakterien im oberen Respirationstrakt wie *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* oder *Staphylococcus aureus* limitieren<sup>73,74</sup>. Die durchschnittliche Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *S. pneumoniae* Kulturen erreichte in einer Studie von Pericone *et al.* 1 mM nach der ersten Stunde und lag deutlich über der erreichten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration anderer grampositiver und gramnegativer Bakterien<sup>73</sup>.

Studien an neuronalem Gewebe demonstrieren, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ebenso wie Ply, Zelltodmechanismen in neuronalen Zellen über die Freisetzung vom AIF aus Mitochondrien aktiviert<sup>66</sup>. Wie *S. pneumoniae* sich selber vor der toxischen Wirkung von hohen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen schützen, ist nicht vollständig geklärt<sup>67</sup>. Erstaunlicherweise fehlt dem Bakterium Katalase, ein Enzym, das in anderen Bakterien und auch im Menschen die Elimination von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert<sup>75</sup>. Durch andere Enzyme und Mechanismen gelingt dem Bakterium die Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies<sup>67</sup>. Die *S. pneumoniae* Pyruvat

Oxydase (SpxB) ist hauptsächlich verantwortlich für die endogene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in Pneumokokken<sup>76</sup>. Gleichzeitig scheint das Enzym auch signifikant zum Überleben des Pathogens unter oxydativem Stress beizutragen<sup>77</sup>. Die genauen Mechanismen hierfür sind noch nicht aufgedeckt<sup>67</sup>. Darüber hinaus verbessern bestimmte, in der Bakterienmembran lokalisierte Proteine die Resistenzmechanismen von Pneumokokken gegenüber oxydativem Stress<sup>67</sup>.

### **1.2.3 Pulmonale Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität im Rahmen einer Pneumokokkenpneumonie**

Die Lunge ist über die inhalierte Menge an Luft von ca. 10.000 Litern pro Tag ständig Pathogenen und Schadstoffen ausgesetzt<sup>78</sup>. Aufgrund eines hoch effizienten Abwehrsystems an der mukosalen Oberfläche besteht ein meist suffizienter Schutz vor invasiven Infektionen<sup>78</sup>. Das Epithel der Atemwege trägt als primäre Grenzfläche zwischen Umwelt und Wirt mit verschiedenen Funktionen zur initialen Abwehr von Pathogenen bei. Hierzu gehören neben mechanischen Abwehrmechanismen, wie Zilienschlag und Schleimproduktion, die Freisetzung von Chemokinen, Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden sowie ein komplexes Erkennungssystem für die Detektion eindringender Mikroorganismen<sup>78-80</sup>. Über transmembranäre und intrazelluläre Rezeptoren, die als Pathogen Erkennungsrezeptoren (*Pathogen recognition receptors*, PRRs) bezeichnet werden, kommt es bei der Detektion von pathogenen Bestandteilen zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, die wiederum lokale und systemische Abwehrmechanismen der angeborenen und erworbenen Immunität induzieren<sup>79</sup>.

Eine intakte Immunabwehr ist essentiell für die Erregerelimination bei pulmonalen Infektionen. Jedoch kann eine überschießende Inflammation verheerende Folgen durch eine Lungenschädigung hervorrufen und damit den Verlauf einer Infektion nachteilig beeinflussen<sup>81</sup>. Die Pneumokokkenpneumonie ist charakterisiert durch eine besonders starke inflammatorische Reaktion<sup>82</sup>. Das angeborene Immunsystem repräsentiert hierbei die erste, nicht spezifische Reaktion auf eindringende Pathogene, um die Infektion von Beginn an einzudämmen<sup>82</sup>. Die hier initiierte pulmonale Inflammation ist gekennzeichnet durch eine Akkumulation von Neutrophilen im Alveolarraum, begleitet von einem extravaskulären, proteinreichen Plasmaexsudat<sup>81</sup>. Im Folgenden soll auf die für die vorliegenden Arbeit relevanten Mechanismen der angeborenen Immunität in der Erkennung und Abwehr von Pneumokokken eingegangen werden.

### 1.2.4 Pathogenerkennung

Die Voraussetzung zur Aktivierung einer effektiven Immunreaktion im infizierten Lungengewebe stellt die Erkennung des eindringenden Mikroorganismus durch Wirtszellen dar. Die Detektion von Pathogenen bzw. deren Bestandteilen durch das angeborene Immunsystem erfolgt, wie eingangs schon erwähnt, insbesondere durch PRRs<sup>3,34,83</sup>. Diesen Rezeptoren ist die Eigenschaft gemeinsam, dass sie hochkonservierte mikrobielle Strukturen, so genannte Pathogen assoziierte molekulare Muster (*Pathogene associated molecular patterns*, PAMPs), detektieren. PAMPs sind Strukturen, die für das Überleben des Pathogens essentiell sind und sich daher kaum molekular verändern<sup>78,83,84</sup>. PRRs sind Keimbahn kodiert und werden unabhängig von einem immunologischen Gedächtnis exprimiert<sup>83</sup>. Die Aktivierung von PRRs mündet über spezifische zelluläre Signalkaskaden in der Induktion von Transkriptionsfaktoren mit der Folge der Produktion inflammatorischer Mediatoren, was wiederum die Stimulation benachbarter Immunzellen, die Aktivierung einer Akute Phase Reaktion sowie die Rekrutierung von Neutrophilen zur Folge hat<sup>61,83</sup>.

Zu den PRRs gehört die Familie der Toll ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptors*, TLRs), die an der Signaltransduktion der Erkennung vieler unterschiedlicher Mikroorganismen beteiligt sind<sup>61,85</sup>. Die Familie der TLR besteht aus mindestens 10 Untergruppen im Menschen, in der Maus hingegen sind es 13<sup>61,84</sup>. Eine direkte Rolle in der Pneumokokkenabwehr spielen die TLR2, -4 und -9<sup>83,85,86</sup>. Zellwandbestandteile von Pneumokokken wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykane aktivieren TLR2, während Ply unabhängig von der zytolysierenden Eigenschaft mit TLR4 zu interagieren scheint. TLR9 detektiert unmethylierte CPG-Motive von freigesetzter Pneumokokken-DNA<sup>60,87,88</sup>.

In *in vivo* Studien wurde die Funktion der TLR im Rahmen der Pneumokokkenabwehr an TLR2-, -4- oder -9 defizienten Mäusen untersucht<sup>60,87,89</sup>. Im Gegensatz zu einer relativ milden Beeinträchtigung der Pneumokokkenabwehr bei Funktionsverlust einzelner TLR zeigten Versuchstiere, denen das zentrale TLR-Adaptermolekül MyD88 fehlte, eine deutliche Zunahme der Anfälligkeit gegenüber invasiven Infektionen und eine signifikante Zunahme der Morbidität und der Letalität<sup>90</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen TLR-Wege zwar eine wichtige, aber auch redundante Funktion in der Immunreaktion auf Pneumokokken zu haben scheinen<sup>61</sup>.

Zu den weiteren PRRs in der Detektion von *S. pneumoniae* zählen u.a. die zytosolischen NOD ähnlichen Rezeptoren (*Nod like receptors*, NLRs), die RIG-ähnlichen Rezeptoren (*RIG like receptors*, RLRs) sowie andere zytosolische DNA-Sensoren<sup>61,79</sup>. Diese wurden für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht und sollen daher an dieser Stelle nur erwähnt werden.

### 1.2.5 Intrazelluläre Signaltransduktion

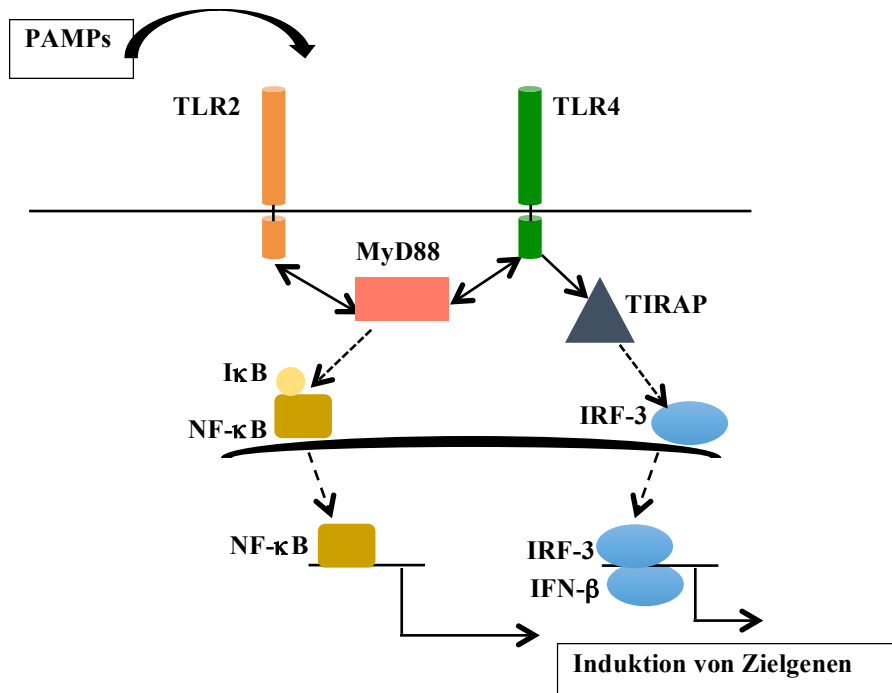
Die Pathogenerkennung in Pneumokokken exponiertem Lungengewebe durch PRRs aktiviert ein Netzwerk intrazellulärer Signalkaskaden, die in der Induktion inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie dem nukleären Faktor  $\kappa$ B (*Nuclear Factor  $\kappa$ B*, NF- $\kappa$ B) und der Familie der Interferon regulierenden Faktoren (*Interferon regulatory factor family*, IRF) kulminiert<sup>81,82</sup>. NF- $\kappa$ B hat eine essentielle Funktion für die Transkription von Entzündungsmediatoren, die Rekrutierung von Neutrophilen und die Pathogenabtötung im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen<sup>82</sup>. In nicht infizierten Zellen liegt der NF- $\kappa$ B Komplex gebunden an seinen inhibitorischen Proteinkomplex, I $\kappa$ B, in der Zelle vor. Durch die Phosphorylierung des inhibitorischen I $\kappa$ B-Komplex durch die I $\kappa$ B-Kinase wird NF- $\kappa$ B freigelassen und kann in den Zellkern translozieren, um dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren<sup>91</sup>.

Der kanonische NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg in Folge einer TLR-Aktivierung ist gut beschrieben und involviert in allen Fällen, außer TLR3, das Adaptermolekül MyD88 sowie andere Signalproteine auf dem Weg zur proteosomalen Degradation von I $\kappa$ B als Voraussetzung für die NF- $\kappa$ B-Kerntranslokation<sup>79</sup>.

Für eine Lipopolysaccharid (LPS) vermittelte TLR4-Aktivierung ist jedoch auch eine MyD88 unabhängige NF- $\kappa$ B-Induktion beschrieben<sup>92,93</sup>. Die LPS aktivierte TLR4-Signalkaskade kann demnach in zwei Gruppen unterteilt werden: Eine MyD88 abhängige Kaskade, die über eine rasche NF- $\kappa$ B-Aktivierung zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt, und eine MyD88 unabhängige Kaskade, die in Assoziation mit Interferon induzierbaren Genen zu einer langsamen NF- $\kappa$ B-Aktivierung führt<sup>93</sup>. Als zentrales Adapterprotein der MyD88 unabhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung konnte das TIR-Domänen enthaltende Adapterprotein (*TIR-domain-containing adaptor protein*, TIRAP) identifiziert werden<sup>94</sup>.



## Einleitung

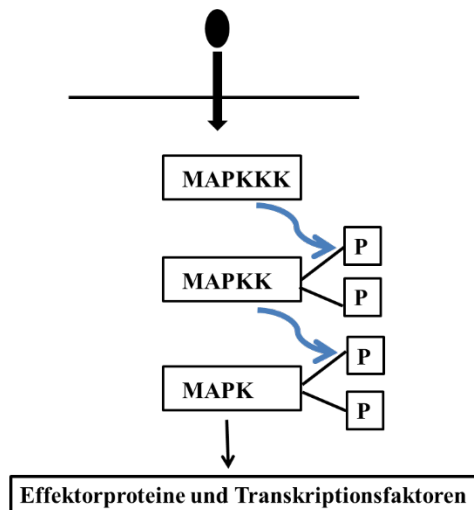


**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der MyD88 abhängigen und –unabhängigen TLR-Signalkaskade.**

TLR erkennen PAMP. Nach Aktivierung binden Adapterproteine wie MyD88 oder TIRAP an die intrazelluläre Domäne der TLR. Die weitere intrazelluläre Signaltransduktion erfolgt über die Aktivierung von nukleären Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und IFN-β, welche wiederum inflammatorische Gene induzieren. Die Aktivierung von NF-κB beinhaltet die Lösung von seinem inhibitorischen Proteinkomplex, IκB. Für die schematische Darstellung wurden exemplarisch nur die TLR2- und TLR4-Signalwege ausgewählt. Die Abbildung wurde modifiziert von M. Yamoto *et al.* übernommen<sup>93</sup>.

Andere inflammatorische Signalwege involvieren Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)<sup>79</sup>. MAPK-Signalkaskaden kommen ubiquitär vor und tragen in humanen Zellen wesentlich dazu bei, extrazelluläre Signale in zelluläre Reaktionen umzuwandeln<sup>95</sup>. Sie sind daher in eine Vielzahl von Prozessen wie Inflammation, Wachstum, Differenzierung und Zelltod involviert<sup>96</sup>. Weiter unterteilt werden sie in die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK), die Jun-NH<sub>2</sub> terminalen Kinasen, (JNK), und die p38-MAP-Kinasen<sup>96</sup>. Die Aktivierung von MAPK stellt den letzten Schritt einer sequentiellen intrazellulären Phosphorylierungskaskade dar, die durch die Aktivierung des ersten Mitglieds, der MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK), initiiert wird (Abb. 1.4)<sup>95,97</sup>. MAPK aktivieren durch Phosphorylierung wiederum andere Proteinkaskaden, nukleäre Proteine oder Transkriptionsfaktoren<sup>95</sup>. Es besteht eine enge Vernetzung der unterschiedlichen MAPK-Signalwege durch überlappende Substratspezifitäten und wechselseitigen Signalfluss, was der Signalintegration und Aktivierung separater Gensätze dient<sup>98</sup>.

## Einleitung



Am Beginn der Signalkette steht die Aktivierung der MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK). Durch Phosphorylierung der stromabwärts gelegenen Kinase werden sequentiell erst MAP Kinase Kinase und dann MAP Kinase aktiviert. Leicht modifiziert übernommen aus Arbabi, S. und Maier, V., 2002<sup>95</sup>.

**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Phosphorylierungskaskade von MAP Kinase Signalwegen**

Auch an Pneumokokken infiziertem Lungenepithel konnte die Aktivierung von MAPK-Wegen nachgewiesen werden<sup>99-102</sup>. In mehreren *in vitro*- und *in vivo* Studien stellte sich eine zentrale Funktion insbesondere von p38-MAP-Kinasen in der Regulation der Pneumokokken induzierten Zytokin- und Chemokinfreisetzung dar<sup>79,99,101,102</sup>. In einer *in vitro* Studie von Xu und Kollegen resultierte die Inaktivierung von p38-MAPK-Wegen mittels chemischer Inhibitoren in humanem Lungengewebe in einer signifikanten Reduktion der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-8 nach Infektion mit *S. pneumoniae*<sup>101</sup>. Schmeck *et al.* demonstrierten in einer Studie an mit Pneumokokken infizierten Bronchialepithelzellen, dass p38 MAPK über die Phosphorylierung von NF- $\kappa$ B-Untereinheiten die Transkription von IL-8 positiv regulierten<sup>102</sup>.

Darüber hinaus sind auch JNK MAPK in der *S. pneumoniae* induzierten Zytokinfreisetzung direkt involviert, wie in einer anderen *in vitro* Studie an Bronchialepithelzellen von Schmeck *et al.* gezeigt werden konnte: Über die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 1 (AP-1) reguliert JNK die Transkription von IL-8<sup>100</sup>.

Aufgrund ihrer zentralen Rolle in der Synthese und Aufrechterhaltung einer inflammatorischen Reaktion erscheinen MAPK auch als potentielle Ziele in der Entwicklung antiinflammatorischer Medikamente attraktiv. Präklinische Daten aus Studien zum Einsatz von chemischen MAPK-Inhibitoren bei rheumatoider Arthritis (RA), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), zerebraler Inflammation und systemischer Inflammation erbrachten bereits vielversprechende Ergebnisse<sup>98</sup>.

### 1.2.6 Zytokine in der angeborenen Immunabwehr von *S. pneumoniae*

Die initiale Pathogenerkennung im Rahmen einer pulmonalen Entzündungsreaktion der angeborenen Immunität führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. Zytokine bilden hierbei die größte und vielfältigste Gruppe an Entzündungsmediatoren<sup>103</sup>. Als interzelluläre Botenstoffe vermitteln Zytokine die vollständige Ausbildung, Aufrechterhaltung und Terminierung einer Abwehrreaktion der angeborenen Immunität sowie den Übergang in eine Reaktion der erworbenen Immunität<sup>103,104</sup>. Zytokine tragen zusammen mit anderen löslichen Faktoren und Adhäsionsmolekülen zur Pathogenerkennung, der Rekrutierung von Neutrophilen und mononukleären Zellen sowie Pathogenbeseitigung bei<sup>103</sup>. In einer Literaturmetaanalyse von E. Calbo und J. Garau zu Zytokinstudien an Pneumoniepatienten zählten zu den am häufigsten gemessenen Zytokinen und Chemokinen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und Serum IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie der lösliche IL-2-Rezeptor<sup>82</sup>.

Zu den wichtigsten, früh induzierten Zytokinen einer pulmonalen Pneumokokkenabwehrreaktion werden IL-1 und TNF $\alpha$  gezählt<sup>82,84,103,105</sup>. Über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche induzieren TNF $\alpha$  und IL-1 ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden, die wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit zur Transkription weiterer Mediatoren wie z.B. IL-6 oder IL-8 führen und somit die Entzündungsreaktion perpetuieren<sup>103</sup>. So hatte eine Inaktivierung beider Zytokine in einer Studie von Jones *et al.* an TNF $\alpha$ - und IL-1-Rezeptor defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der Neutrophilenrekrutierung um 80% nach Pneumokokkeninfektion zur Folge<sup>105</sup>. Ursächlich hierfür schien eine deutlich reduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu sein. Im Vergleich zu Mäusen, die mit *E. coli* infiziert wurden, zeigte sich die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen hauptsächlich durch TNF $\alpha$ /IL-1 vermittelt. Während die mit *E. coli* infizierten Mäuse von der Zytokinblockade in Bezug auf eine reduzierte inflammatorische Lungengewebsschädigung profitierten, äußerte sich die TNF $\alpha$ /IL-1-Rezeptordefizienz bei Pneumokokkeninfektionen nur nachteilig im Sinne einer insuffizienten Erregerelimination<sup>105</sup>.

Insbesondere die Rolle von TNF $\alpha$  in der Abwehr von *S. pneumoniae* wurde vielfach durch den Einsatz von TNF $\alpha$ -Antikörpern untersucht: Es zeigte sich, dass das Risiko einer invasiven Pneumokokkeninfektion sowie die Letalität unter TNF $\alpha$ -Blockade signifikant steigt<sup>106–110</sup>.

### 1.2.7 Auswirkung einer pulmonalen Hyperinflammation

Die Ausbildung einer pulmonalen Inflammation ist entscheidend für eine effektive Abwehr eindringender Erreger, gleichzeitig kann das inflammatorische Geschehen jedoch zur Lungengewebschädigung führen und so maßgeblich zur Pathophysiologie einer Lungenentzündung beitragen. Die Prognose einer CAP hängt daher nicht nur von der Virulenz des Pathogens, sondern insbesondere vom Ausprägungsgrad der pulmonalen Entzündungsreaktion ab<sup>81</sup>. Die Akkumulation eines proteinreichen Plasmaexsudats im Alveolarraum als nicht kardiales, inflammatorisches Lungenödem mit konsekutiver Hypoxämie ist ein Charakteristikum des akuten Lungengewebschadens in Folge einer pulmonalen Hyperinflammation<sup>81</sup>. Pulmonale Infektionen gelten dementsprechend als häufigste zugrunde liegende Ätiologie eines *Acute respiratory distress syndrome*, ARDS<sup>111</sup>. Dieses wird klinisch definiert durch den akuten Beginn, bilaterale Infiltrate in der thorakalen Bildgebung, ein nicht kardiales Lungenödem, ein  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$  als Ausdruck der Oxygenierungsstörung sowie klinische Entzündungszeichen wie Fieber, Leukozytose/Leukopenie und purulentes Sputum<sup>111</sup>. Pathophysiologisch führt eine überschießende Inflammation zu einer vermehrten Permeabilität der alveolo-endothelialen Barriere sowie zum Lungengewebschaden durch unkontrolliert freigesetzte Substanzen aktivierter Entzündungszellen wie Zytokine, Chemokine und reaktive Sauerstoffradikale<sup>112,113</sup>. Hierbei scheinen NF- $\kappa$ B abhängige Signalwege eine zentrale Rolle zu spielen. So zeigten Cheng *et al.* am murinen Modell, dass eine persistierende NF- $\kappa$ B-Aktivierung auch ohne Infektion im pulmonalem Lungenepithel ausreichte, um die Charakteristika eines ARDS zu provozieren<sup>114</sup>. In transgenen Mäusen, die eine konstitutiv aktive Form der I $\kappa$ B Kinase 2 (IKK2, ein NF- $\kappa$ B-Aktivator) unter der Kontrolle des Epithel spezifischen CC10-Promotor exprimierten, führte die verstärkte und prolongierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu einer dysregulierten Inflammation und kulminierte in einer schweren Lungengewebschädigung. Dahingegen zeigte sich in transgenen Mäusen, die einen dominanten NF- $\kappa$ B-Inhibitor exprimierten, eine abgeschwächte neutrophile pulmonale Inflammation und reduzierte Mortalität nach Stimulation mit gramnegativen Zellwandbestandteilen<sup>114</sup>.

In einer anderen Studie an ARDS-Patienten wurde in einem *ex vivo* Modell an Plasmaproben das Verhältnis der NF- $\kappa$ B-/GR $\alpha$ -Aktivierung in Korrelation zum Schweregrad und Verlauf der Lungenschädigung von Meduri *et al.* untersucht<sup>115</sup>. Denn die GC-GR $\alpha$ -Signalkaskade gilt allgemein als wichtigster natürlicher Gegenspieler von Entzündungsreaktionen<sup>116,117</sup>. In der genannten Studie wurden naive Leukozyten (*Peripheral blood leucocytes*, PBL) von gesunden Probanden mit Plasma von den ARDS-Patienten mit unterschiedlichem Krankheitsschweregrad

## Einleitung

stimuliert. Anhand von klinischen und laborchemischen Kriterien wie dem Lungenparenchym Schädigungsindex (*Lung injury score*, LIS), der Konzentration proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ) im Plasma und der Konzentration zirkulierender GC wurden die ARDS-Patienten in drei Gruppen unterteilt: 1) Patienten mit klinischer Verbesserung in der ersten Woche (*Improver*), 2) Patienten, die sich klinisch in der ersten Woche nicht verbesserten, aber überlebten (*Non-improver-survivor*) und 3) Patienten, die sich klinisch nicht verbesserten und auch nicht überlebten (*Non-improver-non-survivor*). Es zeigte sich in den Gruppen 2) und 3) ein verschobenes Verhältnis des NF- $\kappa$ B-/GR $\alpha$ -Aktivierungsverhältnisses zu Gunsten der NF- $\kappa$ B-Aktivität trotz hoher Konzentration an zirkulierenden GC im Patientenplasma. Dies wurde als Ausdruck einer dysregulierten Inflammation mit der Folge einer relativen GC-Resistenz durch eine NF- $\kappa$ B induzierte GR $\alpha$ -Inhibition gewertet<sup>115</sup>. Schlussfolgernd ist demnach neben einer schnellen und effektiven Immunreaktion zur Abtötung des eindringenden Pathogens eine antiinflammatorische Gegenregulation entscheidend für den klinischen Verlauf einer Pneumonie<sup>81,118</sup>.

Vor diesem Hintergrund erscheint es vielversprechend, das konventionelle Therapiekonzept der CAP, bestehend aus der Erregerelimination durch Antibiotika, um immunmodulatorische Substanzen zu erweitern, um somit die schädigende Hyperinflammation einzudämmen und dadurch die Prognose einer CAP günstig zu beeinflussen<sup>118,119</sup>.

Über die endogenen regulierenden Mechanismen zur Terminierung einer Entzündungsreaktion ist wenig bekannt<sup>81,120,121</sup>. GC sind endogene Hormone, die neben einer hochpotenten antiinflammatorischen Wirkung die Auflösung einer Entzündungsreaktion vorantreiben, indem sie z.B. eine nicht phlogistische Phagozytose apoptotischer Entzündungszellen induzieren<sup>120,121</sup>. Aus diesem Grund sind GC in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen wie Asthma bronchiale, RA und CED bereits seit Langem etabliert<sup>122,123</sup>.

Im Rahmen von klinischen Studien wurde der Einsatz von GC in der adjunktiven Therapie der schweren CAP ebenfalls adressiert, jedoch ohne überzeugenden positiven Effekt in Bezug auf Krankheitsprogress und Letalität<sup>124-126</sup>. Zum jetzigen Zeitpunkt wird der Einsatz von GC in der Pneumonietherapie daher nicht empfohlen. Es bleibt aber von hohem Interesse welche Mechanismen der zugrundeliegenden Pathophysiologie verhindern, das GC einen entscheidenden antiinflammatorischen Effekt auf den Verlauf einer Pneumonie zeigen. Diese Frage ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Im Weiteren soll zunächst die molekulare Funktionsweise von GC und deren Bedeutung in der Regulation von Inflammation näher beschrieben werden.

### 1.3 Glucocorticoide

Cortison bzw. dessen biologisch aktive Form Cortisol gehört zur Gruppe der Steroidhormone, die in der Nebennierenrinde produziert werden und daher als Corticosteroide bezeichnet werden<sup>127-129</sup>. Zu den Corticosteroiden gehören GC, Mineralcorticoide und die Sexualhormone<sup>128</sup>. Als Vorstufe aller Steroidhormone dient Cholesterol<sup>128</sup>.

Der Cortisoltransport im Plasma erfolgt gebunden an das Cortisol bindende Globulin (GBG), welches die Verteilung und Abgabe von Cortisol zum Zielgewebe ermöglicht<sup>130</sup>. Als lipophiles Hormon kann GBG ungebundenes Cortisol die Zielzellmembran frei passieren<sup>129,131</sup>. Die Bioverfügbarkeit innerhalb der Zelle wird durch zwei entgegengesetzt wirkende Enzyme kontrolliert<sup>130</sup>. Die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 2 (11 $\beta$ HSD2) oxydiert Cortisol in seinen inaktiven Metabolit Cortison, während die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Typ 1 (11 $\beta$ HSD1) Cortison zu Cortisol konvertieren kann<sup>130,132</sup>. Das Expressions- und Aktivitätsniveau der beiden Enzyme trägt zur Gewebesensitivität gegenüber GC bei<sup>130</sup>.

Neben wichtigen Funktionen im Glucose-, Protein- und Fettstoffwechsel sowie dem Einfluss auf Wachstum und Entwicklung sind es insbesondere die immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Effekte, die den GC als Medikament einen herausragenden Stellenwert verschafften<sup>128,129,131</sup>. Zu den antiinflammatorischen Effekten von GC gehören die Beeinträchtigung der Funktion von primären und sekundären Immunzellen sowie die Inhibition von Zytokin induzierten inflammatorischen Signalkaskaden<sup>117,123,133</sup>. Seit seinem ersten erfolgreichen Einsatz in der Therapie einer an RA erkrankten Patientin im Jahr 1948 durch Phillip Showalter Hench wird Cortison vielfach in der Therapie inflammatorischer Erkrankungen eingesetzt<sup>117,127,128</sup>.

Die physiologische Regulation der Corticosteroidfreisetzung unterliegt dem Regelkreis der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse<sup>129</sup>. Die pulsatile Freisetzung von corticotropinreleasenden Hormon (*Corticotropin-releasing hormone*, CRH) aus dem Hypothalamus stimuliert die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse<sup>134</sup>. ACTH wiederum nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Corticosteroid Freisetzung aus der Nebennierenrinde ein<sup>134</sup>. Inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induzieren die Freisetzung von CRH, was über die vermehrte Freisetzung von ACTH zur Produktion und Ausschüttung von GC aus der Nebennierenrinde führt<sup>123,134</sup>. Die antiinflammatorischen Effekte auf die aktivierten Immunzellen resultieren in einer klassischen endokrinen Rückkopplungsschleife zur Terminierung der Inflammation<sup>123</sup>.

## Einleitung

Vermittelt werden die Effekte der GC über die Bindung an den zytosolischen GR, der als Transkriptionsfaktor seine Funktion über die Regulierung von GC abhängigen Genen ausübt<sup>117</sup>. Der GR gehört als Steroidhormon Rezeptor zur Superfamilie der Liganden aktivierten Transkriptionsfaktoren<sup>131</sup>. Neben dem GR gehören hierzu der Mineralcorticoid Rezeptor (MR), der Progesteron Rezeptor (PR), der Östrogen Rezeptor (ER) und der Androgen Rezeptor (AR)<sup>131</sup>. Allen gemeinsam ist der strukturelle Aufbau, bestehend aus einer zentralen Zinkfinger DNA-Bindungsdomäne (DBD), einer Carboxyl terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD), welche die nukleären Lokalisierungssignale sowie die Liganden abhängige Aktivierungs-Funktions-Domäne 2 (AF-2) enthält, und einer variablen aminoterminalen Domäne, welche die Aktivierungs-Funktions-Domäne 1 (AF-1) bildet (siehe Abb. 2.4)<sup>131</sup>.



**Abb. 1.5: Schematische Darstellung des GR.**

Zentrale DNA-Bindungsdomäne, DBD, Carboxyl terminale Liganden Bindungsdomäne, LBD, mit der AF-2, variable aminoterminal Domäne, NTD, mit der AF-1. Übernommen von Heitzer *et al.*, 2007<sup>131</sup>.

Durch alternatives Splicing desselben Gens werden zwei GR-Isoformen gebildet, GR $\alpha$  und GR $\beta$ <sup>123,135</sup>. Hierbei stellt der GR $\alpha$  die Liganden bindende Isoform dar, die als Transkriptionsfaktor die GC-Wirkungen vermittelt<sup>123,131</sup>. Die GR $\beta$ -Isoform unterscheidet sich von der GR $\alpha$ -Isoform im Carboxyl terminalen Ende und hat keine Ligandenbindungsfähigkeit<sup>123,135</sup>. Die GR $\beta$ -Isoform scheint die negative Regulation der GR $\alpha$ -Isoform zu sein<sup>135,136</sup>.

Durch alternative Translations-Initiierungs-Mechanismen werden durch beide GR-Genprodukte weitere GR-Isoformen gebildet<sup>137</sup>. Diese GR-Isoformen weisen ein gewebsspezifisches Expressionsmuster auf und scheinen dementsprechende gewebsspezifische GC-Effekte zu vermitteln<sup>137</sup>. Im Weiteren soll auf die biologische Funktion der beiden GR-Isoformen im Detail eingegangen werden.

### 1.4 Glucocorticoid Rezeptor $\alpha$

In Abwesenheit des Liganden liegt der GR $\alpha$  gebunden an einen Multiproteinkomplex, bestehend aus den Heat-Shock Proteinen -70 und -90 (HSP70/ HSP90) und mehreren Ko-Chaperonen wie Hip (Hsp70 interagierendes Protein), Hop (Hsp70-/Hsp90 organisierendes Protein), HSP40 und

## Einleitung

p23, im Zytosol vor<sup>138</sup>. Die Funktion des Rezeptors wird in jedem Schritt der GR $\alpha$ -Signalkette, von der Proteinfaltung über die Ligandenbindung, die Kerntranslokation bis hin zur Transkriptionsaktivierung und schließlich Rezeptordegradation von den Proteinen der Chaperonmaschinerie reguliert<sup>139</sup>.

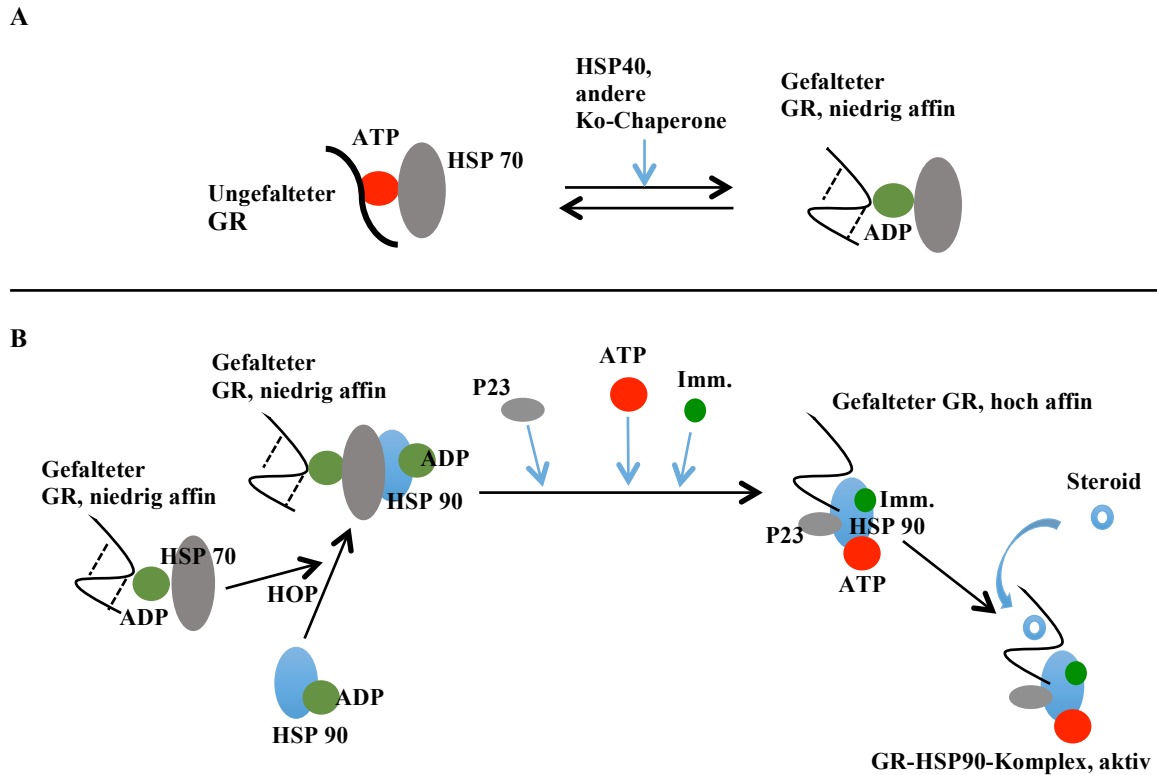
Die initiale Proteinfaltung von neu synthetisiertem GR $\alpha$  zu einer stabilen Konformation mit niedriger Ligandenaffinität erfolgt in einem ATP abhängigen Prozess durch den Hsp70-Komplex<sup>140</sup>. Die weitere Proteinreifung und Überführung in einen Zustand mit hoher Ligandenaffinität wird durch Hsp90 und seine Ko-Chaperone reguliert<sup>138</sup>. Hierfür wird der GR $\alpha$  durch das Ko-Chaperon Hop von Hsp70 zu Hsp90 überführt<sup>141</sup>. Ohne Hsp90 hat der GR $\alpha$  eine 100fach geringere Affinität zu GC, wie in Steroid Bindungsversuchen demonstriert werden konnte<sup>142</sup>. Durch die Hsp90-Assoziation wird in einer weiteren Konformationsänderung die Ligandenbindungsdomäne am GR $\alpha$  freigegeben, was die Voraussetzung zur GC-Bindung darstellt<sup>139</sup>. Stabilisiert wird dieser Komplex wiederum ATP abhängig durch das Ko-Chaperon p23<sup>139</sup>.

Die GR $\alpha$ -Kerntranslokation wird ebenfalls durch den Hsp90-Komplex reguliert<sup>138,143</sup>. In einem Heterokomplex mit Hsp90, p23 und dem Immunophilin FKBP52 bewegt sich der GR $\alpha$  nach Ligandenbindung entlang des zytoskeletalen Mikrotubulussystems zum Zellkern, wo die Kerntranslokation durch einen nukleären Porenkomplex (*Nuclear pore complex*, NPC) erfolgt<sup>143-145</sup>. Voraussetzung hierfür ist die Bindung des Immunophilin FKBP52, welches die Verbindung des GR $\alpha$ -Heterokomplexes zu dem Mikrotubulussystem über das Motorprotein Dynein herstellt<sup>144,145</sup>.

Die GR $\alpha$ -Kerntranslokation durch den NPC wird ermöglicht durch die Bindung an Importine (Importin 7; 8 und 13)<sup>143</sup>. Es handelt sich hierbei um Proteine, die den nukleären Transport von Frachtproteinen durch Bindung an deren nukleären Lokalisationssequenzen (NLS) ermöglichen<sup>143,146</sup>. Im Zellkern erfolgt die Dissoziation des Frachtproteins von seinem Importin durch die Bindung an Guanin-Nukleotid bindendes Protein Ran (Ran-GTP)<sup>146</sup>.



## Einleitung



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der GR $\alpha$ -Proteinfaltung und Überführung in die Liganden bindende Form.**

**A:** In einem ATP abhängigen Prozess erfolgt die GR $\alpha$ -Bindung an den HSP70-Komplex. Das ungefaltete GR $\alpha$ -Protein wird an den HSP70-Komplex gebunden und in einem ATP abhängigen Prozess in eine stabile, aber Liganden nichtaffine Form überführt. Bei diesem Vorgang sind Ko-Chaperone wie HSP40, Hip und Chip beteiligt (in diesem Schaubild nicht detailliert beschrieben).

**B:** Reifung des GR $\alpha$ -Proteins zur Liganden bindenden Form mit Hilfe von HSP90. Der GR $\alpha$ -HSP70-Komplex bindet an HSP90 durch die Hilfe vom Ko-Chaperon Hop. In einem weiteren Schritt bindet der HSP90-Komplex ATP, Immunophilin FKBP52 (Imm.) und p23, wodurch sich Hop und der HSP70-Komplex lösen. Hierdurch erfolgt eine weitere Stabilisierung des GR $\alpha$ -Proteins und die Liganden Bindungsdomäne wird freigelegt. In dieser dynamisch aktiven Form nach Ligandenbindung, kann der Transport des Gesamtkomplexes in den Zellkern erfolgen. Weitere Zwischenschritte und beteiligte Ko-Chaperone sind in dieser schematischen Abbildung nicht aufgeführt. Die Abbildung wurde modifiziert aus Grad *et. al.*, 2007, übernommen<sup>138</sup>.

### 1.4.1 Antiinflammatorische GR $\alpha$ -Signaltransduktion

Im Zellkern nimmt der GR $\alpha$  regulierenden Einfluss auf die Transkription seiner Zielgene. Die Bindung an GR Response Elemente (GRE) in der Promotorregion GC induzierbarer Gene sowie die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren führen zur Aktivierung von Genen<sup>122,147</sup>. Beide Prozesse werden als Transaktivierung bezeichnet. Die inhibitorische Wirkung des GR $\alpha$  auf die Gentranskription wird Transrepression genannt<sup>122</sup>. Antiinflammatorische Proteine wie die

## Einleitung

MAPK hemmenden Phosphatasen Dual spezifische Phosphatase 1 (*Dual-specificity phosphatase 1*, Dus-1) und die Map Kinasen Phosphatase 1, MKP-1 werden beispielsweise durch GRE-Aktivierung induziert<sup>122,148</sup>.

GRE sind kurze Nukleotidsequenzen in den Promoterregionen von GC regulierten Genen. Vier verschiedene GRE-Typen sind beschrieben. Sie unterscheiden sich darin, ob sie die Transkription des nachfolgenden Gens aktivieren oder hemmen<sup>149</sup>. Allen gemeinsam ist eine unvollkommene palindromische Basenpaarabfolge, geteilt durch drei variable Basenpaare<sup>149-151</sup>. Der Bindung des GR an ein GRE folgt die Formatierung des Transkriptions Initiierungskomplexes über die Interaktion der Aktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 mit der RNA Polymerase II und verschiedenen Transkriptions Ko-Faktoren<sup>123,149</sup>. Einige Transkriptions Ko-Faktoren besitzen Histon Acetyltransferase Aktivität (HAT), welche über Chromatindekondensation die zu transkribierende DNA freigibt und darüber hinaus die Bindung und Dissoziation der Ko-Faktoren an die Response Elemente und den Rezeptor moduliert<sup>150,152</sup>. Die GR $\alpha$ -Bindung von negativen GRE (nGRE) führt zur Transkriptionshemmung des folgenden Gens<sup>123</sup>.

Die antiinflammatorische Wirkung von GC wird jedoch hauptsächlich über die nukleäre Protein-Protein Interaktion des GR $\alpha$  mit inflammatorischen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B oder AP-1, vermittelt<sup>123</sup>. Durch die Rezeptorinteraktion werden die inflammatorischen Transkriptionsfaktoren an der Bindung an ihre DNA-Response Elemente gehindert, was eine Inhibition der Transkription proinflammatorischer Gene zur Folge hat<sup>117,149,150,153</sup>. Dieses Modell der antiinflammatorischen Wirkung vom GR $\alpha$  ist am besten untersucht und stellt die molekulare Grundlage der GC vermittelten Inhibition einer Vielzahl inflammatorischer Mediatoren dar, wie z.B. IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$ <sup>147</sup>. Diese inhibitorische Rezeptor-Rezeptor Interaktion ist beiderseits möglich<sup>123</sup>. Als eine Erklärung der GC-Resistenz in Patienten mit CED gilt beispielsweise die nukleäre GR $\alpha$ -Hemmung durch eine Überexpression von NF- $\kappa$ B im Darmepithel<sup>154</sup>.

Über die genannten molekularen Interventionsmechanismen nehmen GC zellspezifisch Einfluss auf die verschiedenen Immunzelltypen wie Makrophagen, dendritische Zellen, Neutrophile Granulozyten, B- und T-Zellen. Hierzu zählen die Inhibition von Zytokinproduktion, Induktion von Apoptose in Entzündungszellen, Inhibition von Entzündungszellmigration, Induktion von nicht entzündlicher Phagozytose apoptotischer Zellen sowie Differenzierung von Entzündungszellen zu antiinflammatorischen und immuntoleranten Phänotypen<sup>122</sup>.

### 1.4.2 Posttranslationale GR $\alpha$ -Modifikationen

Die GR $\alpha$ -Aktivierung erfolgt primär über die Ligandenbindung. Darüber hinaus kann der Rezeptor jedoch auch über Phosphorylierung und Dephosphorylierung in seiner Aktivität modifiziert werden<sup>143,155</sup>. An drei Serinresten in der N-terminalen Rezeptorregion erfolgt eine GR $\alpha$ -Modifikation durch Phosphorylierung: S203, S211, S226. Hierbei scheint die Phosphorylierung an S203 und S211 die GR-Transkriptionsaktivität zu verstärken, während die Phosphorylierung an S226 die transkriptionelle Aktivität von GR $\alpha$  zu hemmen scheint<sup>156</sup>. Zu den GR $\alpha$  modifizierenden Kinasen gehören Cyklin abhängige Kinasen (*Cycline dependent kinases*, CDKs) und MAPK<sup>157</sup>. Die MAPK JNK z.B. übt über die Phosphorylierung an S226 einen inhibitorischen Effekt auf die GR $\alpha$ -Aktivität aus und verstärkt zudem den nukleären GR $\alpha$ -Export<sup>157</sup>. Eine GR $\alpha$ -Hyperphosphorylierung durch MAPK wurde als möglicher Mechanismus einer GC-Resistenz bei Asthmapatienten angenommen<sup>158</sup>.

Eine weitere posttranslationale Modifikation am GR $\alpha$  stellt die Ubiquitinierung des Rezeptors und damit die Markierung für den Ubiquitin Proteasom Signalweg zur Rezeptordegradation dar<sup>129,159</sup>. Liganden induziert kommt es zu einer vermehrten Rückregulation von GR $\alpha$ <sup>123</sup>. Die Proteasom Signalkaskade scheint im Liganden induzierten GR $\alpha$ -Abbau einen zentralen Stellenwert zu haben, wie A. D. Wallace und J. A. Cidlowski in einer *in vitro* Studie an COS-1 Zellen zeigen konnten<sup>159</sup>. Es ist jedoch bislang nicht genau geklärt, durch welche Mechanismen der GR $\alpha$ -Abbau kontrolliert wird. Es bestehen Hinweise, dass der Phosphorylierungsstatus eine entscheidende Rolle in der Regulation des GR $\alpha$ -Expressionsniveaus spielen könnte<sup>160</sup>.

### 1.5 Glucocorticoidrezeptor $\beta$

Genau wie die GR $\alpha$ -Splicingform wird die GR $\beta$ -Isoform ubiquitär exprimiert und ist in den ersten 727 von 742 Aminosäuren identisch mit der GR $\alpha$ -Isoform<sup>135,161</sup>. Die beiden Splicingvarianten unterscheiden sich lediglich im C-terminalen Ende, im Bereich der LBD und AF-2, ohne die eine GC-Bindung und direkte GRE-Regulation nicht möglich sind<sup>135</sup>. Durch die Konkurrenz um die Bindung an GRE mittels der DBD, die Dimerisation mit dem GR $\alpha$  sowie die Inhibition der Bindung von Transkriptions Ko-Faktoren übt der GR $\beta$  jedoch einen dominant negativen Effekt auf den GR $\alpha$  aus<sup>135,162,163</sup>. Ein erhöhtes GR $\beta$ -Expressionsniveau wurde daher vielfach für eine dysregulierte Immunfunktion in chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie bspw. GC resistentem Asthma bronchiale, RA und systemischem Lupus erythematosus (SLE) verantwortlich gemacht<sup>135,164-166</sup>. Proinflammatorische Zytokine könnten einen Einfluss auf das GR $\alpha$ -/GR $\beta$ -Verhältnis zu Gunsten des GR $\beta$ -Expressionsniveaus haben<sup>135</sup>. Webster *et al.*

demonstrierten im Zellversuch, dass das GR $\beta$ -Expressionsniveau Zytokin induziert anstieg. Die Stimulation von Epithelzellen und Lymphozyten mit IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  führte NF- $\kappa$ B vermittelt zu einer vermehrten GR $\beta$ -Transkription über die Aktivierung eines NF- $\kappa$ B-Response Elements im Promoter des hGR-Gens<sup>167</sup>.

Auch mikrobielle Superantigene, wie das Staphylokokken Enterotoxin, scheinen die Expression von GR $\beta$  zu induzieren und hiermit zur GC-Resistenz in mikrobiell getriggerten, inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale oder atopischer Dermatitis beizutragen. P. J. Hauk und Kollegen konnten in einer Studie an mononukleären Zellen (PBMCs) zeigen, dass die Stimulation mit Staphylokokken Exotoxin B (SEB) zu einer Resistenz gegenüber der antiproliferativen Wirkung von Dexamethason (Dex) führte und dass weiterhin eine vermehrte GR $\beta$ -Expression für diese GC-Resistenz verantwortlich zu sein scheint<sup>168</sup>.

### 1.6 Glucocorticoide in der Therapie der CAP

GC haben als endogene Hormone eine potente antiinflammatorische Wirkung und eine physiologische Funktion in der Regulation von Reaktionen des angeborenen Immunsystems<sup>117</sup>. Sie werden daher nicht nur in der Therapie chronisch inflammatorischer Erkrankungen, sondern auch in der adjunktiven Therapie infektiöser Erkrankungen, die mit einer schädigenden Hyperinflammation, wie der bakteriellen Meningitis, des Vasopressor insensitiven septischen Schocks oder der *Pneumocystis jiuiveci* Pneumonie einhergehen, eingesetzt<sup>123,169–171</sup>.

Der Verlauf pulmonaler Pneumokokkeninfektionen ist ebenfalls geprägt durch eine starke Immunreaktion. Die Prognose des Patienten ist daher über die Erregerelimination hinaus entscheidend abhängig von der Ausprägung bzw. der Regulation der pulmonalen Inflammation<sup>126</sup>. Seit den 1950er Jahren wird der adjunktive Einsatz von GC in der Therapie der CAP diskutiert und in klinischen Studien geprüft<sup>124,125,172–175</sup>.

Untersuchtes Patientenkollektiv der verschiedenen Studien waren meistens Patienten mit einer sCAP, definiert durch den CRB65-Index bzw. den Pneumonie Schweregrad Index (*Pneumonia Severity Index*, PSI)<sup>115,124,126,174,176–178</sup>. Als klinische Endpunkte wurden u.a. die Oxygenierung, eingeschätzt durch den Horowitz Index ( $p_aO_2/F_iO_2$ ), und die Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung, Länge des Krankenhausaufenthaltes, Konzentration inflammatorischer Zytokine im Plasma und Mortalität definiert<sup>124,126,176,179,180</sup>. Eingesetzte GC-Therapieregime variierten zwischen Langzeit niedrigdosierten Hydrocortisongaben als kontinuierliche Infusion und täglichen Einmalgaben von Dex oder Prednisolon<sup>116,124,172,180,181</sup>.

So konnte z.B. in einer retrospektiven Einzel Zentrum Studie an 308 Patienten in Spanien mit einer sCAP eine signifikante Reduktion der Mortalität unter GC-Therapie (24 mg

## Einleitung

Methylprednisolon/Tag oder 30 mg Prednisolon/Tag) im Vergleich zur alleinigen Antibiotikatherapie demonstriert werden<sup>177</sup>.

In einer holländischen Studie konnte an 304 CAP- und sCAP-Patienten eine signifikante Verkürzung der Krankenhausbehandlung unter einer adjunktiven GC-Therapie (Dex, 5 mg/Tag) im Vergleich zu Plazebo gezeigt werden<sup>182</sup>.

Confalonieri und Kollegen untersuchten in einer Multi Zentrum Studie an 46 Patienten mit einer sCAP die Effekte einer siebentägigen Hydrocortisontherapie und kamen zu dem Ergebnis, dass die adjunktive GC-Gabe zu einer Verbesserung des klinischen Verlaufs bzgl. Oxygenierung und Dauer einer mechanischen Beatmung, Organdysfunktion, Inzidenz eines septischen Schocks, Länge der intensivmedizinischen Behandlung und Überleben nach Krankenhausentlassung im Vergleich zu Plazebo führte<sup>116</sup>.

Der Einsatz von Methylprednisolon zeigte auch Einfluss auf die Zytokinexpression in einer Studie an ARDS-Patienten mit einer sCAP<sup>180</sup>. Unter der Therapie mit Methylprednisolon zeigte sich eine signifikante Reduktion inflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  im Serum im Vergleich zu Plazebo. Leukozyten von gesunden Probanden, die mit Plasma von mit GC behandelten ARDS-Patienten stimuliert wurden, zeigten als zelluläres Korrelat der antiinflammatorischen GC-Wirkung eine vermehrte Aktivierung von  $\text{GR}\alpha$ , gemessen an der  $\text{GR}\alpha$ -GRE-Bindung, der  $\text{GR}\alpha$ -Bindung an  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  und der Stimulation des  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -inhibierenden Proteins  $\text{I}\kappa\text{B}$ <sup>180</sup>.

Trotz dieser vielversprechenden Daten kann der Einsatz von GC in der CAP-Therapie derzeit nicht empfohlen werden, denn Metaanalysen klinischer Studien erbrachten insgesamt uneinheitliche Ergebnisse bzgl. des Nutzens von GC in der Therapie der CAP<sup>124,175,176</sup>. In der Auswertung wurde insbesondere die Heterogenität der untersuchten Patientenkollektive bezogen auf Schweregrad der Pneumonie, Komorbiditäten wie Nebennierenrindeninsuffizienz, Asthma und COPD, Auswahl des eingesetzten Antibiotikums und kausatives Erregerspektrum kritisiert<sup>124,176,181</sup>.

In einer holländischen Studie an 213 Patienten mit einer CAP konnten Snijders et al. keine Verbesserung bzgl. des klinischen Verlaufs einer Pneumonie durch den Einsatz von 40 mg Prednisolon/Tag über sieben Tage feststellen<sup>176</sup>. Im Gegenteil zeigte sich sogar eine Tendenz zu einer besseren Heilungsrate, bezogen auf klinische Parameter, in der Plazebogruppe. Darüber hinaus kam es in der Prednisolongruppe zu einem erneuten Anstieg des CRP-Niveaus nach Absetzen der GC-Therapie, welches als Rückfall der Inflammation und Spätversagen interpretiert wurde. Dies war teilweise verbunden mit erneuten Infektionen, dem Bedarf einer

## Einleitung

erneuten Antibiotika- und Prednisolontherapie und Komplikationen wie z.B. einem Pleuraerguss und -empyem<sup>176</sup>.

Das Phänomen einer erworbenen GC-Resistenz in der Therapie chronisch inflammatorischer Erkrankungen wie RA, CED, Asthma bronchiale und COPD erhält aufgrund der hierdurch entstehenden Barriere gegenüber effektiven Therapiemöglichkeiten bereits seit Längerem vermehrte Aufmerksamkeit in der Literatur. Verschiedene molekulare Mechanismen, die eine GC-Resistenz hervorrufen, wurden identifiziert. Hierzu gehören die Aktivierung von MAPK-Wegen, vermehrte Expression vom GR $\beta$  und vermehrte Aktivierung von inflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B<sup>153,183,184</sup>. Auch das Auftreten von mikrobiell verursachten GC-Resistenzen wurde beschrieben<sup>184,185</sup>. Bspw. wurde der Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien mehrfach mit dem Auftreten von GC-Resistenzen ursächlich in Zusammenhang gebracht<sup>185,186</sup>. Auch Toxine grampositiver Bakterien, wie das Bacillus anthracis lethal Toxin (LeTx) sowie das Clostridium difficile Toxin A, wurden angeschuldigt eine GC-Resistenz verursachen zu können<sup>187,188</sup>. Die Auswirkung von Pathogenen im Rahmen einer CAP auf die GC-GR $\alpha$ -Signalkaskade und möglicherweise damit einhergehende GC-Resistenz wurde allerdings nach dem jetzigen Kenntnisstand der aktuellen Literatur noch nicht adressiert.

### 1.7 Fragestellung

Die ambulant erworbene Pneumonie stellt als häufige Infektionskrankheit aufgrund der mit ihr verbundenen hohen Morbidität und Letalität nach wie vor eine große sozioökonomische Belastung dar. Ursache für das häufige Versagen herkömmlicher Therapiekonzepte stellt neben wachsenden Antibiotika Resistenzzahlen eine dysregulierte pulmonale Inflammation dar, die zu Gewebsschäden mit der Folge lebensbedrohlicher Oxygenierungsstörungen, Sepsis und Tod führen kann. Der adjunktive Einsatz von hochpotenten, antiinflammatorischen GC im Rahmen klinischer Studien an CAP-Patienten hat in den letzten 50 Jahren keinen eindeutigen Erfolg gezeigt. Der molekulare Mechanismus für eine mögliche GC-Resistenz in Pneumoniepatienten ist nicht hinreichend erforscht und bezog bisher nicht die mögliche Bedeutung auslösender Erreger in die Ursachenbetrachtung mit ein.

Es ergaben sich vor diesem Hintergrund folgende Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden:

1. Hemmen *S. pneumoniae* den GR $\alpha$ -Signalweg in pulmonalen Epithelzellen?
2. Welche zellulären Mechanismen sind in eine potentielle Inhibition des GR-Signalwegs involviert?
3. Welche Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* sind für die potentielle GR $\alpha$ -Inhibition verantwortlich?
4. Handelt es sich möglicherweise um einen erregerspezifischen Mechanismus?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Bei allen hier nicht extra aufgeführten Materialien handelt es sich um in Forschungslaboratorien üblicherweise eingesetzte Substanzen, die den entsprechenden analytischen Reinheitsgraden entsprechen. Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Assays, wie ELISA oder RNA-Aufreinigung, werden hier nicht extra gelistet. Die Methodik erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen werden im Kapitel „Material“ an entsprechender Stelle vermerkt.

#### **2.1.1 Humane Alveolar Typ II Epithelzellen, Zelllinie A549**

Die humane AEC-II-Zelllinie A549 wurde bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ, Braunschweig) erworben. Die Ursprungszellen entstammen einer humanen Lungenkarzinomzelllinie, die durch Explantatkultur aus karzinomatösem Lungengewebe eines 58-jährigen kaukasischen Mannes im Jahre 1972 gewonnen wurden<sup>189,190</sup>. Eingesetzte Zellen befanden sich in der Passage 5 bis 30.

#### **2.1.2 Primäre humane Alveolar Typ II Epithelzellen, phAEC II**

Die phAEC II wurden aus tumorfreien Lungengewebeproben von Patienten, die sich einer Lungenteilresektion aufgrund eines Lungenkarzinoms unterziehen mussten, isoliert. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 69,7 +/- 2,1 Jahre. Als Ausschlusskriterium für die Studienteilnahme galt eine zuvor diagnostizierte pulmonale Infektion. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Protokollnummer EA2/050/08 und EA2/ 023/07) genehmigt. Die für die phAEC-II-Isolation verwandten Lungengewebezylinder hatten einen Mindestabstand von fünf Zentimetern zu dem Tumorgewebe.

#### **2.1.3 Human embryonic kidney cells, HEK293**

Die HEK293-Zellen wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ erworben. Die Zellen stammen von humanen Nierenzellen eines gesunden Embryos, die mit einem Adenovirus transformiert wurden, so dass ungefähr 4,5 Kb des viralen Genoms in das menschliche Chromosom 19 der HEK293-Zellen integriert wurden. Ursprünglich erfolgte die Zellkultivierung durch Herrn A. Van der Erb in den frühen 1970er Jahren. Die Transformation wurde durch Herrn F. Graham durchgeführt. Der Name HEK293 entstand, da es sich um Herrn Grahams 293. Experiment handelte<sup>191</sup>.



### 2.1.4 Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen

Sämtliche für die Anzucht und Weiterverarbeitung der verschiedenen Zelllinien in dieser Arbeit verwandten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen wurden von der Firma Falcon bezogen. Die Zellkulturplatten für die Life-Cell Mikroskopie wurden von der Firma Ibidi bezogen.

### 2.1.5 Zellkulturmedien, Kryomedien und Isolationsreagenzien

#### Alveolar Typ II Epithelzellen der Zelllinie A549

Zellmedium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Kulturmedium	Ham's F12, 500 ml FCS, 10%*	PAA Gibco
Stimulationsmedium	Ham's F12, 500 ml FCS, 2%	PAA Gibco
Kryokonservierungsmedium	Ham's F12, 500 ml FCS, 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), 10%	PAA Gibco Sigma

**Tabelle 2.1: Kulturmedium, Stimulationsmedium und Kryokonservierungsmedium für A549-Zellen**

\*Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren wurde das in der Zellkultur verwandte FCS bei 56° C für 30 Min. erhitzt.

#### Primäre humane Alveolar Typ II Epithelzellen, phAEC II

Zellmedium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Kulturmedium	RPMI, 500 ml FCS, 10%	PAA Gibco
Stimulationsmedium	RPMI 1640 mit Glutamin, 500 ml BSA, 0,3% Glutamin 0,1%	PAA Gentauer (PAA) Biochrom
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS, 30 ml FBS, 0,5% EDTA, 0,2 mM	PAA PAA Roth
Waschlösung	HBSS, 500 ml	Sigma

**Tabelle 2.2: Kultur- und Stimulationsmedium, Isolationsreagenzien für phAEC II**

### HEK293 Zellen

Zellmedium	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Kulturmedium	Hyclone DMEM high glucose FCS, 10 % Glutamin 0,1% Penicillin-Streptomycin	Thermoscientific Thermoscientific Gibco Biochrom Biochrom

Tabelle 2.3: Kultur- und Stimulationsmedium für HEK293-Zellen

### Transduktion

Vektoren, Verpackungsplasmide, Detergenzien	Funktion	Bezugsquelle
pLenti-CMV GFP Puro	Transfervektor	Addgene
pMDG2 pRSV-Rev Gag-Pol	Verpackungsplasmide	Alexander Loewer, MDC Berlin
Polybrene 8000	Transduktionsdetergenz	Sigma
pLenti-CMV-GR-GFP	Zielgen Transfervektor	Addgene
Lipofectamin 2000	Virusstransfektion in die HEK-Zellen	Invitrogen

Tabelle 2.4: Materialien für die Transduktion

#### 2.1.6 Bakterien

##### ***Streptococcus pneumoniae* Stämme D39, D39 $\Delta$ cps und D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply**

Bei dem Pneumokokkenstamm D39 handelt es sich um den bekapselten Wildtyp der Serogruppe 2. Die Pneumokokkenstämme R6x, die unbekapselte D39-Mutante D39 $\Delta$ cps sowie die Ply negative Mutante D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply stellen alle unbekapselte Mutanten des Pneumokokken Wildtyps D39 dar, welche für *in vitro* Versuche regelmäßig eingesetzt werden<sup>49,192</sup>. Die zu Selektionszwecken zusätzlich erworbene Kanamycinresistenz der Kapsel- und Ply negativen Mutante D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply machte den Einsatz von 50  $\mu$ l einer 1mg/ml Erythromycinlösung bei der Anzucht notwendig. Die Pneumokokkenstämme wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt.

***Legionella pneumophila*, Stamm 130b**

Bei dem *L. pneumophila* Stamm 130b handelt es sich um einen Wildtypstamm der Serogruppe 1. Die Legionellen wurden von N. Cianciotto, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

**2.1.7 Bakterienkultur und -anzucht**

<b>Bakterienanzucht-/Kryokonservierungsmedien* und Anzuchtplatten</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anzuchtboullion <i>S. pneumoniae</i> (THY-Medium)	Todd Hewitt Broth, 30,00 g Hefeextrakt, 5g Aqua dest, ad 1000 ml	BD Mikrobiologie Sigma
Kryokonservierungsmedium <i>S. pneumoniae</i> und <i>L. pneumophila</i>	THY-Medium, 80% Glycerol (99%), 20%	Sigma
Anzuchtplatten <i>S. pneumoniae</i>	Columbia-Agarplatten (5% Schafsblut) Erythromycin, 98%ig, Selektionsantibiotikum in der Anzucht von PN40	BD Mikrobiologie Sigma
Anzuchtplatten <i>L. pneumophila</i>	BCYE Agarplatten	Heipha

**Tabelle 2.5: Medien und Anzuchtplatten in der Bakterienkultur**

\*Zu Sterilisationszwecken wurden die Bakterienkulturmedien nach Zusammenstellung bei 115 °C und 1 bar Überdruck für 10 Minuten autoklaviert und dann bei 4 °C gelagert. Für das Ausplattieren von Bakterien bzw. Überführen einzelner Bakterienkolonien wurden sterile 10 µl- Impfösen von Roth bzw. sterile Watteträger von Applied SA verwandt.

## 2.1.8 Stimulanzen, chemische Inhibitoren und Enzyme

### Stimulanzen

Stimulus	Ursprung	Bezugsquelle
Dex		Sigma
TNF $\alpha$	human rekombinant	R&D Systems
IL-1 $\beta$	human rekombinant	R&D Systems
Pam3Cys		Alexis Biochemicals
LPS	von <i>Salmonella minnesota</i> R595	Alexis Biochemicals
ODN (CpG-DNA)	Synthetisch	Invivogen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Merck
Rekombinantes Ply		Prof. T. Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, (UK)

Tabelle 2.6: Stimulanzen

### Inhibitoren

Inhibitor	Zielmolekül	Bezugsquelle
SB202190	p38-MAP-Kinase	Calbiochem
JNK II	JNK-MAP-Kinase	Calbiochem

Tabelle 2.7: Inhibitoren

## Enzyme

Enzym	Funktion	Bezugsquelle
Katalase	Katalysiert den Umsatz von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zu H <sub>2</sub> O	Sigma
Trypsin/EDTA 1fach	Ablösen adhärenter Zellen	Gibco
M-MLV reverse Transkriptase	Transkription der mRNA in cDNA	Invitrogen
Red Taq Polymerase	Amplifikation der mRNA	Sigma

Tabelle 2.8: Enzyme

## 2.1.9 Puffer, Lösungen, Gele

### Western Blot Puffer und -Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Phosphoprotein Waschpuffer	Natriumorthovanadat (98%) 200 mM, 5 ml	Sigma
	Natriumpyrophosphat 150 mM, 50 ml	Sigma
	Natriumfluorid (99%) 1M, 50 ml	Sigma
	Dulbeccos PBS, ad 500 ml	PAA
Lysepuffer	Tris-HCl pH 7,4, 50 mM	Sigma
	EDTA, 25 mM	Roth
	PMSF, 1 mM	Sigma
	Antipain, 10 µg/ml	Sigma
	Pepstatin, 10 µg/ml	Sigma
	Leupeptin, 10 µg/ml	Sigma
	Nonidet® P40 (99%), 1%	Fluka
	Phosphoproteinwaschpuffer, ad 1 ml	
Bradford Reagenz	BioRad Protein Assay, 20%	BioRad
	Aqua dest, 80%	
Gelladepuffer	Tris-HCl pH 6,8, 0,5 M, 1ml	Sigma
	Glycerol, 0,8 ml	Sigma
	SDS (10% w/ v), 1,6 ml	Serva

## Material und Methoden

	Bromphenolblau (1% w/ v), 0,4 ml β-Mercaptoethanol (1 % v/ v), 0,4 ml Aqua dest, ad 5 ml	Pharmacia Biotech  Sigma
Gelelektrophoresepuffer	Tris Base, 3 g Glycin, 14,4 g SDS (10% w/ v), 1g Aqua dest, ad 1000 ml	Sigma Merck Serva
Blotpuffer	Tris Base, 3g Glycin, 14,4 g Methanol, 20% Aqua dest, ad 1000 ml	Sigma Merck Merck
Blockpuffer	Odyssey Blocking Buffer, 50% Dulbecco's PBS, 50%	LI-COR PAA
Ponceau-S Proteinfärbung	Ponceau S, 1 g Essigsäure (100%), 50 ml Aqua dest, ad 1.000 ml	Sigma Merck

**Tabelle 2.9: Western Blot Puffer und -Lösungen**

**Western Blot Gele**

Western Blot Gel	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Sammelgel	Tris-HCl pH 6,8, 0,5 M, 2,5 µl SDS (10% w/ v), 100 µl Bis-Acrylamid (40%), 1,33 ml TEMED, 10 µl Ammoniumpersulfat (10%), 40 µl Aqua dest, ad 10 ml	Sigma Serva Serva R&D Systems Serva
Trenngel, 10%	Tris-HCl pH 8,8, 1,5 M, 2,5 µl SDS (10% w/ v), 100 µl Bis-Acrylamid (40%), 3,35 ml TEMED, 5 µl Ammoniumpersulfat (10%), 50 µl Aqua dest, ad 10 ml	Sigma Serva Serva R&D Systems Serva

**Tabelle 2.10: Western Blot Gele**

**PCR-Puffer**

Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
Lysepuffer	RLT, 1 ml β-Mercaptoethanol, 0,01%	Qiagen Sigma
TAE-Puffer, pH 8,0	Tris Base, 4,84 g Eisessig (100%), 1,14 ml EDTA 0,5 M, 2 ml Aqua dest, ad 1000 ml	Sigma Merck Roth

**Tabelle 2.11: PCR-Puffer**

**PCR-Gel**

Gel	Zusammensetzung	Bezugsquelle
PCR-Gel	TAE-Puffer Agarose, 1,5% Ethidiumbromid, 0,4 µg/ ml	Promega Invitrogen

**Tabelle 2.12: PCR-Gel**

## 2.1.10 Primäre und sekundäre Antikörper Westernblot und Konfokalmikroskopie

### Western Blot

Primäre AK	kDa	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
GR $\alpha$ / $\beta$ sc-1003	90	Kaninchen IgG	1:500	Santa Cruz
GR $\alpha$ / $\beta$ sc-8992	90	Kaninchen IgG	1:500	Santa Cruz
ERK2 sc-1647	42	Maus IgG <sub>2b</sub>	1:1000	Santa Cruz
COX2 sc-1745	70	Ziege IgG	1:1000	Santa Cruz
Aktin sc-1616	43	Ziege IgG	1:1000	Santa Cruz

Tabelle 2.13: Primäre Antikörper Western Blot

Sekundäre AK	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
Anti Kaninchen	Ziege-IgG, gekoppelt an IRDye 800	1:2000	Li-Cor
Anti Ziege	Maus-IgG, gekoppelt an IRDye 800	1:2000	Li-Cor
Anti Maus	Ziege-IgG, gekoppelt an Cy 5.5	1:2000	Li-Cor

Tabelle 2.14: Sekundäre Antikörper Western Blot

### Immunfluoreszenz

Primäre AK	kDa	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
GR $\alpha$ / $\beta$ sc-1003	90	Kaninchen IgG	1:100	Santa Cruz
GR $\alpha$ / $\beta$ sc-8992	90	Kaninchen IgG	1:400	Santa Cruz

Tabelle 2.15: Primäre Antikörper Immunfluoreszenz

Sekundäre AK	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
Anti Kaninchen	Ziege-IgG, gekoppelt an Alexa Fluor 488	1:8000	Invitrogen

Tabelle 2.16: Sekundäre Antikörper Immunfluoreszenz



**Weitere Reagenzien Immunfluoreszenz**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Fixation (PFA 3% w/ v, pH 7,6)</b>	Paraformaldehyd (PFA), 6 g Dulbeccos PBS 0,2 M, 100 ml Aqua dest, 100 ml	Sigma PAA
<b>Verdünnungsmedium</b>	Dulbeccos PBS, 20 ml Bovines Serumalbumin, 0,2 g TWEEN 20, 0,01 g	PAA Sigma Sigma
<b>Permeabilisierung</b>	Triton X-100, 0,5 g Dulbeccos PBS, 50 ml	Sigma PAA
<b>Blockmedium</b>	Wirtsserum des Sekundärantikörpers, 1 ml Verdünnungsmedium, ad 20 ml	Sigma
<b>Eindeckelmedium</b>	Permafluor, 5 µl	Beckmann Coulter

**Tabelle 2.17: Reagenzien Immunfluoreszenz**

2.1.11 Primer

Gen	Primer	Sequenz/Verwendung	Bezugsquelle
<b>hGR<math>\alpha</math></b>	<b>Vorwärtssequenz</b>	5'-ATTCACTGATGGACTCCAAAG AATCA	TIB MOLBIOL
	<b>Rückwärtssequenz</b>	5'-CACAGCAGTGGATGCTGAACT CTTGG	
<b>IL-8</b>	<b>Vorwärtssequenz</b>	5'-CTAGGACAAGAGCCA GGAAGA	TIB MOLBIOL
	<b>Rückwärtssequenz</b>	5'-AACCCCTCTCTGCACCCAG TTTTC	
<b>GAPDH</b>	<b>Vorwärtssequenz</b>	5'CCACCCATGGCAAATTCCA TGGCA	TIB MOLBIOL
	<b>Rückwärtssequenz</b>	5'TCTAGACGGCAGGCAGGTCA GGTCCACC	
	<b>Random Hexamer Primer</b>	reverse Transkription	Promega

Tabelle 2.18: Primer PCR

### 2.1.12 Geräte

Die in Laboratorien üblicherweise eingesetzten Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Schüttler, Eismaschinen usw. werden nicht extra aufgeführt. Sie entsprechen alle den gängigen Standards und wurden regelmäßig gewartet.

<b>Methode</b>	<b>Gerät</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Western Blot</b>	Thermomixer Comfort	Erhitzen der Proteine auf 95 °C	Eppendorf
	Gießvorrichtung	Einspannen der Glasplatten	BioRad
	Blotsystem	Proteintransfer	Trans Blot
	Gelelektrophoresesystem	Gelelektrophorese	BioRad
	RCT Basic	Magnetrührer	Ika-Labortechnik
<b>Konfokal-mikroskopie</b>	LSM 5 Pascal	Konfokalmikroskop	Zeiss
	Image Pro Plus 4.5	Software für Bildbearbeitung	Zeiss
	AxioCam MRm	Kamera	Zeiss
	Axio Vision 4.4	Software für Kamera	Zeiss
<b>ELISA</b>	Platereader	Auslesen der ELISA Platten	STL
<b>PCR</b>	Thermocycler PTC-200	Thermocycler	MJ Research
	Gelhalterungssystem	Vorrichtung zum Gelgießen	BioRad
	CAMEDIA C-4040, Digitalkamera	Bilddokumentation	Olympus
	Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Digitalkamera	
	UV-Transilluminator	Darstellung der Banden	Life Technologies
<b>Pneumozyten-Isolation</b>	Homogenisator	Gewebehomogenisierung	MP Fast Prep-24 Biomedicals
<b>Life-Cell Mikroskopie</b>	LSM 780	Lebendgewebemikroskopie	Zeiss
	ZEN 2012	Software für Bildbearbeitung	Zeiss

Tabelle 2.19: Geräte

### Sonstige Verbrauchsmaterialien

Allgemein verwendete Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Ähnliches entsprechen den gängigen Standards.

<b>Methode</b>	<b>Materialien</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Western Blot</b>	Hybond Membran Full Range Rainbow Marker Filterpapier	Proteintransfer Proteingrößenmarker Proteintransfer	Santa Cruz Amersham Whatman
<b>Konfokal- mikroskopie</b>	Phalloidin, gekoppelt an Alexa Fluor 546 Deckgläser Objektträger	F-Aktin Färbung Zytoskelett	Molecular Probes  Plano Plano
<b>PCR</b>	RNeasy® Mini Kit Quarzglas- kuvetten Thermowell Tubes 0,5 ml dNTP-Mix  100 bp DNA Step Ladder	RNA-Extraktion aus den Zellen  Messung der RNA-Menge  DNase- und RNase-freie Reaktionsgefäße RT-PCR, DNA-Bausteine  Größenstandard Basenpaare	Qiagen  Hellma  Costar  Promega  Promega
<b>Transduktion</b>	Puromycin	Selektion der transfizierten Zellen	Roth

Tabelle 2.20: Sonstige Verbrauchsmaterialien

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte bei der Zellkultivierung fanden unter sterilen Bedingungen an Arbeitsplätzen der Sicherheitsstufe S2 statt. Die dafür verwandten Materialien wurden vor Benutzung heißluftsterilisiert oder autoklaviert. Die Kultivierung, Stimulation und Infektion der

Zellen erfolgte stets bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Alle verwandten Substanzen wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

### **Kultivierung und Subkultivierung von A549 Zellen**

Die Zellkultivierung der A549 Zellen wurde in T75 Flaschen vorgenommen. Als Nährmedium wurde HAM's F12+10% FCS ohne Zusatz von Antibiotika verwandt. Bei Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz erfolgte die im Folgenden beschriebene Subkultivierung: Nach vorsichtigem Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen zu Spülzwecken mit 10 ml PBS versetzt, welches direkt im Anschluss wieder abgenommen wurde. Zum Lösen des adhärenen Zellmonolayers wurden 2 ml Trypsin zugegeben und für 3-5 Min. im Brutschrank inkubiert. Sich lösende Zellen stellten sich im Mikroskop kugelig dar. Leichtes Beklopfen der Zellkulturflasche verhalf zur weiteren Zelllösung. Nach Zugabe von 8 ml Zellkulturmedium erfolgte die Passagierung im Verhältnis 1:3 bzw. 1:4, je nach geplantem Versuchsaufbau, in Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen. Für Immunfluoreszenzversuche erfolgte die Zellsubkultivierung in 24-Loch Platten auf Glasplättchen. Für die Life-Cell Mikroskopie erfolgte die Kultivierung auf Ibidi 8-Loch Platten mit Glasboden. Stimulationen bzw. Infektionen wurden nach Erreichen eines Monolayers nach 3-4 Tagen durchgeführt. Am Versuchsvorabend wurde das Nährmedium gegen Zellkulturmedium mit 2% FCS gewechselt, um die Zellen, wie für Infektionsversuche üblich, in einen leichten Hungerzustand zu versetzen („starvation“).

### **Isolation primärer humaner Alveolarepithel Typ II Epithelzellen, pHAEc II**

PhAEC II wurden aus intraoperativ frisch entnommenen Lungengewebezyklindern isoliert. Alle nun folgenden Isolationsschritte erfolgten bei 37°C oder Raumtemperatur. Zunächst erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Lungengewebsproben mit HBSS die Homogenisierung des Gewebes. Zur weiteren Aufbereitung wurden mehrere Filter- und Zentrifugationsschritte durchgeführt. Zuletzt erfolgte die Auftrennung des Zellgemischs über eine Säule. Nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in RPMI-Zellmedium, angereichert mit 10% FCS, aufgenommen und für maximal vier Tage aufbewahrt. Da es sich um primäre Zellen handelt, die nicht passagiert werden können, wurde die entsprechende Zellzahl in die für die Versuche vorgesehenen Kulturschalen überführt.

### **Kultivierung, Subkultivierung und virale Transduktion von HEK-Zellen**

Die Zellkultivierung erfolgte bis zur Ausbildung eines Monolayers in T75 Zellkulturflaschen. Zur Subkultivierung der humanen embryonalen Nierenepithelzellen wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen, wie bei der Kultivierung von A549-Zellen beschrieben, gewaschen. Die

## Material und Methoden

HEK-Zellen wurden mit 10 ml PBS pro T75-Flasche vom Boden ab gespült, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 172 g zentrifugiert. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Mit dem Ziel der Herstellung eines lentiviralen Transduktionssystems für die spätere Transduktion eines GR-GFP-Vektors in A549-Zellen wurden die HEK-Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung in 200  $\mu$ l Zellmedium ausgesät. Wie nachfolgend beschrieben wurde dann ein Drittgeneration Lentivirussystem mit pMDG2, pRSV-Rev und Gag-Pol als Verpackungslasmide hergestellt: Bei Erreichen einer 60-80%igen Konfluenz der HEK-Zellen wurden die Verpackungslasmide der Virusbestandteile sowie des an GFP gebundenen GR-Zielgens in einer Konzentration von 1mg/ml zu den Zellen gegeben und über Nacht inkubiert. Wiederum am nächsten Tag wurde das Stimulationsmedium ausgetauscht und der Ansatz für weitere 36 Stunden inkubiert. Die Erfolgskontrolle der Virustransduktion erfolgte in der Konfokalmikroskopie. HEK-Zellen, die einen GFP-Reporter enthielten, wurden im Mikroskop als fluoreszierend erkannt.

Für die Virusernte wurde das lentivirushaltige Zellmedium abgenommen und für 15 Minuten bei 3000 g und 4°C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend konnte das so erhaltene Virusgemisch mittels PEG-8000-Lösung für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert und dadurch aufkonzentriert werden. Nach erneuter 2facher Zentrifugation mit jeweiligem Verwerfen des Zentrifugationsüberstands erfolgte dann die Auflösung des aufkonzentrierten Virusgemisch in PBS, welches konnte nun zur Transduktion der Zielzellen verwandt werden konnte.

### **Lentivirale Transduktion von A549 Zellen mit einem GR-GFP-Fusionsvektor**

A549-Zellen wurden mit Hilfe des wie oben beschrieben hergestellten lentiviralen Transduktionssystems mit einem GR-GFP Fusionsvektor stabil transduziert. Der GR-GFP Fusionsvektor wurde zuvor über XbaI und BamHI in einen pLenti-GFP-Puro Vektor kloniert. Die Zellklone wurden mit Puromycin (2 $\mu$ g/ml) selektioniert.

Für die stabile Transduktion der Zielzellen mit GR-GFP wurden zunächst die A549-Zellen in einer beschichteten Glasbodenkammer von der Firma Ibidi mit 200 $\mu$ l DMEM pro Vertiefung inkubiert. Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/Vertiefung ausgesät. Am Folgetag erfolgte nach Erreichen einer 60-80%igen Konfluenz die Virustransduktion mittels 8  $\mu$ g/ml Polybrene. Die Transduktionseffizienz wurde wiederum mittels Fluoreszenzmikroskopie kontrolliert.

### **Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer 200 µl Pipette Zellsuspension aus der frisch subkultivierten T75-Zellkulturflasche entnommen und auf eine Neubauer Zählkammer gegeben. In 10facher Vergrößerung unter dem Mikroskop wurden die in den Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten verteilten Zellen ausgezählt und aus den Ergebnissen der Mittelwert errechnet. Die absolute Zellzahl pro ml ergab sich durch Berechnung mittels folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl aus 2 Großquadraten}) / 2 * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Kammerkonstante} (10^4)$$

### **Kryokonservierung**

Zur Konservierung wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben abgelöst und in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert, um darauffolgend bei 400 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in je 1 ml des entsprechenden Zellmediums, versetzt mit 10% DMSO, resuspendiert und aliquotiert. In speziellen Kryoröhrchen wurden die Aliquots zunächst für 5 Stunden auf -20°C und dann für weitere 15 Stunden auf -80°C gekühlt. Durch das langsame Einfrieren sollten Schäden durch Kristallisationsprozesse vermieden werden. Die Aufbewahrung erfolgte in Flüssigstickstoff (-196°C).

### **Auftauen von Zellen**

Das Auftauen der Zellen erfolgte im 37°C warmen Wasserbad. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml des entsprechenden Zellmediums überführt und für 5 Minuten bei 172 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche, T75, überführt. Am Folgetag wurde das Zellkulturmedium ausgetauscht.

### **2.2.2 Bakterienkultur**

Arbeiten mit den Bakterienstämmen fanden nur unter Sicherheitsbedingungen der Sicherheitsstufe S2 und an sterilen Arbeitsplätzen statt. Die Bakterienanzucht und -lagerung erfolgte stets bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95%iger Luftfeuchtigkeit. Nach Gebrauch wurden sämtliche Materialien und Apparaturen mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert und anschließend autoklaviert.

### **Bakterienlagerung**

#### **Lagerung der *S. pneumoniae*-Stämme D39, D39 $\Delta$ cps, D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply und R6x**

Zur einheitlichen Stimulation der Zellen verwandten wir Pneumokokken der verschiedenen Stämme aus jeweils vorher angelegten Stöcken. Für die Herstellung eines solchen Stocks wurden Pneumokokken mit Hilfe einer Impföse auf vorgewärmten Columbia Agar Platten mit 5% Schafsblut fraktioniert ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert. Nach frühestens 8, spätestens 10 Stunden konnten vereinzelt stehende Kolonien auf eine frische Agarplatte überführt werden und wiederum für 8-10 Stunden inkubiert werden. Die auf der 2. Agarplatte gewachsenen Kolonien wurden mit einem Wattestäbchen abgenommen und in Kryomedium eingerührt, um dann bei -80°C gelagert zu werden.

#### **Lagerung von *L. pneumophila***

Für die Herstellung eines Legionellenstocks wurden die Bakterien mit Hilfe einer Impföse auf BCYE Agarplatten fraktioniert ausgestrichen und unter den oben angeführten Bedingungen inkubiert. Nach 2 Tagen Wachstum wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Wattestäbchen vorsichtig abgenommen und in ein Kryoröhrchen mit einem Milliliter Kryolösung überführt. Die Lagerung erfolgte in dem Kryobehälter bei -80°C.

### **Bakterienanzucht**

#### **Anzucht von *S. pneumoniae***

Die Anzucht der verschiedenen Pneumokokkenstämme für Infektionsversuche erfolgte am Versuchsvortag. Hierfür wurden Bakterien aus den Kryostocks mittels Impföse auf den bereits genannten Nährböden fraktioniert ausgestrichen und für 8-10 Stunden inkubiert. Am Abend konnten einzeln wachsende Kolonien mit einem Wattestäbchen in 20 ml 4° C kalte Todd Hewitt Bouillon mit Zusatz von 0,5% Hefe eingerührt werden. Hierbei wurde eine optimale Ausgangskonzentration von  $3-6 \times 10^7$  cfu/ml mit Hilfe des Spektrofotometers eingestellt. Bei einer optischen Dichte von 600 nm entsprach eine OD von 0,03-0,06 der gewünschten Anfangskonzentration. Dabei wurde davon ausgegangen, dass sich die Bakterien in der Latenzphase ihrer Wachstumskurve befinden, das heißt Vermehrung fand nur spärlich und sehr langsam statt. Über Nacht wurden die so vorbereiteten Bakterien auf Eis gelagert, um am nächsten Morgen im Wasserbad bei 37°C auf eine optimale Infektionskonzentration von  $3-4 \times 10^8$  cfu/ml (entspricht einer OD von 0,3-0,4 im Spektrofotometer bei 600 nm gemessen) wachsen zu können. Bei dieser Konzentration erreichen die Pneumokokken die mittlere Log-Phase der Wachstumskurve, was als Voraussetzung für optimale Infektionseigenschaften gilt.



### **Anzucht von *L. pneumophila***

Für die Legionellenanzucht wurden aus dem wie oben angelegten Kryostock die Bakterien mittels Impföse entnommen und auf eine neue BYCE Agarplatte fraktioniert ausgestrichen. Nach zweitägigem Wachstum im Brutschrank konnten die so gewonnenen Kulturplatten als Vorkulturplatten für Infektionszwecke weiter verwandt werden. Dafür wurden von einer solchen Vorkulturplatte einzelne Kolonien auf eine frische Agarplatte überführt und nochmals im Brutschrank bis zum Infektionsbeginn inkubiert. Die Vorkulturplatten wurden bis zu einem Monat bei 4°C gelagert und bei Bedarf für Infektionsversuche verwendet.

### **2.2.3 Zellinfektion**

#### **Zellinfektion mit *S. pneumoniae***

Bei Erreichen der gewünschten Konzentration von  $3-4 \times 10^8$  cfu/ml wurden die Bakterien zunächst für 10 Min. bei 1800 g und ohne Bremse zentrifugiert, um anschließend, nach Absaugen der THY-Boullion, im vorgewärmten Zellmedium auf eine Konzentration von  $1 \times 10^8$  cfu/ml verdünnt zu werden. In einer Verdünnungsreihe mit 1:10 Verdünnungsschritten erfolgte die Einstellung auf die jeweils gewünschte Infektionskonzentration von  $1 \times 10^6$  cfu/ml oder  $1 \times 10^7$  cfu/ml.

Je nach Versuchsaufbau wurden die A549-Zellen für 4-6 Stunden mit je einem ml Pneumokokkenansatz/Vertiefung in 24-Loch-Platten bzw. mit je 2 ml/Vertiefung in 6-Loch-Platten inkubiert. PHAEC II wurden, in Zellmedium versetzt, mit 0,3% BSA und 0,1% Glutamin für drei Stunden infiziert.

#### **Cfu-Assay**

Zur Kontrolle des Bakterienwachstums wurde parallel zur Zellinfektion eine Zielkonzentration von 50 cfu/ml hergestellt und auf einer Agarplatte ausplattiert. Als Nachweis einer adäquaten Bakterienvermehrung wurde das Erreichen der gewünschten cfu-Anzahl auf der Agarplatte nach Ende der Infektionszeit herangezogen.

#### **Zellinfektion mit *L. pneumophila***

Für Infektionsversuche wurden die Legionellen mittels eines sterilen Wattestäbchens in Zellkulturmedium eingerührt und am Spektrofotometer die Zielkonzentration von  $1 \times 10^7$  cfu/ml eingestellt. Bei einer optischen Dichte von 600 nm entsprach eine OD von 0,3 der gewünschten Konzentration von  $1 \times 10^8$  cfu/ml. Um die für die Zellinfektion benötigte Zielkonzentration von  $1 \times 10^7$  cfu/ml zu erreichen, wurden die Legionellen in 1:10 Verdünnungsschritten in Zellkulturmedium verdünnt. Anschließend wurden Zellen mit dem Legionellenansatz auf 24-

Loch-Platten in 1 ml/Vertiefung bzw. mit 2 ml/Vertiefung auf 6-Loch-Platten für 8 Stunden infiziert.

### **Inaktivierung von R6x durch Erhitzen**

Die Pneumokokken wurden wie oben beschrieben aus dem Kryostock entnommen und auf einer Agarplatte ausgestrichen. Nach ausreichender Inkubation im Brutschrank wurden die von der Agarplatte abgenommen Bakterienkolonien in 50 ml Todd Hewitt Bakterium Nährmedium eingerührt und für das weitere Wachstum in den Brutschrank gestellt. Mit Hilfe des Spektrofotometers wurde nach einer ausreichenden Wachstumsphase die Zielkonzentration von  $1 \times 10^9$  cfu/ml auf eine entsprechende OD von 1,0 bei einer optischen Dichte von 600 nm eingestellt. Die so hergestellte Bakteriensuspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Bakterien im Pellet mit 50 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt 3x wiederholt. Die Bakterieninaktivierung erfolgte bei 56°C für eine Stunde im Wasserbad. Zur Erfolgskontrolle wurden die so behandelten Bakterien auf eine Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Das fehlende Koloniewachstum sprach für eine erfolgreiche Inaktivierung.

### **2.2.4 Zellstimulation**

#### **Negativkontrolle**

Zeitgleich zur Zellinfektion bzw. -stimulation wurden Zellen mit derselben Menge reinen Zellkulturmediums versetzt und für die Infektions- bzw. Stimulationszeit inkubiert. Auswertungen im Western Blot oder in der Immunfluoreszenz dieser Proben galten als Negativkontrollen.

#### **Stimulanzen**

Die spezifischen Stimulanzen  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, PAM3Cys, CpG, Ply,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Dex wurden bis zum Erreichen der entsprechenden Stimulationskonzentration in Zellkulturmedium verdünnt und zur Stimulation auf die zu stimulierenden Zellen gegeben. Die genannten Stimulanzen wurden in nachfolgend genannten Konzentrationen eingesetzt. Anschließend betrug die Stimulationszeiten vier Stunden bzw. eine Stunde für Dex.

Stimulus	Konzentration
TNF $\alpha$	10 ng/ml
IL-1 $\beta$	10 ng/ml
LPS	10 ng/ml
PAM3Cys	100 ng/ml
CPG	2 $\mu$ M
Ply	1 $\mu$ g/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 mM
Dex	1 $\mu$ M

**Tabelle 2.21: Stimulanzen mit eingesetzten Konzentration**

### **Inhibitoren**

Die MAP-Kinase-Inhibitoren SB202190 (p38-Inhibitor) und JNK2 (JNK-Inhibitor) wurden nach Verdünnung auf die entsprechende Zielkonzentration von jeweils 10  $\mu$ M für eine halbe Stunde mit den Zellen vorinkubiert, bevor die Infektion mit R6x erfolgte. Katalase wurde für die Zielkonzentration von 600 U ebenfalls in Zellmedium verdünnt und vor der Zellstimulation für 15 Min. zusammen mit R6x in der Zielkonzentration vorinkubiert und dann für 4 Stunden auf die Zellen gegeben. Zum Ausschluss eines hemmenden Einflusses auf das Pneumokokkenwachstum wurden die Inhibitoren auf die mit *S. pneumoniae* beimpften Blutagarplatten gegeben.

### **2.2.5 Konfokale Immunfluoreszenz**

#### **Fixation und Immundetektion**

Für die Proteindetektion in der Immunfluoreszenz wurden A549 Zellen und phAEC II in 24-Loch-Platten auf Glasplättchen ausgesät und bei Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz (entspricht in etwa 20.000 Zellen) Infektionen bzw. Stimulationen durchgeführt. Nach Absaugen des Stimulationsmediums wurden die Zellen 3x mit 500  $\mu$ l/Vertiefung PBS gespült, um dann in 200  $\mu$ l/Vertiefung 3% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur unter dem Abzug fixiert zu werden. Im Anschluss wurden die Zellen erneut 3x in PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellwände diente 1%iges Triton, 400  $\mu$ l/Vertiefung, welches 15 Minuten lang bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert wurde. Es folgte ein weiterer 3maliger Waschvorgang mit PBS. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen mit 400  $\mu$ l Blockingpuffer/Vertiefung für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Dieses bestand aus in Verdünnungsmedium gelöstem Serum (5%) entsprechend dem Wirt, aus dem der eingesetzte sekundäre Antikörper stammte. Dasselbe Verdünnungsmedium ohne den Zusatz von Serum wurde für die Verdünnung der Antikörper verwandt. Anschließend wurde das Blockingmedium abgenommen und 200 µl/Vertiefung Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 über Nacht bei 4°C auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Primärantikörper 3x mit PBS abgewaschen und 200 µl/Vertiefung des Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:8000 auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte wiederum bei 4°C über Nacht. Der Sekundärantikörper wurde wiederum 3x mit PBS abgewaschen. Abschließend erfolgte die Aktin Färbung durch Phalloidin, Alexa 546, 200µL/Loch, für 20 Min. in einer Verdünnung von 1:200 oder 1:400. Nach einem letzten 3maligem Waschgang wurden die Glasplättchen mit den Zellen auf Objektträger aufgebracht und in Perma-Fluor Eindeckelmedium, 5µl, eingebettet. Durch klaren Nagellack wurden die getrockneten Glasplättchen versiegelt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C und Dunkelheit.

### **Bilddokumentation**

Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss) und der dazugehörigen Software „AxioVision“. Die Life-Cell Mikroskopie erfolgte mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 780, Carl Zeiss) und der dazugehörigen Software „ZEN 2012“.

### **2.2.6 Western Blot**

#### **Zellyse und Proteingewinnung**

Zellen wurden in 6-Loch Platten nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz, entspricht in etwa 200.000 Zellen pro Loch, je nach Versuchsaufbau für unterschiedliche Zeiträume bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 95%iger Luftfeuchtigkeit stimuliert bzw. infiziert. Es folgten die Zellyse und Proteingewinnung auf Eis. Zunächst wurden die Zellen mit 1ml eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer/Vertiefung gewaschen. Nachdem dieser sorgfältig abgesaugt wurde, folgte die Zellyse mit 200 µl/Vertiefung und ebenfalls eiskaltem Lysepuffer. Das Zellysat konnte mit einem Kunststoffschaber abgeschabt werden und nachfolgend in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 10 Min. bei 4°C und 2500 g zentrifugiert werden. Die im Überstand befindlichen Gesamtproteine wurden zur Weiterverarbeitung abgenommen.

#### **Proteinquantifizierung nach Bradford**

Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 bindet an Proteine, wodurch sich sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Dieses Phänomen macht man

sich in der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford zu Nutze. Verwandt wurde ein kommerziell erhältliches Bradford Reagenz von Bio-Rad, welches in einer 1:5-Verdünnung mit Aqua-Bidest zum Einsatz kam. 5 µl Proteinlysat wurden mit 995 µl des Bradfordreagenz vermischt und nach einer 5min. Inkubationszeit wurde die Absorption im Spektrofotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Leerwert diente 1 ml des Bio-Rad Gemischs ohne Proteinzugabe.

### **Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Für die Probenvorbereitung wurden die Proteine im Verhältnis 1:1 mittels Lämmli-Puffer+5% β-Mercaptoethanol sowie anschließend 5min. Kochens bei 95°C denaturiert. Zur Proteinauftrennung folgte die Gelelektrophorese in einem 10%igem SDS-Gel von je 80 µg Protein/Lauftasche. Für die Herstellung des Gels wurde zunächst das Trenngel, welches später für die eigentliche Proteinauftrennung diente, zwischen 2 Glasplatten, die in eine Gießvorrichtung (Firma Bio Rad) eingespannt waren, gefüllt und mit Isopropanol luftdicht abgeschlossen. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, konnte das Isopropanol mit Aqua dest abgespült werden und anschließend das Sammelgel, welches eine Konzentrierung der Proteine vor der eigentlichen Proteinauftrennung ermöglicht, eingefüllt werden. Ohne Luftblasen zu bilden, wurde nun ein Kamm als Platzhalter für zehn Taschen eingetaucht. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte der Kamm entfernt werden, das Gel in die Laufkammer gespannt werden und die Taschen mit den Proben bestückt werden. In die Kammern wurde ein geeigneter Laufpuffer gefüllt und ein kommerziell erhältlicher Proteinmarker (Rainbow™, Fa. Amersham) als Größenmarker mitgeführt. Der Sammelgellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm, der Trenngellauf bei 15 V/cm. Sobald die Proben das untere Ende des Gels erreichten, wurde die Gelelektrophorese gestoppt.

### **Blotting und Immunodetektion**

Die Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran erfolgte in eiskaltem Blotpuffer bei 100 V in exakt 1 Stunde. Zunächst wurde dafür das mit den Proteinen beladene Gel vorsichtig aus seiner Haltevorrichtung genommen und faltenfrei auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran aufgelegt. Dann wurden Gel und Membran zwischen drei Blotpuffer-getränkten Lagen 3M-Whatman-Filterpapier pro Seite in die Blotkammer eingespannt und Strom angelegt. Anschließend konnte der Erfolg des Western Blots mit Hilfe von Ponceau-S, welches die Proteinbanden reversibel rot färbt, überprüft werden. Für mindestens 1 Stunde folgte nun das Blocken der unspezifischen Proteinbindungen in 50%igem Ody Blocking Puffer von LI-COR. Primärantikörper wurden in 50%igem Blockingpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°

schaukelnd auf der Membran inkubiert. In einem 3maligem Waschdurchgang mit PBS-Tween wurde die Membran von überschüssigem Primärantikörper befreit. Die Inkubation der an IRDye 800 oder Cy5.5 gekoppelten, gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper erfolgte während 1 Stunde abgedunkelt bei Raumtemperatur. Im Anschluss erfolgte wiederum das Abwaschen des Antikörpers durch PBS-Tween.

Die Auswertung wurde lasergestützt in einem speziellen Detektionssystem (Odyssee Infrared Imaging System) durchgeführt, welches die wie oben geschildert markierten Sekundärantikörper erkennt, durchgeführt. Die entsprechende Software verhalf bei der vom Hersteller empfohlenen Bildverarbeitung.

### 2.2.7 RT-Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion der mit *S. pneumoniae* infizierten und anschließend lysierten A549-Zellen erfolgte mit Hilfe des kommerziellen RNeasy® Mini Kits von der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die Stimulationen wurden in 12-Loch Platten durchgeführt, als Lysepuffer wurde je 350 µl RLT-Lysepuffer+1% β-Mercaptoethanol verwendet. Für die Quantifizierung des RNA-Gesamtgehalts wurden die Proben mit Aqua dest in einer Verdünnung von 1:50 verdünnt. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) im Abgleich gegen das Lösungsmittel (Aqua dest) im Sepktrofotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die RNA-Konzentration wurde dann anhand der Formel  $OD_{260} * 2 = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$  errechnet. Zum Ausschluss einer Proteinverunreinigung der Proben wurde der Quotient aus  $OD_{260}$  (Absorptionsmaximum für RNA) und  $OD_{280}$  (Absorptionsmaximum für Proteine) herangezogen. Hierbei galten RNA-Protein-Quotienten zwischen 1,7 und 1,9 als rein. Die Probenlagerung erfolgte bei -80°C.

### **Reverse Transkription, RNA zu cDNA**

Je 1 µg RNA wurde mit RNase freiem Wasser (Aqua bidest) auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit je 1 µl Hexamer-Primer (0,2 µg/µl) und 1 µl 10 nM Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) versetzt. Im Thermocycler erfolgte dann bei zunächst 65°C ein 5min., und dann bei 37°C ein 2min. Denaturierungsschritt. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und je 8 µl des Reaktionsansatzes, aus 1 µl des Transkriptionsenzym (Moloney Murine Leukemia Virus, M-MLV-RT), 2µl 0,1 M DTT und 1µl RNAsin in 4 µl 5 x M-MLV-Puffer, hinzugegeben. Die cDNA-Synthesereaktion erfolgte für 50 min. bei 37°C und 15 min. bei 70°C im Thermocycler. Danach wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Vor Lagerung bei -20°C oder Weiterverarbeitung auf Eis wurden die cDNA Proben mit Aqua bidest auf jeweils 100 µl aufbewahrt.

### **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

In einem Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz wurden je 5 µl cDNA, 1,6 U Red Taq-Polymerase, 1x Red Taq PCR-Puffer, 200 µM dNTP-Mix, je 500 nM Vorwärts- und Rückwärts-Primern sowie Aqua bidest zusammengeführt.

Abgestimmt auf den Thermocycler (Peltier Thermalcyler von MJ Research) wurden die verschiedenen PCR-Zyklen durchgeführt. Die PCR verlief dann nach folgendem Ablauf je nach eingesetztem Primer unterschiedlich häufig:

- 3 Min. Denaturierung bei 95°C, 1 Min. Primerhybridisierung bei Primer spezifischer Hybridisierungstemperatur,
- 1 Min. Elongation bei 75°C und schließlich nach primerspezifisch häufiger Wiederholung
- 5 Minuten Extension bei 72°C.
- Abschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

Als Probenbeladungskontrolle dienten cDNA-Fragmente der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein konstant in eukaryonten Zellen exprimiertes Enzym. Die Gewinnung der cDNA für GAPDH erfolgte mittels Real time PCR (RT-PCR) und speziellen Primern aus den wie oben beschrieben gewonnenen Zellen.

### **Agarose Gelelektrophorese**

Die Detektion der mittels PCR gewonnenen DNA-Fragmente erfolgte mittels Gel-Elektrophorese. Für die Herstellung des Agarosegels wurde 1,5%iger Agarose in 1xTAE-Puffer

aufgekocht und mit 0,4%igem Ethidiumbromid versetzt. In einer Gelkammer mit eingesetztem Kamm als Proben Taschenplatzhalter polymerisierte das Gel innerhalb von 20 Min. langsam aus. Nach Überführung in die Elektrophoresekammer wurde das Gel vollständig mit 1xTAE-Puffer bedeckt und anschließend wurde der Platzhalter entfernt. Pro Tasche wurden 11,5 µl Probe aufgetragen. Zur Orientierung diente ein Größenstandard. Bei 120 V angelegter Spannung erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente. Abschließend wurde das Gel auf einem UV-Transilluminator mit einer Olympus-Kamera (CAMEDIAN-4040 200M) fotografiert.

### **Statistische Analyse**

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei das hier dargestellte repräsentative Versuchsergebnis stets reproduziert werden konnte. Der Referenzparameter zur Auswertung der GR-Immunfluoreszenzen war eine nukleäre Translokation bzw. keine nukleäre Translokation. Somit konnte die Beurteilung auf zwei eindeutige Zustände reduziert werden. Zudem wurde die Beurteilung durch einen zweiten unabhängigen Untersucher kontrolliert. Es wurden jeweils biologische Duplikate mit 3-5 repräsentativen Bildausschnitten aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen dokumentiert. Die Abbildungen der Western Blot Analysen zeigen ebenfalls jeweils repräsentative Blots von mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Für den Luciferase Assay erfolgte die statistische Auswertung anhand eines T-Tests. Als signifikant wurden Unterschiede ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $p < 0,05$ ) bzw. weniger als 1% ( $p < 0,01$ ) betrachtet und mit einem Stern bzw. 2 Sternen markiert<sup>193</sup>.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *S. pneumoniae* induziert eine Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation in humanen Alveolarepithelzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer Infektion mit *S. pneumoniae* auf die GC-GR $\alpha$ -Signalkaskade an humanen AEC II untersucht. Hierbei zeigte sich anhand von Immunfluoreszenzfärbungen von A549-Zellen zunächst, dass die Zellinfektion mit der unbekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 2 Mutante R6x eine Hemmung der Dex induzierten Translokation des GR $\alpha$  in den Zellkern verursacht (Abb. 3.1A IV).

Diese zentrale Beobachtung konnte an frisch isolierten phAEC II im gleichen Infektionszeitraum nachvollzogen werden (Abb. 3.1B IV). Die Infektion der phAEC II erfolgte mit bekapselten Serotyp 2 Pneumokokken (D39).

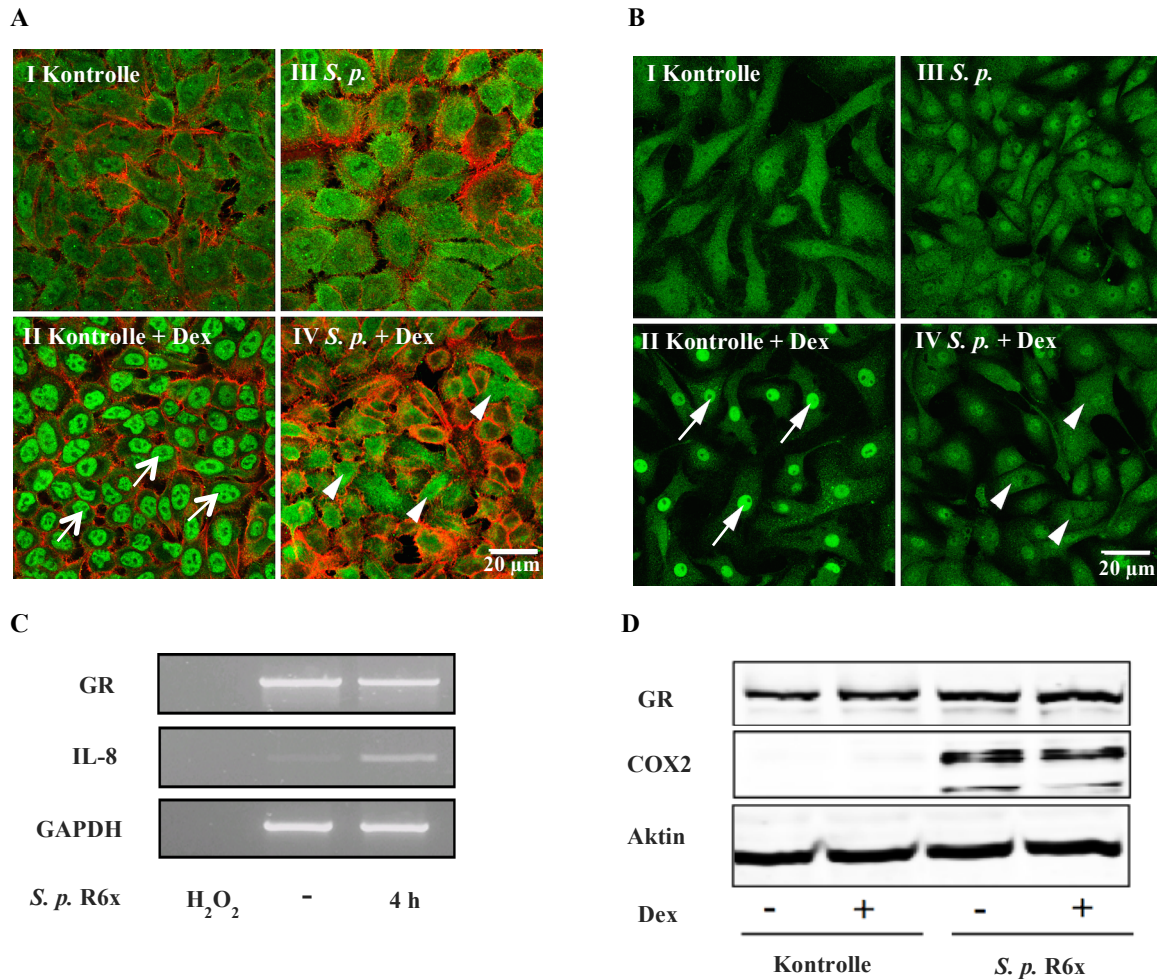
Mittels Western Blot und RT-PCR konnte ausgeschlossen werden, dass der Translokationshemmung des GR $\alpha$  ursächlich eine durch *S. pneumoniae* verursachte Suppression der GR $\alpha$ -Protein- bzw. mRNA-Expression zugrunde liegt (Abb. 3.1C und D). Die erfolgreiche Infektion der pulmonalen Zielzellen wurde durch den Anstieg der IL-8-mRNA in der RT-PCR bzw. der Cyclooxygenase 2 (COX2) im Western Blot bestätigt. Es handelt sich hierbei um typische, proinflammatorische Faktoren, die durch die Infektion mit *S. pneumoniae* induziert werden können (Abb. 3.1C und D).

Die mRNA Expression des GR $\alpha$ -Gens wurde mit der Expression der GAPDH-mRNA, einem in eukaryonten Zellen konstant exprimierten Gen, abgeglichen (Abb.3.1C). Eine gleichmäßige Proteinbeladung im Western Blot konnte durch Detektion des konstant exprimierten Strukturproteins Aktin nachgewiesen werden (Abb 3.1D).

Für die Detektion des GR wurden zwei verschiedene Antikörper eingesetzt, die sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Isoform des GR erkennen können. In Kontrollfärbungen mittels Immunfluoreszenz zeigte sich sowohl eine zytosolische als auch nukleäre Lokalisation. Da beide Isoformen unter konstitutiven Bedingungen in diesen beiden Kompartimenten vorkommen können, kann in unbehandelten Zellen mit diesen Antikörpern nicht zwischen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Isoform unterschieden werden. Jedoch kam es in den verwendeten Zellen nach Behandlung mit 1 $\mu$ M Dex zu einer ca. 90%igen Translokation des zytosolischen Signals in den Zellkern. Diesen Prozess durchläuft lediglich der GR $\alpha$ , nicht jedoch der GR $\beta$ , so dass in den folgenden Experimenten davon ausgegangen werden kann, dass die sowohl im Western Blot als

## Ergebnisse

auch in der Immunfluoreszenz nachgewiesene Isoform nahezu ausschließlich den GR $\alpha$  darstellt. Aus diesem Grund wird in allen weiteren Ergebnisdarstellungen lediglich von GR $\alpha$  gesprochen.



**Abb. 3.1:** *S. pneumoniae* induziert eine Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen und in phAEC II.

**A+B:** Darstellung von A549-Zellen (A) bzw. phAEC II (B) in der Konfokalmikroskopie. Mittels Immunfluoreszenzantikörpern erfolgte die Darstellung von GR $\alpha$  (Alexa 488, grün) und dem Aktinzellgerüst (Alexa 546, rot). Die Zellstimulation mit Dex (1 h, 1  $\mu$ M) führte zu einer Translokation des GR $\alpha$  in den Zellkern (Abb. 3.1A II und B II, siehe gestielte Pfeile). Nach Infektion mit *S. pneumoniae*, R6x (in A), bzw. D39 (in B) für 4h mit einer Dosis von  $1 \times 10^6$  cfu (A) bzw. für 3h mit einer Dosis von  $1 \times 10^7$  cfu (B) zeigte sich die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation im Vergleich deutlich inhibiert (Abb. 3.1A IV und B IV, siehe Pfeilspitzen).

**C:** RT-PCR von GR-mRNA von A549-Zellen, die mit *S. pneumoniae*, R6x infiziert wurden. Die Darstellung der GAPDH diente als Beladungskontrolle. Nach Infektion (4 h,  $1 \times 10^6$  cfu) wurde die GR-mRNA unverändert exprimiert.

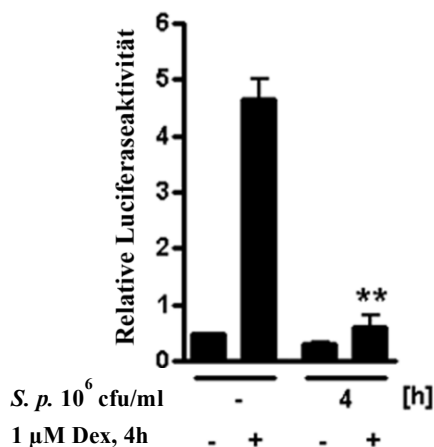
**D:** Western Blot von A549-Zellen. Die GR-Bande zeigte eine unveränderte Dichte nach Infektion mit *S. pneumoniae*, R6x (4h,  $1 \times 10^6$  cfu). Die Darstellung von Aktin diente als Proteinbeladungskontrolle. Es zeigte

## Ergebnisse

sich eine gleichmäßige Proteinbeladung. In den Abbildungen A-D handelt es sich jeweils um repräsentative Abbildungen aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

### 3.2 *S. pneumoniae* inhibiert die transkriptionelle GR $\alpha$ -Aktivität

Mit der Frage nach einer funktionellen Relevanz der *S. pneumoniae* induzierten Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation wurde die Auswirkung einer Pneumokokkeninfektion auf die transkriptionelle Aktivität des GR $\alpha$  mittels Luciferase Assay untersucht. In A549-Zellen, die mit dem Luciferase Transporter Gen und GRE-Promoter ko-transfiziert wurden, führte die Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer Abnahme der Dex induzierten GRE-Aktivierung im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen. Die Abbildung konnte dankenswerterweise aus der Diplomarbeit von Frau Mi Ryu übernommen werden<sup>193</sup>.



**Abb. 3.2: *S. pneumoniae* inhibiert die transkriptionelle Aktivität von GR $\alpha$ .**

Mit *S. pneumoniae* (1x10<sup>6</sup> cfu/ml) infizierte A549-Zellen zeigten nach Infektion (4 h), eine signifikante Reduktion der Luciferaseaktivität nach Dex-Stimulation im Vergleich mit den nicht infizierten Kontrollen. Abbildung aus Diplomarbeit Mi Ryu, 14.09.2007<sup>193</sup>.

Nachfolgend wurde die Frage nach dem involvierten molekularen Mechanismus sowie dem verantwortlichen Pneumokokkenvirulenzfaktor der *S. pneumoniae* induzierten Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation bearbeitet.

### 3.3 Typische, durch *S. pneumoniae* aktivierte inflammatorische Signalkaskaden scheinen nicht in die GR $\alpha$ -Translokationshemmung involviert zu sein

Die initiale Pathogenerkennung von *S. pneumoniae* durch PRR der angeborenen Immunität hat die Aktivierung von inflammatorischen Signalkaskaden und die konsekutive Freisetzung inflammatorischer Mediatoren zur Folge<sup>61,85</sup>. Wie aus Untersuchungen zu GC-Resistenzen im Rahmen von chronisch inflammatorischen Erkrankungen, wie bspw. Asthma bronchiale, hervorgeht, bestehen inhibitorische Wechselwirkungen zwischen inflammatorischen

## Ergebnisse

Signalkaskaden und dem GR $\alpha$ <sup>123,184,194</sup>. Dies wurde für inflammatorische Kinasen, wie MAPK, aber auch Zytokine, wie TNF $\alpha$ , und Transkriptionsfaktoren, wie NF- $\kappa$ B, beschrieben<sup>115,194,195</sup>.

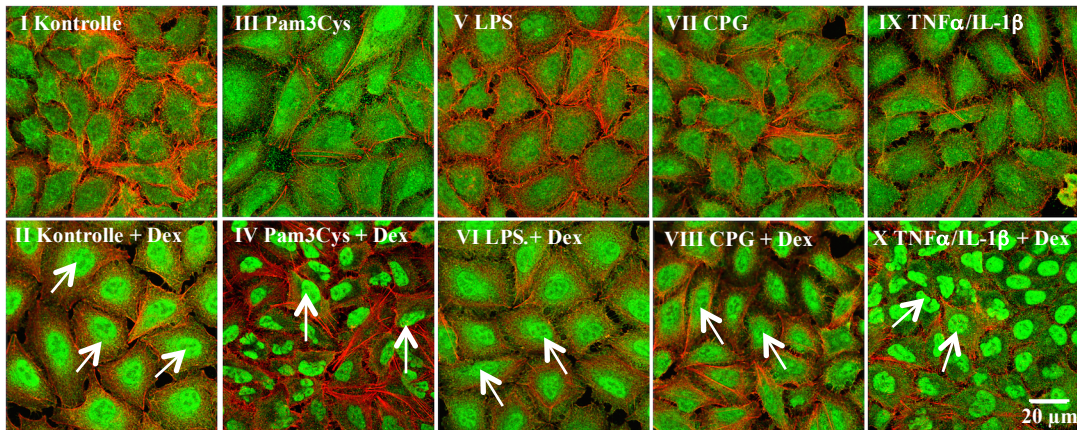
Es wurde daher der Frage nachgegangen, ob typische, in die Pneumokokkenabwehr involvierte inflammatorische Signalwege für die *S. pneumoniae* verursachte Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation verantwortlich sind.

Hierfür erfolgte zunächst die Stimulation von A549-Zellen mit spezifischen Liganden von TLR2, -4 und -9 und anschließend mit Dex. In der Auswertung mittels Konfokalmikroskopie zeigte sich, dass die hier untersuchten TLR-Liganden in der hier untersuchten Zelllinie keine Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation verursachen (Abb. 3.3A IV, VI, VIII).

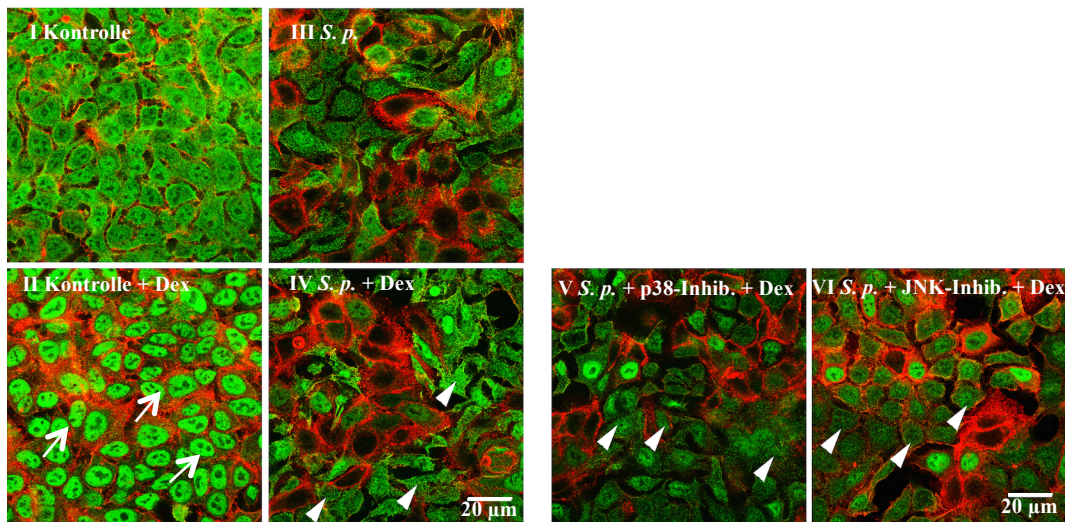
Auch die Stimulation mit den inflammatorischen Zytokinen TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hatte in der untersuchten Zelllinie keinen Einfluss auf die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation (Abb. 3.3A X). Abschließend erfolgte die Untersuchung an A549-Zellen, in denen die MAPK JNK und p38 durch chemische Liganden blockiert wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. Genau wie die unbehandelten Kontrollen zeigten die vorbehandelten A549-Zellen nach der Infektion mit *S. pneumoniae* eine Hemmung der Dex induzierten GR $\alpha$ -Translokation (Abb. 3.3B V, VI). Daraus folgt, dass die untersuchten MAPK-Signalwege zumindest in A549-Zellen nicht in die *S. pneumoniae* verursachte Inhibition der GR $\alpha$ -Translokation involviert zu sein scheinen. Die Inhibitoren hatten in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt)

## Ergebnisse

A



B



**Abb. 3.3: Weder TLR-Liganden und inflammatorische Zytokine noch MAPK-Wege hatten einen Einfluss auf die GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen.**

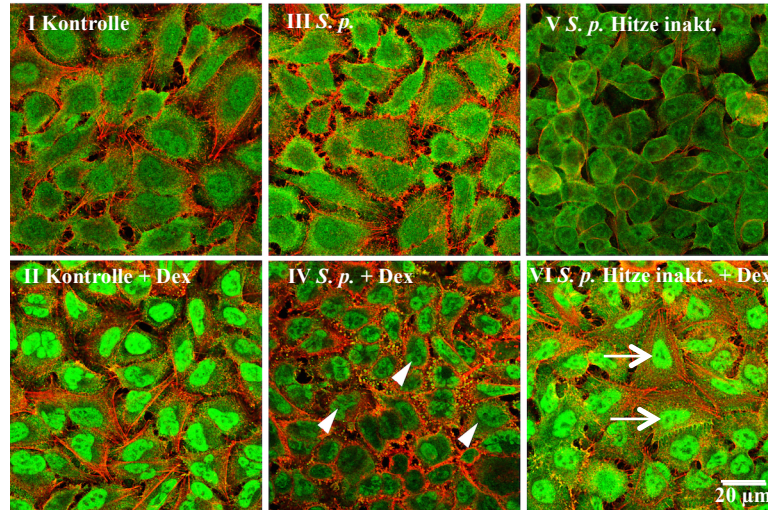
**A:** Konfokalmikroskopische Darstellung von A549-Zellen nach Stimulation (4 h) mit spezifischen TLR-Liganden (LPS für TLR2, Pam3Cys für TLR4, CpG für TLR9) bzw. inflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ /IL-1 $\beta$ ) und anschließender Dex-Stimulation (1  $\mu$ M, 1 h). Die Abb. 3.3A II, -IV, -VI, -VIII und -X zeigen eine deutliche GR $\alpha$ -Kernfärbung nach Stimulation mit Dex (A488, grün, siehe gestielte Pfeile).

**B:** A549-Zellen wurden mit chemischen Inhibitoren der MAP-Kinasen p38 und JNK vorinkubiert und anschließend mit *S. pneumoniae* ( $1 \times 10^6$  cfu, 4 h) infiziert. Nach abschließender Stimulation mit Dex (1  $\mu$ M, 1 h) erfolgte Immunfluoreszenzfärbung des GR $\alpha$  mit Alexa 488 (grün) und von Aktin mit Alexa 546 (rot). Nicht infizierte Zellen, die mit Dex stimuliert wurden, zeigen eine homogene GR $\alpha$ -Kernfärbung (Abb.3.3B II, grün, siehe gestielte Pfeile). Nach Infektion zeigte sich eine Inhibition der GR $\alpha$ -Translokation sowohl bei nicht vorbehandelten Zellen (Abb. 3.3B IV, siehe Pfeilspitzen) als auch in Zellen, in denen die MAPK-Wege zuvor inhibiert wurden (Abb. 3.4B V, -VI, siehe Pfeilspitzen). Bei den Bildausschnitten 3.3A und B handelt es sich um repräsentative Ausschnitte aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

### **3.4 Hitzeinaktivierte *S. pneumoniae* lösen keine GR $\alpha$ -Translokationshemmung aus**

Durch Erhitzen inaktivierte *S. pneumoniae* gelten als avirulent aber durch den Erhalt pathogener Strukturen dennoch als immunogen<sup>196</sup>. Da sich anhand der Ergebnissen von Abb. 3.3 vermuten ließ, dass typische, durch Pneumokokken aktivierte, inflammatorische Signalwege in A549-Zellen die GR $\alpha$ -Kerntranslokation nicht beeinflussen, sollte mit dem folgenden Versuch eine weitere grobe Zuordnung des molekularen Mechanismus der *S. pneumoniae* verursachten Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation erfolgen. Hierbei wurde erneut geprüft, ob es sich um einen direkt vom lebenden Pathogen vermittelten Effekt oder um einen indirekten, über die Induktion von inflammatorischen Signalkaskaden, durch immunogen wirkende Pathogenbestandteile vermittelten Mechanismus handelt. Hierfür erfolgte die Zellstimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken. In der Auswertung von Immunfluoreszenzfärbungen zeigte sich, dass die hitzeinaktivierten *S. pneumoniae* keinen Einfluss auf die GR $\alpha$ -Translokation haben (Abb. 3.4 VI). Hieraus wurde geschlussfolgert, dass der zelluläre Mechanismus der *S. pneumoniae* verursachten GR $\alpha$ -Translokationshemmung von lebenden Pneumokokken abhängig zu sein scheint.

## Ergebnisse



**Abb. 3.4: Die GR $\alpha$ -Translokation wird durch hitzeinaktivierte *S. pneumoniae* nicht inhibiert.**

Dargestellt sind A549-Zellen nach Infektion mit vitalen *S. pneumoniae* (4h,  $1 \times 10^6$  cfu) im Vergleich zu Zellen nach Inkubation mit inaktivierten *S. pneumoniae* ( $1 \times 10^9$  cfu) für den gleichen Zeitraum.

Nach Immunfluoreszenzfärbung mit dem GR $\alpha$ -AK Alexa 488 (grün) sieht man in der Auswertung mittels Konfokalmikroskopie eine deutliche, Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation in A549-Zellen, die mit hitzeinaktivierten *S. pneumoniae* inkubiert wurden (Abb. 3.4 VI, siehe gestielte Pfeile). Im Vergleich dazu bleibt die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation in den mit vitalen *S. pneumoniae* infizierten A549-Zellen überwiegend aus. (Abb.3.4 IV, siehe Pfeilspitzen). Abgebildet sind Immunfluoreszenzbilder aus 3 voneinander unabhängigen Stimulationen.

### **3.5 Ein löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor induziert eine GR $\alpha$ -Translokationsinhibition**

Nachdem kein Hinweis darauf gefunden werden konnte, dass klassische inflammatorische Signalwege in die *S. pneumoniae* induzierte Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation in A549-Zellen involviert sind, wurde die Hypothese verfolgt, dass der gesuchte molekulare Mechanismus direkt durch Pneumokokkenvirulenzfaktoren verursacht wird, die unabhängig von inflammatorischen Signalwegen wirken. Dabei sollte zunächst eine grobe Zuordnung zu entweder löslichen Faktoren wie bspw. Ply oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Pathogen integrierten Bestandteilen, wie z.B. verschiedenen Oberflächenproteine erfolgen. *S. pneumoniae* vermitteln ihre pathogenen Effekte sowohl durch die direkte Zelladhäsion als auch über lösliche Pathogenitätsfaktoren, unabhängig von einem direkten Zellkontakt<sup>3,40,197</sup>.

Zur weiteren Differenzierung diente der nachfolgend beschriebene Versuchsaufbau:

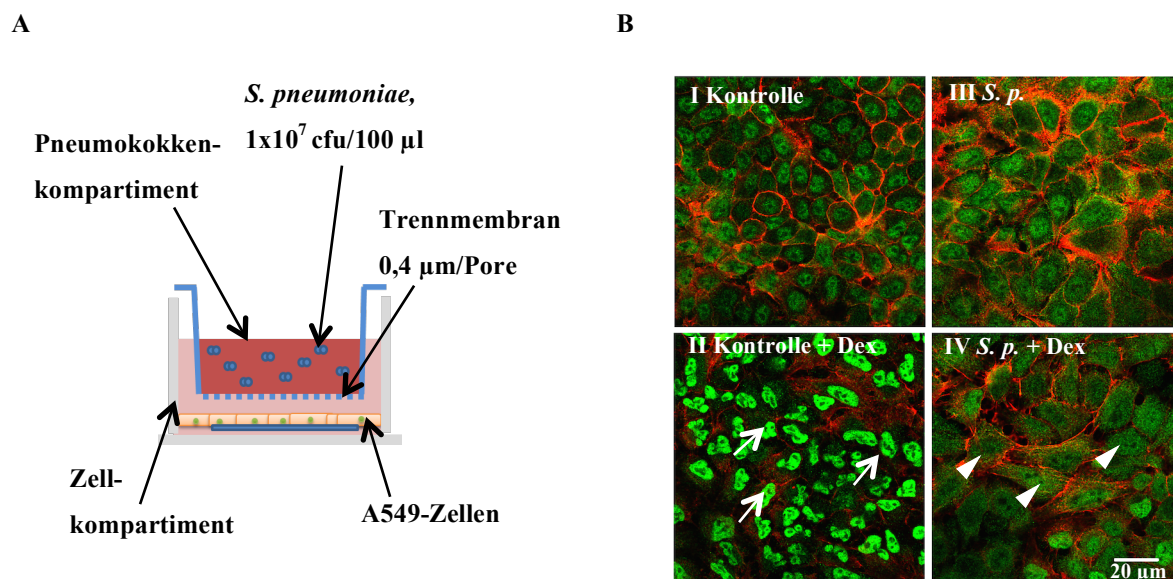
A549-Zellen wurden getrennt durch eine Membran, die für Pneumokokken (1µm) undurchlässig (0,4 µm/Pore) ist, mit *S. pneumoniae* inkubiert. Anschließend erfolgte die

## Ergebnisse

Stimulation mit Dex Abb. 3.5A veranschaulicht den Versuchsaufbau. Ein Übertritt der Bakterien in das Zellkompartiment konnte mittels cfu-Assay aus den Zellüberständen der mit Pneumokokken inkubierten A549-Zellen ausgeschlossen werden. Im simultan durchgeführten cfu-Assay aus Stimulationsmedium des *S. pneumoniae* Kompartiments zeigte sich hingegen ein Pneumokokkenwachstum in der erwarteten cfu-Anzahl (Daten nicht gezeigt).

Die Auswertung mittels Konfokalmikroskopie ergab, dass ein direkter Zellkontakt von Pneumokokken für eine *S. pneumoniae* induzierte Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation nicht erforderlich ist. Zellen, die *S. pneumoniae* nur indirekt durch die Porenmembran exponiert waren, wiesen ebenfalls eine Inhibition der Dex vermittelten GR $\alpha$ -Translokation auf (Abb. 3.5B IV, siehe Pfeilspitzen). Schlussfolgernd kann demnach angenommen werden, dass es sich bei dem ursächlichen Faktor der *S. pneumoniae* induzierten Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation um einen löslichen Pneumokokkenvirulenzfaktor handelt.





**Abb. 3.5: Ein löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor verursacht eine Inhibition der GR $\alpha$ -Translokation.**

**A:** A549-Zellen wurden getrennt durch ein Transwell mit perforiertem Boden für 8 h mit *S. pneumoniae* inkubiert ( $1 \times 10^7$  cfu). Bei einer Porengröße von 0,4  $\mu$ m/Pore ist das Übertreten der 1  $\mu$ m großen Bakterien in das Stimulationskompartiment der A549 Zellen nicht möglich, wie in cfu-Assays bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

**B:** Die GR $\alpha$ -Detektion erfolgte mit Alexa 488 (grün). Abb. 3.5B II zeigt deutlich die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation durch die Grünfärbung der Zellkerne in der Kontrolle (A488, siehe gestielte Pfeile). In Abb.3.5B IV sind Zellen abgebildet, die für 8 h, getrennt durch die Porenmembran, mit den Bakterien inkubiert wurden. Die GR $\alpha$ -Kerntranslokation bleibt hier aus (siehe Pfeilspitzen). Es wurden repräsentative Abbildungen aus mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen ausgewählt.

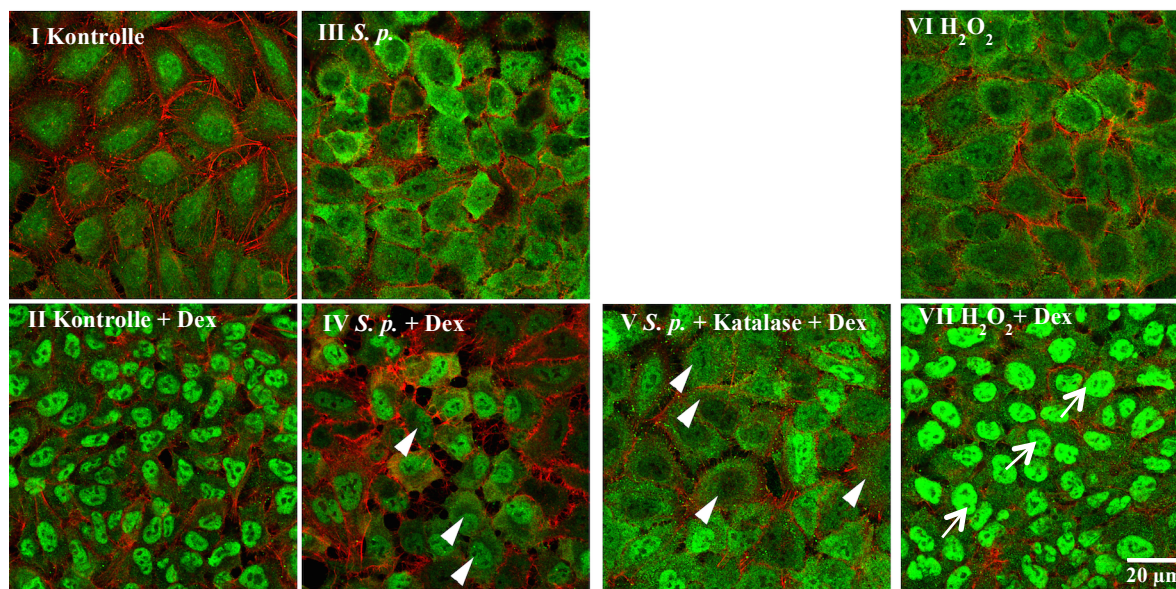
### 3.6 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hat keinen Effekt auf die GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ein löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor, induziert oxidativen Stress und Apoptose in Wirtszellen<sup>66</sup>. Es gibt darüber hinaus Hinweise aus der Literatur, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation bewirken kann<sup>198</sup>.

Zur Prüfung der Hypothese, dass von *S. pneumoniae* synthetisiertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation verursacht, neutralisierten wir das von den Pneumokokken produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Katalase vor Zellinfektion. Abschließend wurden die Zellen mit Dex stimuliert. Die konfokalmikroskopische Auswertung des Versuchs zeigte eine deutliche Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation nach Immunfluoreszenzfärbung der Zellen (Abb. 3.6 IV). Katalase hatte in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht

gezeigt).

Im nächsten Schritt wurden A549-Zellen direkt mit  $H_2O_2$  stimuliert. Die eingesetzte Konzentration von 1mM entsprach dabei einer für Pneumokokkeninfektionen physiologischen Menge wie in einer  $H_2O_2$ -Messreihe an vitalen *S. pneumoniae* demonstriert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Nach 4stündiger  $H_2O_2$ -Inkubation wurden die Zellen eine weitere Stunde mit Dex stimuliert.  $H_2O_2$  hatte keinen Effekt auf die  $GR\alpha$ -Kerntranslokation (Abb. 3.6 VI).



**Abb. 3.6:  $H_2O_2$  hatte keinen Effekt auf die  $GR\alpha$ -Kerntranslokation in A549-Zellen.**

Der  $GR\alpha$  ist grün (Alexa 488), F-Aktin rot (Alexa 546) dargestellt. Nach Infektion von A549-Zellen mit *S. pneumoniae* zeigte sich eine überwiegende Hemmung der Dex induzierten  $GR\alpha$ -Kerntranslokation (Abb. 3.6 IV, siehe Pfeilspitzen). In Abb. 3.6 V wurde zur Infektion mit *S. pneumoniae* Katalase (600 U) hinzugegeben. Die  $GR\alpha$ -Kerntranslokation blieb nach anschließender Dex-Stimulation dennoch aus (siehe Pfeilspitzen). Abb. 3.6 VII zeigt A549-Zellen, die nach 4stündiger  $H_2O_2$ -Stimulation (1mM) mit Dex (1h, 1  $\mu$ M) stimuliert wurden. Die deutliche  $GR\alpha$ -Kernfärbung (gestielte Pfeile) zeigt eine ungehinderte Dex induzierte  $GR\alpha$ -Kerntranslokation. Die einzelnen Bildausschnitte von Abb. 3.6 zeigen typische Ausschnitte aus einer Versuchsreihe mit mindestens 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

### 3.7 Lytisches Pneumolysin verursacht eine Inhibition der GC abhängigen $GR\alpha$ -Translokation

Ply, ein weiterer zentraler, löslicher Pneumokokkenvirulenzfaktor, gehört zu den Cholesterol abhängigen Zytolysinen und verursacht durch seine porenvermittelten, zytotoxischen Effekte einerseits und seine proinflammatorische Wirkung andererseits Lungengewebsschäden im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie<sup>57</sup>.

Es wurden A549-Zellen mit einer kapsellosen, Ply defizienten D39-Mutante ( $D39\Delta cps\Delta ply$ ) infiziert, um die Ply-Wirkung auf die GC induzierte  $GR\alpha$ -Translokation zu testen. Life-Cell

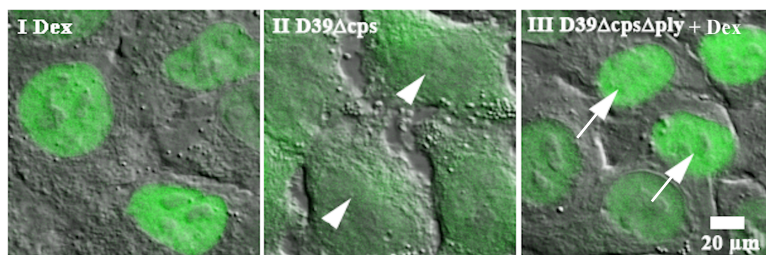
## Ergebnisse

Mikroskopieaufnahmen von A549-Zellen, die zuvor mit Hilfe eines lentiviralen Transduktionssystems stabil mit einem GR-GFP Fusionsvektor transduziert wurden, zeigten eine inhibierte GR $\alpha$ -Translokation nach Infektion mit der Wildtyp Pneumokokken Mutante (Abb. 3.7A II). Dahingegen zeigte sich die GR $\alpha$ -Translokation in den mit Ply defizienten Pneumokokken infizierten A549-Zellen unbeeinträchtigt (Abb. 3.6A III).

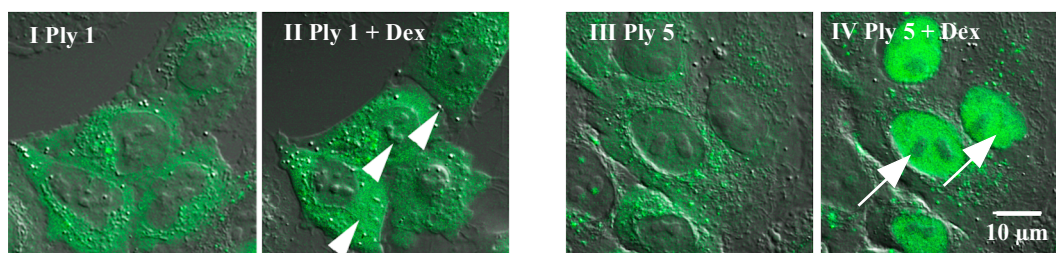
Inwiefern die Ply induzierte GR $\alpha$ -Translokationshemmung von der lytischen Aktivität des Toxins abhängig ist, untersuchten wir durch den Einsatz rekombinanten, nicht lytischen Plys (Allel 5 Ply) im Vergleich mit lytischem Ply (Allel 1 Ply).

Life-Cell Mikroskopieaufnahmen von GR $\alpha$ -GFP transduzierten A549-Zellen, die mit 1  $\mu$ g/ml der entsprechenden Ply-Variante stimuliert wurden, ergaben, dass nur lytisches Ply zur Translokationshemmung führt, jedoch nicht die nichtlytische Variante (Abb. 3.7B).

A



B



**Abb. 3.7: Lytisches Ply ist für eine Hemmung der Dex induzierten GR $\alpha$ -Translokation verantwortlich.**

**A:** Dargestellt sind stabil mit einem GR-GFP-Vektor transduzierte A549-Zellen in der Life-Cell Mikroskopie. In Abb.3.7.A I kommt die deutliche GR $\alpha$ -Kerntranslokation des Rezeptors nach 1 Stunde Dex-Stimulation zur Darstellung (A488, grün.). Nach 7stündiger Infektion mit D39 blieb die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation aus (Abb. 3.7A II, siehe Pfeilspitzen). Im Vergleich hierzu zeigte sich bei den mit D39 $\Delta$ cps $\Delta$ ply infizierten, stabil transduzierten A549-Zellen die Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation nicht inhibiert (Abb. 3.7AIII, siehe gestielte Pfeile).

**B:** Abb. 3.7B, Ausschnitte I-IV, zeigt A549-Zellen in der Life-Cell Mikroskopie, die mit lytischem (Allel 1) oder nichtlytischem (Allel 5) Ply stimuliert wurden. Die Zellen sind zuvor mit einem GR-GFP-Vektor stabil transduziert worden. In Abb. 3.7B I zeigt sich in Abwesenheit von Dex eine homogene Verteilung des mit A488 detektierten GR $\alpha$  (grün) im Zytosol. Trotz Dex-Stimulation (10 min., 1  $\mu$ M) bleibt die Translokation des GR $\alpha$  in den Kern, in den mit Allel 1 Ply stimulierten Zellen, aus (Abb. 3.7B II, siehe Pfeilspitzen). Im Gegensatz hierzu zeigt sich in Abb. 3.7B IV, eine deutliche GR $\alpha$ -Kernfärbung nach Dex Stimulation in A549-Zellen, die mit nichtlytischem Allel 5 Ply stimuliert wurden (s. gestielte Pfeile). Es wurden representative Bildauschnitte aus zumindest 3 Versuchsreihen ausgewählt.

### 3.8 Die Infektion mit *L. pneumophila* hatte keinen inhibitorischen Effekt auf die GR $\alpha$ -Translokation in A549-Zellen

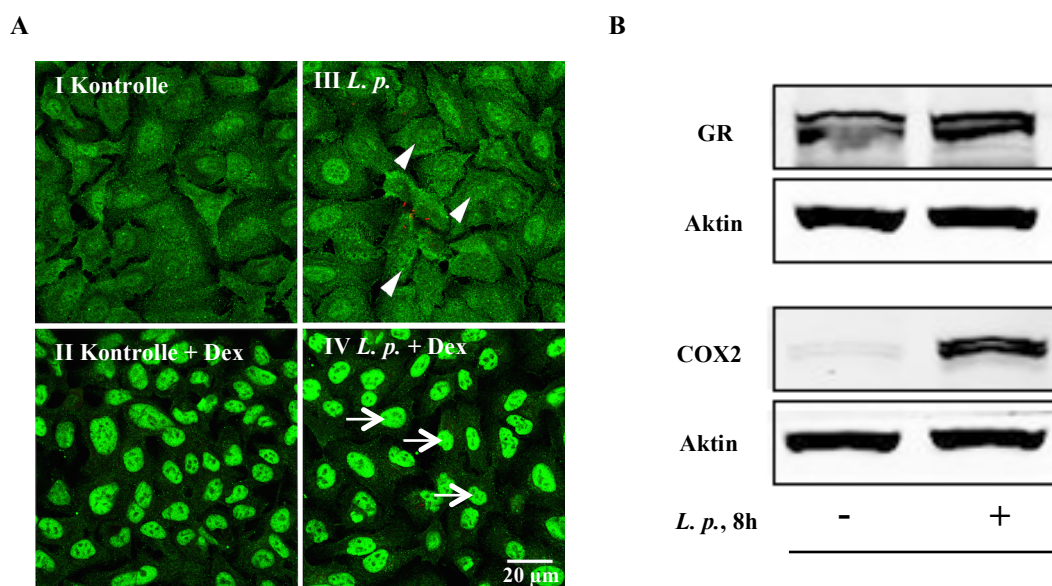
Neben *S. pneumoniae* als häufigstem Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie gehören Legionellen ebenfalls zu den drei häufigsten CAP verursachenden Pathogenen<sup>199</sup>. Es wurde daher untersucht, ob die beobachtete Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation ein für Pneumokokken spezifisches Phänomen darstellt oder ob auch andere CAP verursachende Erreger eine GR $\alpha$ -Translokationshemmung hervorrufen können. Stellvertretend wurde dafür zunächst *L.*

## Ergebnisse

*pneumophila* als gramnegativer, fakultativ intrazellulärer Erreger verwendet.

A549-Zellen, die mit *L. pneumophila* infiziert wurden, zeigten hierbei keine Beeinträchtigung der GR $\alpha$ -Translokation nach Dex-Stimulation (Abb. 3.8A IV).

Der Infektionserfolg wurde im Western Blot an Lysaten von A549-Zellen, die zuvor mit *L. pneumophila* infiziert wurden, geprüft. Eine Induktion der COX2 bei gleichmäßiger Proteinbeladung, dargestellt durch gleichmäßige Aktinbanden, diente als Infektionskontrolle (Abb 3.8B).



**Abb. 3.8: *L. pneumophila* induzierte keine GR $\alpha$ -Translokationshemmung in A549-Zellen.**

**A:** Dargestellt sind A549-Zellen, die für 8 h mit *L. pneumophila* infiziert (Abb. 3.8 III) und anschließend mit Dex (1  $\mu$ M, 1h) inkubiert wurden (Abb. 3.8 IV), im Vergleich zur jeweils nicht infizierten Kontrolle (Abb. 3.8 I und II). Die Auswertung in der Konfokalmikroskopie zeigt eine homogene Verteilung des GR $\alpha$  im Zytoplasma (Abb. 3.8.A III, siehe Pfeilspitzen) und nach Infektion eine deutliche, durch Dex induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation (Abb. 3.8 II und IV, siehe gestielte Pfeile).

**B:** Ein deutlicher COX2-Anstieg nach *L. pneumophila*- Infektion im Western Blot diente als positive Infektionskontrolle. Als Kontrolle der Gesamtproteinbeladung diente die Aktindetektion. Es handelt sich bei Abb.3.8A und -B um repräsentative Abbildungen aus zumindest 3 voneinander unabhängigen Versuchen.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Infektion mit *S. pneumoniae* auf die Signalkaskade des GR $\alpha$  in humanen AEC II untersucht.

Die Basisbeobachtung der Arbeit zeigte, dass die Infektion von kultivierten humanen AEC II mit *S. pneumoniae* zu einer Hemmung der GC induzierten Translokation des GR $\alpha$  vom Zytosol in den Zellkern führt. Dieser Effekt konnte an phAEC II bestätigt werden. Die Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation hatte eine Abnahme von dessen transkriptioneller Aktivität zur Folge. Hierbei kam es weder zur Veränderung des mRNA- noch des Proteinexpressionsniveaus des Rezeptors, so dass von einer funktionellen Inhibition der GR $\alpha$ -Signalkaskade als Ursache auszugehen ist. Weiterführende Untersuchungen konnten den poreninduzierenden Pneumokokkenvirulenzfaktor Ply als maßgeblich für diesen Effekt identifizieren. Gleichzeitig zeigten die Untersuchungen, dass typische, durch Pneumokokken aktivierte inflammatorische Signalkaskaden der angeborenen Immunität nicht an den molekularen Mechanismen der GR $\alpha$ -Funktionshemmung beteiligt zu sein scheinen.

### 4.1 Dysbalancierte Entzündungsreaktion bei der sCAP

In Abhängigkeit individueller Risikofaktoren und Komorbiditäten reicht das Spektrum der klinischen Verlaufsformen einer CAP von einer selbstlimitierenden, ambulant behandelbaren Erkrankung bis hin zur sCAP mit der Entwicklung eines ARDS, einer Sepsis sowie eines tödlich verlaufenden, konsekutiven Multiorganversagen. Nach wie vor zählt sie weltweit zu den führenden Todesursachen durch Infektionserkrankungen bei vergleichsweise geringem Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen<sup>200–203</sup>. Klinische Studien konnten zeigen, dass selbst die nachgewiesene Erregerabtötung durch Antibiotika keinen sicheren Schutz vor der Ausbildung eines tödlichen Verlaufs einer sCAP bieten kann<sup>204–206</sup>. Dies deutet darauf hin, dass die Entzündungsreaktion selbst erheblich zu den schweren, klinisch nicht kontrollierbaren Verlaufsformen beiträgt. Dabei wird einerseits angenommen, dass eine Pathogen induzierte, überschießende inflammatorische Reaktion mit fehlender Selbstlimitierung ursächlich verantwortlich ist, andererseits scheinen endogene antiinflammatorische Mechanismen zur Terminierung dieser überschießenden Entzündungsreaktion nur unzureichend entgegen zu regulieren<sup>81,126,180,206–209</sup>.

GC gelten als potente, endogene antiinflammatorische Hormone und finden daher bereits breiten Einsatz in der Therapie sowohl akut als auch chronisch inflammatorischer Erkrankungen<sup>117,133,180</sup>. Vor dem Hintergrund der Annahme, dass eine überschießende inflammatorische Reaktion die Ursache von schweren CAP-Verläufen darstellt, adressierten

zahlreiche klinische Studien in den letzten fünf Jahrzehnten den adjunktiven Einsatz von GC auch in der Therapie der sCAP<sup>30,176,177,182,210–212</sup>. Metaanalysen kamen jedoch zu sehr kontroversen Ergebnissen bzgl. des Effektes von GC auf den Verlauf einer sCAP<sup>124,126,174,176</sup>. Hierbei konnte ein eindeutig protektiver Effekt von GC auf den Verlauf einer sCAP in Hinblick auf den Endpunkt Letalität bislang nicht belegt werden<sup>29,124</sup>. Hingegen warnen einige Studien vor gefährlichen Komplikationen, wie Superinfektionen oder prolongierten Pneumonieerläufen, die durch GC hervorgerufen werden können<sup>174,176</sup>. Ferner bemängeln Kritiker die Heterogenität der untersuchten Patientenkollektive sowie die uneinheitlichen Studienprotokolle bzgl. kausativer Erreger, Komorbiditäten und Krankheitsschweregraden, wodurch die Aussagekraft der durchgeführten Studien zum Einsatz von GC in der Pneumonietherapie eingeschränkt wird<sup>124,213</sup>. Von einem adjunktiven Einsatz von GC in der Therapie der CAP wird daher derzeit abgeraten<sup>124</sup>.

Trotz ihrer potenten antiinflammatorischen Wirkung bleibt gegenwärtig unklar, warum GC die potentiell tödliche Hyperinflammation in sCAP-Patienten nicht hinreichend eindämmen können. Nach Kenntnisstand der aktuellen Literatur existieren keine Studien, welche explizit die Auswirkung spezifischer Pathogene auf die GC-GR $\alpha$ -Signalkaskade im Rahmen von Pneumonien in den Fokus genommen haben. Jedoch ist bekannt, dass verschiedene Pathogene mit ihren unterschiedlichen Arsenalen von Virulenzfaktoren zu spezifischen und somit auch überschießenden Entzündungsreaktionen in pulmonalem Gewebe beitragen<sup>81</sup>. Dies führte zu der übergeordneten Fragestellung der vorliegenden Arbeit, inwiefern Pathogene möglicherweise eine GC-Resistenz bei CAP-Patienten induzieren können. Im Speziellen fokussierten sich die Untersuchungen dabei zunächst auf den wichtigsten Erreger der CAP, *S. pneumoniae*<sup>205</sup>. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen erstmals, dass eine Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer funktionellen Inhibition der GC induzierten GR $\alpha$ -Kerntranslokation in humanen Alveolarepithelzellen führt. Hiermit besteht ein wichtiger Hinweis auf die geschilderte Problematik, dass GC im Zielgebiet der Pneumonie, der humanen Alveole, im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen inadäquat wirken.

#### **4.2 Bedeutung inflammatorischer Signalwege bei der durch *S. pneumoniae* verursachten GR $\alpha$ -Translokationshemmung**

Das Auftreten von Resistenzen gegenüber der immunregulativen Wirkung von GC stellt ein bedeutendes Problem in der Behandlung vieler inflammatorischer Erkrankungen, wie Asthma bronchiale, ARDS, Sepsis, RA oder CED, dar<sup>184,208,214–216</sup>. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wurden vielfach erforscht<sup>194,217</sup>. Verschiedene molekulare Mechanismen von GC-

Resistenzen konnten bereits identifiziert werden<sup>184</sup>. Zusammengefasst handelte es sich hierbei überwiegend um Modifikationen am GR $\alpha$  selbst oder um eine Inhibition auf verschiedenen Ebenen der GC-GR $\alpha$ -Signalkaskade durch überaktivierte Mediatoren und Effektoren inflammatorischer Signalkaskaden<sup>184,216,218,219</sup>. Dem zugrunde liegt einerseits, dass antiinflammatorische Effekte des GR $\alpha$ , wie z.B. die Hemmung von anderen Transkriptionsfaktoren durch Protein-Protein Interaktion oder die Inhibition von deren Ko-Faktoren, wechselseitig möglich sind<sup>194</sup>. D.h., dass die abnorme Aktivierung inflammatorischer Signalwege, die eigentlich Ziele der antiinflammatorischen Aktionen des GR $\alpha$  darstellen, mit dem gegenteiligen Effekt, also einer GC-Resistenz, einhergehen kann<sup>194</sup>. Unabhängig von der direkten Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren ist der GR $\alpha$  als Phosphoprotein außerdem empfänglich für posttranslationale Modifikationen, welche zu einer GR $\alpha$ -Funktionsinhibition führen können<sup>220,221</sup>. Verschiedene Funktionen des GR $\alpha$ , wie z.B. die Ligandenbindung oder die GR $\alpha$ -Kerntranslokation, werden über die Modifikation an Phosphorylierungsstellen reguliert<sup>216,217,222</sup>. Inflammatorische Kinasen wie die MAPK p38 und JNK wurden in diesem Zusammenhang mehrfach identifiziert, durch die GR $\alpha$ -Phosphorylierung zu einer Beeinträchtigung der Rezeptorfunktion beitragen zu können<sup>158,220,221,223</sup>.

Die Ergebnisse aus Studien zu ursächlichen molekularen Mechanismen von GC-Resistenzen bei inflammatorischen Erkrankungen dienten der vorliegenden Arbeit als Orientierung auf der Suche nach dem zugrunde liegenden Mechanismus der *S. pneumoniae* induzierten GR $\alpha$ -Translokationshemmung in pulmonalen Alveolarepithelzellen. Denn auch eine Infektion durch *S. pneumoniae* geht typischerweise mit einer starken Entzündungsreaktion der angeborenen Immunität im betroffenen Gewebe einher<sup>85,224,225</sup>. Es wurde daher die Hypothese geprüft, dass die durch Pneumokokkeninfektionen induzierte Entzündungsreaktion im pulmonalen Gewebe eine GR $\alpha$ -Translokationshemmung verursacht.

Interessanterweise zeigten Studien zu GC-Resistenzen in chronisch inflammatorischen Erkrankungen der Atemwege, wie Asthma bronchiale oder chronischer Rhinosinusitis, dass virale und bakterielle Infektionen zu einer Verstärkung und Aufrechterhaltung der mukosalen Inflammation und konsekutiv zu einer herabgesetzten Sensitivität gegenüber GC beizutragen scheinen<sup>185,186,226</sup>. In diesem Zusammenhang wird postuliert, dass mikrobielle Bestandteile eine GC-Resistenz indirekt, also über die Induktion proinflammatorischer Signalwege, herbeiführen können<sup>226</sup>. Mit dieser Hypothese übereinstimmend konnten auch Goleva *et al.* an BAL-Proben von Asthmapatienten zeigen, dass die Infektion mit *H. parainfluenza*, einem häufig bei Asthma Infektexazerbationen isoliertem gramnegativen Bakterium, im Gegensatz zu Proben, die mit dem



apathogenen Kommensalen *Prevotella melaninogenica* inkubiert wurden, zu einer Aktivierung von p38 MAPK und IL-8 sowie konsekutiv zu einer Reduktion der GC-Sensitivität in Makrophagen führte. Nach Inhibition der MAPK- und NF- $\kappa$ B vorgeschalteten Kinase TAK-1 konnte die zelluläre GC-Sensitivität vollständig wieder hergestellt werden. Die Objektivierung der GC-Sensitivität wurde anhand der Darstellung der Aktivität der MAPK-Phosphatase-1, eines antiinflammatorischen GR $\alpha$ -Genproduktes, durchgeführt<sup>226</sup>. In einer anderen Studie zu GC-Resistenzen bei infektexazerbiertem Asthma konnten Papi *et al.* zeigen, dass die Infektion von alveolären Epithelzellen der Zelllinie A549 mit Rhinoviren zu einer Inhibition der GR $\alpha$ -Kerntranslokation führte, was eine Inhibition der Dex induzierten GR $\alpha$ -Transaktivierung und -Transrepression zur Folge hatte<sup>227</sup>. Als Schlüsselemente der durch Rhinovirusinfektionen induzierten GR $\alpha$ -Inhibition konnten die JNK- und NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden identifiziert werden, da durch die Inhibition dieser Signalkaskaden die GR $\alpha$ -Funktion vollständig wieder hergestellt werden konnte. Die ursächlichen molekularen Mechanismen der JNK- und NF- $\kappa$ B-induzierten GR $\alpha$ -Funktionsinhibition konnten in dieser Studie ebenfalls aufgedeckt werden. So zeigte sich einerseits in Abhängigkeit von der vermehrten Aktivität der JNK MAPK eine Zunahme der GR $\alpha$ -Phosphorylierung an deren Phosphorylierungsstelle Ser226, was konsekutiv zu einer GR $\alpha$ -Translokationshemmung führte. Andererseits wurde die GR $\alpha$ -Kerntranslokation durch eine Komplexbildung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 mit dem GR $\alpha$  im Zytosol ebenfalls inhibiert<sup>227</sup>.

Zur Beantwortung der Frage, ob typische, durch *S. pneumoniae* aktivierte inflammatorische Signalwege die GR $\alpha$ -Kerntranslokation in Alveolarepithelzellen inhibieren, erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Stimulationsversuche mit TLR-Liganden und Zytokinen sowie die Inhibition der MAPK p38 und JNK während der Infektion mit *S. pneumoniae*. Zudem erfolgte die Zellstimulation mit durch Hitze inaktivierte Pneumokokken, die durch die erhaltenen pathogenen Strukturen, trotz Bakterienabtötung immunogene Effekte auf die Zielzelle ausüben, wie in anderen Zellstudien bestätigt werden konnte<sup>228,229</sup>.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen dabei jedoch im Kontrast zu den Daten aus den genannten Studien zur GC-Resistenz im Rahmen von Atemwegsinfektionen durch andere Pathogene. So zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Hinweis darauf, dass die durch *S. pneumoniae* induzierte Hemmung der GR $\alpha$ -Kerntranslokation in A549-Zellen durch typische, von Pneumokokken aktivierte inflammatorische Signalkaskaden hervorgerufen wird. Weder die direkte Stimulation mit Liganden der TLR 2, -4 und -9 noch die Stimulation mit den inflammatorischen Zytokinen TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hatten eine Inhibition der GR $\alpha$ -Kerntranslokation zur Folge. Auch die Stimulation mit durch Hitze inaktivierten Bakterien hatte

keinen inhibitorischen Effekt auf die GR $\alpha$ -Kerntranslokation. Ferner konnte die Inhibition der GR $\alpha$ -Kerntranslokation nach Infektion durch *S. pneumoniae* durch Inhibitoren der p38- und JNK-MAPK Wege nicht verhindert werden.

Bei der Interpretation dieser Daten ist zunächst zu berücksichtigen, dass die entsprechenden PRR möglicherweise auf der untersuchten Zelllinie nicht oder nur inkomplett exprimiert sind. Diese Hypothese unterstützend hatte die Stimulation von A549-Zellen mit LPS tatsächlich nur eine schwache Induktion NF- $\kappa$ B abhängiger Gene zur Folge (Daten nicht gezeigt). Zum Vergleich wurden die Stimulation von phAEC II mit den TLR-Liganden bzw. Zytokinen und eine Inhibition von MAPK-Wegen bislang noch nicht getestet. Dies sollte in weiterführenden Studien nachgeholt werden. Da A549-Zellen aber eine *S. pneumoniae* induzierte GR $\alpha$ -Translokation aufweisen, kann aus den erhobenen Daten dennoch geschlossen werden, dass zumindest in der untersuchten Zelllinie die geprüften inflammatorischen Signalwege nicht ausschlaggebend in den gesuchten Pathomechanismus involviert sind.

Im Vergleich zu den Daten der zitierten Studien zu mikrobiell verursachten GC-Resistenzen bei Asthmapatienten muss in Betracht gezogen werden, dass es sich auch um erregerspezifische, je nach verfügbaren Virulenzfaktoren unterschiedliche Mechanismen handeln könnte. So verfügen Pneumokokken im Unterschied zu den oben genannten Erregern (*H. parainfluenzae*, Rhinoviren) neben ihren stark proinflammatorischen Eigenschaften über lösliche Toxine wie Ply und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mit denen sie direkt zytotoxische Effekte verursachen<sup>40,41</sup>. Es erschien daher naheliegend, die direkte Auswirkung der Pneumokokkenvirulenzfaktoren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Ply auf die GR $\alpha$ -Translokation zu überprüfen.

### **4.3 Die Auswirkung der Virulenzfaktoren Wasserstoffperoxid und Pneumolysin auf die GR $\alpha$ -Translokation**

Die Menge an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches von *S. pneumoniae* produziert wird (bis zu 2 mM), übersteigt deutlich die von anderen Bakterien, wie bspw. *E. coli*<sup>73,77</sup>. Durch die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verschaffen sich Pneumokokken zum einen Vorteile in der Konkurrenz gegenüber anderen Kommensalen bei der Kolonisation der oberen Atemwege, zum anderen zeigte sich, dass von Pneumokokken produziertes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als löslicher Virulenzfaktor zytotoxische Effekte auf Zellen infizierter Gewebe ausübt und damit den Progress einer Pneumokokkeninfektion beschleunigen kann<sup>72,230</sup>. Wir gingen mit Versuchen der vorliegenden Arbeit den Hinweisen aus einer Zellstudie von Hakim, A. *et al.* nach, die einen inhibitorischen Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die GC induzierte Kerntranslokation vom GR $\alpha$  beschrieben haben<sup>198</sup>. In dieser Studie an einer Makrophagenzelllinie zeigte sich, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen indirekt inhibitorischen Effekt auf Importin-7

hat, welches als Frachtprotein eine zentrale Rolle für den nukleären Import von GR $\alpha$  einnimmt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schien dabei unabhängig von der Induktion von Apoptose über die Suppression des Energielieferanten und Importin-7 Kofaktor Ran-GTP einen inhibitorischen Effekt auf Importin-7 auszuüben. Dies hatte eine herabgesetzte GC induzierte Suppression inflammatorischer Gene zur Folge<sup>198</sup>. Mit diesen Daten wurde einerseits demonstriert, dass das Importin-7-Transporter-System eine zentrale Funktion für den nukleären Import von GR $\alpha$  in der untersuchten Zelllinie hat, andererseits wird anhand dieser Studie deutlich, dass das Auftreten von GC-Resistenzen bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen durch exogenen oxydativen Stress durch eine Hemmung der Importin-7 vermittelten GR $\alpha$ -Translokation erklärt werden kann<sup>198</sup>. In Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte dies nicht bestätigt werden. Obwohl die eingesetzte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration in unseren Versuchen sogar die der in der Studie von Hakim *et al.* übertraf, blieb die GR $\alpha$ -Kerntranslokation unbeeinflusst.

Bei der Interpretation dieser widersprüchlichen Ergebnisse bzgl. des Effektes von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die GR $\alpha$ -Funktion könnte man schlussfolgern, dass es sich um zellspezifisch unterschiedliche Reaktionen auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> handelt. Es ist in der Literatur beschrieben, dass der nukleäre Import von GR $\alpha$  kontext- und gewebespezifisch durch unterschiedliche Transportproteine reguliert wird<sup>231,232</sup>. Für Atemwegsepithelzellen wurde in einer Zellstudie von Tao *et al.* bspw. dem Importin-13 eine zentrale Rolle in der Regulation der GR $\alpha$ -Kerntranslokation zugeschrieben<sup>232</sup>. Möglicherweise reagiert das Importin-13-Importsystem weniger sensitiv auf die Auswirkungen oxydativen Stresses. Weiterhin besteht eine vergleichsweise hohe antioxydative Kapazität in der Lungenalveole, was möglicherweise eine höhere Toleranz von AEC II gegenüber ROS erklärt. Es bleibt außerdem spekulativ, ob Krebszellen wie Zellen der Linie A549 ebenfalls eine verminderte Anfälligkeit gegenüber der toxischen Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufweisen, denn hierzu konnte kein Literaturhinweis gefunden werden.

Hinweisen aus anderen Zellstudien nachgehend, in denen ein inhibitorischer Effekt von mikrobiellen Toxinen auf die GR $\alpha$ -Funktion beschrieben wurde, wurde nachfolgend die Auswirkung des Pneumokokkenvirulenzfaktors Ply auf die GC induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation in AEC II untersucht<sup>185-187,221</sup>. Ply konnte hierbei als der gesuchte, die GR $\alpha$ -Kerntranslokation inhibierende Pneumokokkenvirulenzfaktor identifiziert werden. So hatte einerseits die Zellinfektion mit einer Ply defizienten *S. pneumoniae* Mutante keinen Einfluss auf die GR $\alpha$ -Kerntranslokation, andererseits führte die direkte Zellstimulation mit aufgereinigtem Ply zur Inhibition der GC induzierten GR $\alpha$ -Kerntranslokation. Der ursächliche molekulare Mechanismus der durch Ply verursachten GR $\alpha$ -Translokationshemmung wurde in der

vorliegenden Arbeit nicht untersucht und bietet Inhalt für weiterführende Studien. Jedoch konnten mögliche pathophysiologische Mechanismen bereits weiter eingegrenzt werden. Zunächst lag die Hypothese nahe, dass Ply indirekt, über die Induktion proinflammatorischer Signalwege, die GR $\alpha$  Funktion hemmt. Denn Ply führt neben seiner zytolytischen Eigenschaft als porenformendes Toxin zu einer starken Aktivierung inflammatorischer Signalwege in den Zielzellen<sup>42,59</sup>. Über die Aktivierung des TLR4-Signalweges kommt es zur Induktion NF- $\kappa$ B abhängiger Gene sowie zur Aktivierung von MAPK-Signalkaskaden mit der konsekutiven Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren und darüber zu einer Verstärkung der Inflammation<sup>42,57,85</sup>. Für andere mikrobielle Toxine, die mit einer GR $\alpha$ -Funktionsinhibition assoziiert worden sind, wurde bereits beschrieben, dass es indirekt im Rahmen der verursachten Entzündungsreaktion zu einer GC-Resistenz kommen kann<sup>185</sup>. Ein in diesem Zusammenhang häufig untersuchtes Bakterientoxin ist LPS, ein Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien<sup>185</sup>. So zeigten Fernandez-Bertolín *et al.* erst kürzlich in einer Zellstudie zur GC-Resistenz bei chronischer Rhinosinusitis mit Polyposis nasi, dass das Bakterienendotoxin LPS zu einer starken Induktion NF- $\kappa$ B- und MAPK abhängiger Zytokine und am ehesten konsekutiv zu einer GR $\alpha$ -Translokationshemmung in Fibroblasten nasaler Schleimhaut führt<sup>186</sup>. GC vermittelte antiinflammatorische Effekte, wie die Inhibition der Produktion von Zytokinen in mit LPS präinkubierten Zellen, zeigten sich eingeschränkt<sup>186</sup>. Auch bakterielle Superantigene, also Bakterienantigene, die direkt eine unspezifische T-Zellaktivierung provozieren und bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale zum Krankheitsprogress beitragen, wurden mit der Entstehung von GC-Resistenzen in Zusammenhang gebracht<sup>168,233</sup>. So hatte in einer Zellstudie von Li, Ling-Bo *et al.* an gesunden Spenderlymphozyten die Stimulation mit dem Staphylokokken Exotoxin B (SEB) eine Hemmung der Dex induzierten GR $\alpha$ -Kerntranslokation zur Folge. Durch Versuche, in denen spezifische MAPK-Inhibitoren eingesetzt wurden, konnte eine MEK/ERK vermittelte GR $\alpha$ -Phosphorylierung als pathogener Mechanismus der SEB verursachten GC-Resistenz identifiziert werden<sup>233</sup>.

Obwohl es sich bei Ply ebenfalls um ein stark proinflammatorisches Bakterientoxin handelt, zeigten Ergebnisse dieser Arbeit, dass Ply aktivierte inflammatorische Signalkaskaden keinen Einfluss auf die GC-vermittelte GR $\alpha$ -Translokation zu haben scheinen. Als direkten TLR Liganden setzten wir in unseren Versuchen ebenfalls LPS ein. LPS hatte im Gegensatz zu den Ergebnissen der Studie von Fernandez-Bertolín und Kollegen keinen Einfluss auf die GR $\alpha$ -Translokation in AEC II der Zelllinie A549. Wie bereits erwähnt, muss hierfür ursächlich angenommen werden, dass durch LPS aktivierte PRR nur unzureichend in der untersuchten

## Diskussion

Zelllinie exprimiert werden. Zusammenfassend wird die Erkenntnis, dass die Ply induzierte GR $\alpha$ -Translokationshemmung in AEC II im Gegensatz zur GR $\alpha$ -Inhibition durch andere mikrobielle Toxine nicht durch inflammatorische Mediatoren oder Transkriptionsfaktoren verursacht wird, damit noch unterstützt. Die Ply vermittelte Inhibition der GC-induzierten GR $\alpha$ -Kerntranslokation scheint folglich von direkt durch Ply verursachten, zytotoxischen Effekten abzuhängen.

Als Cholesterol abhängiges Zytolysin führt die Bindung von Ply an Cholesterol haltige Zellmembranen zur Membrandestabilisierung durch die Ausbildung von Poren<sup>57</sup>. Dosisabhängig führt Ply durch die Porenbildung zum Zelltod der Zielzelle<sup>42,57</sup>. In sublytischen Konzentrationen führt die Ply abhängige Ausbildung von Mikroporen in der Zellmembran zu einem Kalziumeinstrom, was über die Aktivierung von Rho-GTPasen eine Destabilisierung des Aktin-Zytoskeletts zur Folge hat<sup>58</sup>. Konsekutiv führt Ply im pulmonalen Gewebe zu einer Auflösung der epithelialen Integrität und darüber zu einer veränderten alveolären Permeabilität<sup>47</sup>. Zur Prüfung der Hypothese, dass die Ply vermittelte GR $\alpha$ -Translokationshemmung durch die direkt zytolytischen Eigenschaften des Toxins verursacht wird, erfolgte daher die Zellstimulation mit lytischem im Vergleich zu nicht lytischem Ply. Hierbei zeigte sich, dass nur das lytische Allel 1 Ply einen inhibierenden Effekt auf die GR $\alpha$ -Translokation hatte. Bei der Zellstimulation mit nicht lytischem Allel 5 Ply war die GR $\alpha$ -Translokation nicht beeinträchtigt.

Insbesondere aus Studien zu Pneumokokkeninfektionen des ZNS ist bekannt, dass Ply durch seine zytolytischen Effekte Apoptose induziert<sup>234,235</sup>. Die proapoptotischen Effekte von Ply scheinen wiederum multifaktoriell und sind vorrangig abhängig von einer direkten Membraninteraktion<sup>234</sup>. Die Aktivierung von Caspasen scheint nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie in einer Studie an humanen Mikrogliazellen von S. Braun *et al.* demonstriert werden konnte<sup>236</sup>. Die Inhibition von Caspasen hatte in dieser Studie tatsächlich nur einen teilprotektiven Effekt vor Ply induzierter Apoptose<sup>236</sup>. Vielmehr zeigte sich, dass es durch die direkte Membranpermeabilisierung durch Ply zu einer massiven mitochondrialen Schädigung mit der Folge der Freisetzung eines Apoptose induzierenden Faktors (AIF) kam. Weiterhin kommt es über den erhöhten Kalzium Influx zur Aktivierung proinflammatorischer Signalkaskaden mit der konsekutiven Aktivierung von Caspase Signalwegen<sup>236</sup>.

Auch in Versuchen der vorliegenden Arbeit hatte die Zellstimulation mit Ply ein rasches Auftreten von Apoptosezeichen zur Folge, wie z.B. die Ausbildung von Aktin Stressfasern und Zellverkürzung. (Daten nicht gezeigt) In weiterführenden Untersuchungen wäre es einerseits interessant zu überprüfen, ob die Inhibition von Apoptosesignalwegen die Wirkung von Ply auf

die GR $\alpha$ -Translokation in Alveolarzellen verhindern könnte, andererseits könnte die Gegenprobe, also die Auswirkung von Apoptosesignalwegen auf den GR $\alpha$  unabhängig von Ply, weiterhelfen, die Hypothese zu prüfen, dass durch Ply induzierte Apoptosesignalwege für die *S. pneumoniae* induzierte GR $\alpha$ -Translokationshemmung verantwortlich sind.

In diesem Zusammenhang interessant erscheint eine kürzlich publizierte Zellstudie an A549-Zellen von S. Pleschka *et al.* zur Caspase induzierten Veränderung nukleärer Porenkomplexe und damit zur Beeinträchtigung nukleärer Transportprozesse. In dieser Studie konnte demonstriert werden, dass die apoptotische Aktivierung von Caspasen im Rahmen von Infektionen mit Influenzaviren zu einer Degradation des Nukloporin Nup153 führte. Hierbei handelt es sich um einen integralen Bestandteil von nukleären Porenkomplexen<sup>237</sup>. Es wäre denkbar, dass auch apoptotisch aktivierte Caspasen im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen zu einer Veränderung nukleärer Transportvorgänge und damit einhergehend zur Beeinträchtigung des nukleären Imports vom GR $\alpha$  führen. Konkrete Hinweise auf einen apoptotisch inhibierten GR $\alpha$ -Kernimport konnten in der Literatur nicht gefunden werden. In weiterführenden Untersuchungen wäre ein Versuchsmodell denkbar, in dem die Auswirkung aktivierter Caspasen auf die GR $\alpha$ -Translokation in AEC II Zellen geprüft wird. Weiterhin könnte in der Gegenprobe geprüft werden, wie sich eine Inhibition von apoptotisch aktivierten Caspasen auf die GR $\alpha$ -Translokation während Pneumokokkeninfektionen auswirkt.

#### **4.4 Fazit und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals demonstriert werden, dass Pneumokokken eine funktionelle Inhibition des GR $\alpha$  in humanen AEC II hervorrufen. Es konnte weiterhin der hierfür verantwortliche Pneumokokkenvirulenzfaktor Ply identifiziert werden. Der von Pneumokokken verursachte GR $\alpha$  inhibierende Effekt ist abhängig von der Poren bildenden Eigenschaft von Ply. Hiermit besteht ein erster Hinweis auf eine mögliche pathophysiologische Erklärung für die häufig bei CAP-Patienten beobachtete, insuffiziente Wirksamkeit einer adjunktiven GC-Therapie. Zur Prüfung der klinischen Relevanz und einer möglichen therapeutischen Konsequenz dieser Ergebnisse bedarf es jedoch weiterführender Untersuchungen.

##### **4.4.1 Bestätigung der Ergebnisse im Lungenmodell**

Zur Bestätigung der klinischen Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit muss in weiterführenden Untersuchungen zunächst eine Überprüfung der Befunde im humanen Lungenmodell durchgeführt werden. Ein Pneumokokken Infektionsmodell an explantiertem Lungengewebe

konnte kürzlich in der Arbeitsgruppe etabliert werden<sup>238</sup>. Vorläufige Daten zeigten in diesem *ex vivo* Modell, dass die Infektion humanen Lungengewebes mit *S. pneumoniae* zur Hemmung der GR $\alpha$ -Translokation und konsekutiv zur Reduktion der Expression Dex abhängiger Gene führt. In weiteren Versuchen muss als nächstes Ply als ursächlicher Faktor der reduzierten GC-Wirksamkeit im Lungenmodell bestätigt werden. Es sollten hierbei eine Ply defiziente Pneumokokken Mutante sowie die aufgereinigten Ply-Varianten (Allel 1 und Allel 5 Ply) in Stimulationsversuchen eingesetzt werden. Weiterhin könnte ein vergleichender Infektionsversuch mit verschiedenen Pneumokokkenserotypen, die unterschiedliche Ply-Varianten (lytisch vs. nichtlytisch) bei gleichbleibender Pathogenität exprimieren, durchgeführt werden. Auch sollten Stimulationsversuche mit Liganden von PRR und inflammatorischen Signalwegen, die typischerweise durch *S. pneumoniae* aktiviert werden im Lungenmodell erfolgen, um die in dieser Arbeit an A549-Zellen erhobenen Daten zur Frage nach der Bedeutung inflammatorischer Signalwege beim Pathomechanismus der GR $\alpha$ -Translokationshemmung durch Pneumokokken zu überprüfen.

#### 4.4.2 Erregerdifferenzierung in Studien zum GC-Einsatz bei CAP-Patienten

Zahlreiche Studien in den letzten fünf Jahrzehnten beschäftigten sich mit der Frage nach einer Wirksamkeit von GC bei CAP-Patienten in Hinblick auf eine Verbesserung der Gesamtprognose im Allgemeinen und spezifische Endpunkte wie z.B. Letalität, im Speziellen. Es existieren jedoch nur sehr wenige Studien, die eine Differenzierung der kausativen Erreger im Rahmen dieser Fragestellung berücksichtigten. Ein Beispiel ist eine Studie an rund 200 CAP-Patienten von Snijders D. *et al.* aus dem Jahr 2009, in der die Wirksamkeit einer adjunktiven Prednisolontherapie in Hinblick auf eine klinische Besserung geprüft wurde. Bei 118 Patienten wurde hierin eine ätiologische Diagnose gestellt. Dabei handelte es sich in 36% der Fälle um *S. pneumoniae* als häufigstem isolierten Erreger. Interessanterweise traten gerade in der Patientengruppe mit Pneumokokkenpneumonien, die mit Prednisolon therapiert wurden, im Vergleich zur Placebogruppe vermehrt Komplikationen wie Krankheitsrezidiv oder Superinfektionen auf, während in der Patientengruppe mit Pneumonien durch andere Erreger die Prednisolontherapie gar keinen Effekt hatte<sup>176</sup>. Auch H. Remmelts und Kollegen fanden einen signifikanten Unterschied der Dex-Wirkung auf Zytokinspiegel in Pneumoniepatienten mit unterschiedlicher mikrobieller Ätiologie<sup>181</sup>. 304 Patienten mit einer CAP wurden untersucht und randomisiert entweder mit einer täglichen Einmalgabe von 5 mg Dex oder mit Placebo behandelt. Es wurde grob unterschieden zwischen Pneumokokkenpneumonien und Pneumonien durch atypische Erreger. Die antiinflammatorische Wirksamkeit der GC-Therapie wurde anhand

der Zytokinspiegel von IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  und MCP-1 gemessen. Während bei Patienten mit atypischer Pneumonie ein rascher und signifikanter Abfall der Zytokinkonzentration gemessen werden konnte, hatte Dex in Patienten mit einer Pneumokokkenpneumonie nur geringe Effekte auf die Zytokinkonzentration<sup>181</sup>.

Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt sich daran, dass eine Erregerdifferenzierung zur Beantwortung der Frage nach einer Wirksamkeit des Einsatzes von GC in der Pneumonietherapie relevant ist, da ein Therapieansprechen möglicherweise von der Ätiologie der Pneumonie abhängig ist. Darüber hinaus ist in Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Falle von Pneumokokkenpneumonien sogar die Differenzierung des kausativen Serotyps notwendig. So wurde für einige Isolate von Pneumokokkenserotypen, die mit Ausbrüchen invasiver Pneumokokkeninfektionen (*invasive pneumococcal disease*, IPD) assoziiert worden sind, die Expression einer nicht- oder nur gering lytischen Ply-Variante beschrieben<sup>53,54</sup>. Hierzu gehörten Pneumokokkenisolate der Serotypen 1, 7 und 8<sup>53-55</sup>. Schlussfolgernd erscheint es sehr wichtig, in zukünftigen Studien zum adjunktiven Einsatz von GC in der CAP-Therapie den Fokus auch auf die Differenzierung des kausativen Pathogens zu richten.

### 4.4.3 Überprüfung des Effekts von anderen Pneumonieerregern auf die GR $\alpha$ -Funktion

Verschiedene Pathogene wurden mit einer mikrobiellen Beeinträchtigung der GR $\alpha$ -Funktion durch unterschiedliche molekulare Mechanismen assoziiert<sup>185</sup>. Es ist anzunehmen, dass auch andere Pneumonieerreger außer *S. pneumoniae* eine GC-Resistenz bei CAP-Patienten hervorrufen können. Daher ist es wichtig, dass in zukünftigen Untersuchungen auch andere häufige Pneumonieerreger in Bezug auf ihren Effekt auf die GR $\alpha$ -Funktion überprüft werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Versuche zur Auswirkung von *L. pneumophila* auf die GC induzierte GR $\alpha$ -Kerntranslokation durchgeführt. *L. pneumophila* zählt zu den drei häufigsten Pneumonieerregern und ist ebenfalls oft verantwortlich für schwere CAP-Verläufe. Insbesondere hospitalisierte Patienten mit einer Legionellenpneumonie weisen eine erhöhte Sterblichkeit auf<sup>199,239</sup>. Aufgrund der klinischen Relevanz und ihrer komplementären Eigenschaften zu *S. pneumoniae* (gramnegativ, intrazellulär, keine Produktion löslicher Toxine) erschien es interessant, den Effekt von Legionellen auf die GR $\alpha$ -Kerntranslokation zu prüfen. Jedoch hatte die Infektion mit *L. pneumophila* keinen Effekt auf die GR $\alpha$ -Kerntranslokation in AEC II.

Für weiterführende Untersuchungen erscheint es sinnvoll, den Effekt von mikrobiellen Toxinen anderer häufiger Pneumonieerreger, die bereits mit GC-Resistenzen assoziiert worden sind, auf



die GR $\alpha$ -Funktion zu testen. Hierzu gehören z.B. Staphylokokkenexotoxine oder das Bakterientoxin LPS gramnegativer Erreger<sup>186,233</sup>.

#### 4.4.4 Pneumolysin als Ziel in der Entwicklung neuer Therapeutika

Ply wird von allen klinisch relevanten Pneumokokkenserotypen exprimiert und gilt als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*<sup>34,41,42</sup>. Durch seine zytolytischen und proinflammatorischen Effekte trägt Ply maßgeblich zur pulmonalen Gewebszerstörung mit Ausbildung eines Permeabilitätsödems im Rahmen von Pneumonien bei<sup>42</sup>. Die Freisetzung von Ply erfolgt insbesondere im Rahmen der Bakterienlyse, z.B. als Folge einer Antibiotikatherapie, und durch den Pneumokokkenvirulenzfaktor LytA, dessen Aktivierung ebenfalls durch Antibiotika oder das Immunsystem induziert werden kann<sup>42,44</sup>. Die Bakterienabtötung durch Antibiotika an sich kann also über eine vermehrte Ply-Freisetzung zu einer Verkomplizierung eines Pneumonieerkrankungsverlaufs beitragen. Diese Tatsache und die Gefahr, die von wachsenden Antibiotikaresistenzraten ausgeht, macht Ply zu einem attraktiven Ziel in der Entwicklung adjunktiver Substanzen in der Pneumonietherapie. In zahlreichen Studien innerhalb der letzten drei Jahrzehnte wurde die Inaktivierung von Ply adressiert und teilweise wurden interessante Ergebnisse erzielt<sup>44,240-244</sup>. Insbesondere die Studien, die dabei eine Inaktivierung des Porenformenden Effektes von Ply in den Fokus nahmen, erschienen in Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit relevant. Hierbei wurden primär die Cholesterol bindenden Eigenschaften von Ply als Therapieziel adressiert. Z.B. konnte durch den Einsatz von  $\beta$ -Sitosterol, einem dem humanen Cholesterol strukturell vergleichbaren Phytosterol, eine effektive Reduktion der Ply-Toxizität in humanen AEC II der Zelllinie A549 sowie im Mausmodell erzielt werden<sup>240</sup>. In einer *in vitro* Studie an pulmonalen Epithelzellen konnte ein protektiver Effekt des Statins Simvastatin gegenüber zytolytischen Effekten von Ply nachgewiesen werden<sup>243</sup>. Hierbei schienen die protektiven Effekte von Statinen durch eine Reduktion der Porenformung nach Membranbindung, Verbesserung von Membranreparaturmechanismen und intrazelluläre Toxinsequestrierung vermittelt zu werden<sup>243</sup>. Weiterhin erwies sich das murine Apo-Lipoprotein ApoB100 in einer Studie durch die Bindung von Ply als potenter Ply-Inhibitor<sup>244</sup>. Ergebnisse aus Studien wie dieser zeigen, dass die Neutralisierung von Ply eine vielversprechende Option in der perspektivischen Entwicklung adjunktiver Substanzen in der Pneumonietherapie darstellt. In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte eine Verbesserung der GC-Wirksamkeit in der Pneumonietherapie durch die Inaktivierung von Ply erzielt werden. Es bedarf diesbezüglich weiterer Versuche, in denen der Effekt einer Inaktivierung von Ply auf die GR $\alpha$ -Funktion untersucht wird.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Pletz, M. W., Ewig, S., Lange, C., Welte, T. & Höffken, G. [Update pneumonia 2012]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **137**, 2265-80–4 (2012).
2. WHO | The top 10 causes of death. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> (Accessed March 18, 2016)
3. van der Poll, T. & Opal, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**, 1543–56 (2009).
4. Lopez, A. D. & Murray, C. C. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat. Med.* **4**, 1241–3 (1998).
5. Welte, T. & Köhnlein, T. Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **30**, 127–35 (2009).
6. Schnoor, M., Hedicke, J., Dalhoff, K., Raspe, H. & Schäfer, T. Approaches to estimate the population-based incidence of community acquired pneumonia. *J. Infect.* **55**, 233–9 (2007).
7. Closing the GAPP on pneumonia. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 838 (2009).
8. Torres, A., Peetermans, W. E., Viegli, G. & Blasi, F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax* **68**, 1057–65 (2013).
9. Höffken, G. *et al.* [Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society fo. *Pneumologie* **63**, e1-68 (2009).

## Literaturverzeichnis

10. Welte, T. [Community-acquired pneumonia]. *Internist (Berl)*. **50**, 331–9; quiz 340 (2009).
11. Musher, D. M. Infections Caused by Streptococcus Clinical Spectrum , pneumoniae : and Treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**, 801–807 (1992).
12. Lim, W. S. *et al.* Defining community acquired pneumonia severity on presentation to hospital: an international derivation and validation study. *Thorax* **58**, 377–82 (2003).
13. Höffken, G. *et al.* [Guidelines for the epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **135**, 359–65 (2010).
14. Woodhead, M. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur. Respir. J.* **20**, 20S–27s (2002).
15. Lynch, J. P. & Zhanel, G. G. Escalation of antimicrobial resistance among Streptococcus pneumoniae: implications for therapy. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **26**, 575–616 (2005).
16. Hansman, D., Glasgow, H., Sturt, J., Devitt, L. & Douglas, R. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. *N. Engl. J. Med.* **284**, 175–7 (1971).
17. Hansman, D, B. M. M. at interspaces. *Lancet* **2**, 264–265 (1967).
18. Bédos, J. P., Chevret, S., Chastang, C., Geslin, P. & Régnier, B. Epidemiological features of and risk factors for infection by Streptococcus pneumoniae strains with diminished susceptibility to penicillin: findings of a French survey. *Clin. Infect. Dis.* **22**, 63–72 (1996).
19. Reinert, R. R. *et al.* Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2903–13 (2005).

## Literaturverzeichnis

20. Pletz, M. W. [Pneumococcal vaccine: protection of adults and reduction of antibiotic resistance by vaccination of children with a conjugated vaccine]. *Med. Monatsschr. Pharm.* **34**, 201–5 (2011).
21. RKI - Empfehlungen der STIKO. Available at: [http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Impfempfehlungen\\_node.html](http://www.rki.de/DE/Content/Kommissionen/STIKO/Empfehlungen/Impfempfehlungen_node.html). (Accessed: 8th March 2014)
22. Pletz, M. W. [Pneumococcal vaccine]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **138**, 1734–7 (2013).
23. Epidemiologisches Bulletin, 24. August 2015/Nr.34. Available at: [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/34\\_15.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2015/Ausgaben/34_15.pdf?__blob=publicationFile). (Accessed: 20th December 2015)
24. Pilishvili, T. *et al.* Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **201**, 32–41 (2010).
25. Kenzel, S., Hufnagel, M., Berner, R. & Henneke, P. [Pneumococcal vaccination and serotype replacement: Do we need new vaccination concepts?]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **135**, 1198–200 (2010).
26. Ewig, S. *et al.* New perspectives on community-acquired pneumonia in 388 406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax* **64**, 1062–9 (2009).
27. W. F. Gaisford, G. M. E. 2-(p-Aminobenzenesulphonamido). *Lancet* 14–19 (1938).
28. Musher, D. M. & Thorner, A. R. Community-Acquired Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1619–1628 (2014).
29. Siemieniuk, R. A. C. *et al.* Corticosteroid Therapy for Patients Hospitalized With Community-Acquired Pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **163**, 519–28 (2015).

## Literaturverzeichnis

30. Torres, A. *et al.* Effect of Corticosteroids on Treatment Failure Among Hospitalized Patients With Severe Community-Acquired Pneumonia and High Inflammatory Response. *JAMA* **313**, 677 (2015).
31. Bogaert, D., Groot, R. De & Hermans, P. W. M. Streptococcus pneumoniae colonisation  
Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease. **4**, 144–154 (2004).
32. Bogaert, D. *et al.* Epidemiology of nasopharyngeal carriage of Neisseria meningitidis in healthy Dutch children. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 899–902 (2005).
33. Weinberger, D. M. *et al.* Epidemiologic evidence for serotype-specific acquired immunity to pneumococcal carriage. *J. Infect. Dis.* **197**, 1511–8 (2008).
34. Kadioglu, A., Weiser, J. N., Paton, J. C. & Andrew, P. W. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 288–301 (2008).
35. Coonrod, J. D. Pneumococcal pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **4**, 4–11 (1989).
36. Watson, D. A., Musher, D. M., Jacobson, J. W. & Verhoef, J. HISTORICAL ARTICLE A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research : A Panoply of Scientific Discovery. *Clin. Infect. Dis.* **17**, 913–924 (1993).
37. Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S. & Rohde, M. Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule during Adherence and Invasion of Epithelial Cells. **73**, 4653–4667 (2005).
38. Lynch, J. P. & Zhanel, G. G. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **30**, 189–209 (2009).
39. Weiser, J. N. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J. Mol. Med. (Berl)*. **88**,

## Literaturverzeichnis

- 97–102 (2010).
40. Jedrzejewski, M. J. Pneumococcal Virulence Factors : Structure and Function. **65**, 187–207 (2001).
  41. Mitchell, a M. & Mitchell, T. J. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 411–8 (2010).
  42. Marriott, H. M., Mitchell, T. J. & Dockrell, D. H. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.* **8**, 497–509 (2008).
  43. Cockeran, R., Anderson, R. & Feldman, C. The role of pneumolysin in the pathogenesis of Streptococcus pneumoniae infection. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**, 235–9 (2002).
  44. Lucas, R. *et al.* Mini-review: novel therapeutic strategies to blunt actions of pneumolysin in the lungs. *Toxins (Basel)*. **5**, 1244–60 (2013).
  45. Witznath, M. *et al.* Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit. Care Med.* **34**, 1947–54 (2006).
  46. Balachandran, P., Hollingshead, S. K., Paton, J. C. & Briles, D. E. The Autolytic Enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin. **183**, 3108–3116 (2001).
  47. Rubins, J. B. & Janoff, E. N. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 21–7 (1998).
  48. Cassidy, S. K. B. & O’Riordan, M. X. D. More than a pore: the cellular response to cholesterol-dependent cytolysins. *Toxins (Basel)*. **5**, 618–36 (2013).
  49. Zysk, G. *et al.* Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun.* **69**, 845–52 (2001).

## Literaturverzeichnis

50. Alcantara, R. B., Preheim, L. C. & Gentry-Nielsen, M. J. Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **69**, 3569–75 (2001).
51. Giebink, G. S., Dee, T. H., Kim, Y. & Quie, P. G. Alterations in serum opsonic activity and complement levels in pneumococcal disease. *Infect. Immun.* **29**, 1062–6 (1980).
52. Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Saunders, F. K., Smith, a N. & Boulnois, G. J. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol. Microbiol.* **5**, 1883–8 (1991).
53. Jefferies, J. M. C. *et al.* Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J. Infect. Dis.* **196**, 936–44 (2007).
54. Kirkham, L.-A. S. *et al.* Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 151–9 (2006).
55. Lock, R. A., Zhang, Q. Y., Berry, A. M. & Paton, J. C. Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Microb. Pathog.* **21**, 71–83 (1996).
56. Fatykhova, D. *et al.* Serotype 1 and 8 Pneumococci Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue. *PLoS One* **10**, e0137108 (2015).
57. Mitchell, T. J. & Dalziel, C. E. The biology of pneumolysin. *Subcell. Biochem.* **80**, 145–60 (2014).
58. Iliiev, A. I., Djannatian, J. R., Nau, R., Mitchell, T. J. & Wouters, F. S. Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 2897–902 (2007).

59. Rogers, P. D. *et al.* Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71**, 2087–94 (2003).
60. Malley, R. *et al.* Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 1966–71 (2003).
61. Koppe, U., Suttorp, N. & Opitz, B. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell. Microbiol.* (2011). doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x
62. McNeela, E. A. *et al.* Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog.* **6**, e1001191 (2010).
63. Dessing, M. C., Hirst, R. A., de Vos, A. F. & van der Poll, T. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One* **4**, e7993 (2009).
64. Witzenzath, M. *et al.* The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* **187**, 434–40 (2011).
65. Ratner, A. J. *et al.* Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J. Biol. Chem.* **281**, 12994–8 (2006).
66. Braun, J. S. *et al.* Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* **109**, 19–27 (2002).
67. Yesilkaya, H., Andisi, V. F., Andrew, P. W. & Bijlsma, J. J. E. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends Microbiol.* **21**, 187–95 (2013).
68. Mishra, S. & Imlay, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen



## Literaturverzeichnis

- peroxide? *Arch. Biochem. Biophys.* **525**, 145–60 (2012).
69. Chabot, F., Mitchell, J. A., Gutteridge, J. M. & Evans, T. W. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur. Respir. J.* **11**, 745–57 (1998).
  70. White, C. W., Ghezzi, P., McMahon, S., Dinarello, C. A. & Repine, J. E. Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J. Appl. Physiol.* **66**, 1003–7 (1989).
  71. Kotsias, F., Hoffmann, E., Amigorena, S. & Savina, A. Reactive oxygen species production in the phagosome: impact on antigen presentation in dendritic cells. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 714–29 (2013).
  72. Duane, P. G., Rubins, J. B., Weisel, H. R. & Janoff, E. N. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect. Immun.* **61**, 4392–7 (1993).
  73. Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W. & Weiser, J. N. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* **68**, 3990–7 (2000).
  74. McLeod, J. W. & Gordon, J. Production of Hydrogen Peroxide by Bacteria. *Biochem. J.* **16**, 499–506 (1922).
  75. Zuber, P. Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 575–97 (2009).
  76. Spellerberg, B. *et al.* Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **19**, 803–13 (1996).
  77. Pericone, C. D., Park, S., Imlay, J. A. & Weiser, J. N. Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and

## Literaturverzeichnis

- avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**, 6815–25 (2003).
78. Bals, R. & Hiemstra, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur. Respir. J.* **23**, 327–333 (2004).
79. Hippenstiel, S., Opitz, B., Schmeck, B. & Suttorp, N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir. Res.* **7**, 97 (2006).
80. Diamond, G., Legarda, D. & Ryan, L. K. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol. Rev.* **173**, 27–38 (2000).
81. Mizgerd, J. P. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* **358**, 716–27 (2008).
82. Calbo, E. & Garau, J. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**, 107–13 (2010).
83. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783–801 (2006).
84. Paterson, G. K. & Orihuela, C. J. Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology* **15**, 1057–63 (2010).
85. Paterson, G. K. & Mitchell, T. J. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology* **152**, 285–93 (2006).
86. Janeway, C. a & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197–216 (2002).
87. Albiger, B. *et al.* Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell. Microbiol.* **9**, 633–44 (2007).

## Literaturverzeichnis

88. Yoshimura, A. *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.* **163**, 1–5 (1999).
89. van Rossum, A. M. C., Lysenko, E. S. & Weiser, J. N. Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect. Immun.* **73**, 7718–26 (2005).
90. Albiger, B. *et al.* Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell. Microbiol.* **7**, 1603–15 (2005).
91. Tergaonkar, V., Correa, R. G., Ikawa, M. & Verma, I. M. Distinct roles of I $\kappa$ B proteins in regulating constitutive NF- $\kappa$ B activity. *Nat. Cell Biol.* **7**, 921–3 (2005).
92. Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**, 115–22 (1999).
93. Yamamoto, M., Takeda, K. & Akira, S. TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol. Immunol.* **40**, 861–8 (2004).
94. Horng, T., Barton, G. M. & Medzhitov, R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* **2**, 835–41 (2001).
95. Arbabi, S. & Maier, R. V. Mitogen-activated protein kinases. *Crit. Care Med.* **30**, S74–S79 (2002).
96. Krishna, M. & Narang, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3525–44 (2008).
97. Johnson, G. L. & Vaillancourt, R. R. Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 230–8 (1994).

## Literaturverzeichnis

98. Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**, 253–62 (2005).
99. N'Guessan, P. D. *et al.* Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, L1131-8 (2006).
100. Schmeck, B. *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.* **7**, 98 (2006).
101. Xu, F. *et al.* Modulation of the inflammatory response to Streptococcus pneumoniae in a model of acute lung tissue infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **39**, 522–9 (2008).
102. Schmeck, B. *et al.* Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promotor. *J. Biol. Chem.* **279**, 53241–7 (2004).
103. Strieter, R. M., Belperio, J. A. & Keane, M. P. Cytokines in innate host defense in the lung. *J. Clin. Invest.* **109**, 699–705 (2002).
104. Strieter, R. M., Belperio, J. a & Keane, M. P. Host innate defenses in the lung: the role of cytokines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **16**, 193–8 (2003).
105. Jones, M. R., Simms, B. T., Lupa, M. M., Kogan, M. S. & Mizgerd, J. P. Lung NF-kappaB activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J. Immunol.* **175**, 7530–5 (2005).
106. O'Brien, D. P. *et al.* Tumor necrosis factor alpha receptor I is important for survival from Streptococcus pneumoniae infections. *Infect. Immun.* **67**, 595–601 (1999).
107. Takashima, K. *et al.* Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal

- pneumonia in mice. *Infect. Immun.* **65**, 257–60 (1997).
108. Wellmer, A. *et al.* Effect of deficiency of tumor necrosis factor alpha or both of its receptors on *Streptococcus pneumoniae* central nervous system infection and peritonitis. *Infect. Immun.* **69**, 6881–6 (2001).
109. Kirby, A. C., Raynes, J. G. & Kaye, P. M. The role played by tumor necrosis factor during localized and systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **191**, 1538–47 (2005).
110. Yende, S. *et al.* Preinfection systemic inflammatory markers and risk of hospitalization due to pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 1440–6 (2005).
111. Bauer, T. T., Ewig, S., Rodloff, A. C. & Müller, E. E. Acute respiratory distress syndrome and pneumonia: a comprehensive review of clinical data. *Clin. Infect. Dis.* **43**, 748–56 (2006).
112. Matthay, M. A., Ware, L. B. & Zimmerman, G. A. The acute respiratory distress syndrome. *J. Clin. Invest.* **122**, 2731–40 (2012).
113. Imai, Y. *et al.* Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell* **133**, 235–49 (2008).
114. Cheng, D. *et al.* Airway epithelium controls lung inflammation and injury through the NF-kappa B pathway. *J. Immunol.* **178**, 6504–13 (2007).
115. Meduri, G. U., Muthiah, M. P., Carratu, P., Eltorkey, M. & Chrousos, G. P. Nuclear factor-kappaB- and glucocorticoid receptor alpha- mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glu. *Neuroimmunomodulation* **12**, 321–38 (2005).

116. Confalonieri, M. *et al.* Hydrocortisone infusion for severe community-acquired pneumonia: a preliminary randomized study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 242–8 (2005).
117. Stahn, C. & Buttgereit, F. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 525–33 (2008).
118. Moore, T. A. & Standiford, T. J. The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **110**, 297–305
119. Cazzola, M., Matera, M. G. & Pezzuto, G. Inflammation--a new therapeutic target in pneumonia. *Respiration.* **72**, 117–26
120. Serhan, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J.* **21**, 325–32 (2007).
121. Liu, Y. *et al.* Glucocorticoids promote nonphlogistic phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* **162**, 3639–46 (1999).
122. Baschant, U. & Tuckermann, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **120**, 69–75 (2010).
123. Smoak, K. A. & Cidlowski, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 697–706
124. Ramsey, T. D. & Gorman, S. K. Corticosteroids in the treatment of severe community-acquired pneumonia. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **16**, 405 (2014).
125. Meduri, U., Bell, A. and Confalonieri, M. Glucocorticoid Treatment in Community-acquired Pneumonia without Severe Sepsis No Evidence of Efficacy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 880–82 (2010).

## Literaturverzeichnis

126. Confalonieri, M. *et al.* Is prolonged low-dose glucocorticoid treatment beneficial in community-acquired pneumonia? *Curr. Infect. Dis. Rep.* **15**, 158–66 (2013).
127. Hillier, S. G. Diamonds are forever: the cortisone legacy. *J. Endocrinol.* **195**, 1–6 (2007).
128. Kendall, E. C. Hormones of the adrenal cortex. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **29**, 91–100 (1953).
129. Duma, D., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **102**, 11–21 (2006).
130. Oakley, R. H. & Cidlowski, J. A. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1033–44 (2013).
131. Heitzer, M. D., Wolf, I. M., Sanchez, E. R., Witchel, S. F. & DeFranco, D. B. Glucocorticoid receptor physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **8**, 321–30 (2007).
132. Seckl, J. R. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 597–602 (2004).
133. Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D. W. & Buttgereit, F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 71–8 (2007).
134. Chrousos, G. P. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1351–1362 (1995).
135. Kino, T., Su, Y. A. & Chrousos, G. P. Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 3435–48 (2009).

136. de Castro, M. *et al.* The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Mol. Med.* **2**, 597–607 (1996).
137. Bender, I. K., Cao, Y. & Lu, N. Z. Determinants of the heightened activity of glucocorticoid receptor translational isoforms. *Mol. Endocrinol.* **27**, 1577–87 (2013).
138. Grad, I. & Picard, D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 2–12 (2007).
139. Pratt, W. B., Morishima, Y., Murphy, M. & Harrell, M. Chaperoning of glucocorticoid receptors. *Handb. Exp. Pharmacol.* 111–38 (2006).
140. Smith, D. F. & Toft, D. O. Steroid receptors and their associated proteins. *Mol. Endocrinol.* **7**, 4–11 (1993).
141. Picard, D. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* **17**, 229–35 (2006).
142. Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Denis, M. & Gustafsson, J. A. The transformed glucocorticoid receptor has a lower steroid-binding affinity than the nontransformed receptor. *Biochemistry* **29**, 1880–6 (1990).
143. Vandevyver, S., Dejager, L. & Libert, C. On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* **13**, 364–74 (2012).
144. Pratt, W. B., Silverstein, A. M. & Galigniana, M. D. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell. Signal.* **11**, 839–51 (1999).
145. Davies, T. H., Ning, Y.-M. & Sánchez, E. R. A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol.*



- Chem.* **277**, 4597–600 (2002).
146. Wagstaff, K. M. & Jans, D. A. Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* **10**, 1188–98 (2009).
147. De Bosscher, K. & Haegeman, G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **23**, 281–91 (2009).
148. Abraham, S. M. & Clark, A. R. Dual-specificity phosphatase 1: a critical regulator of innate immune responses. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1018–23 (2006).
149. Schoneveld, O. J. L. M., Gaemers, I. C. & Lamers, W. H. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1680**, 114–28 (2004).
150. Nicolas C. Nicolaides, Zoi Galata, Tomoshige Kino, George P. Chrousos, and E. & Charmandari. The Human Glucocorticoid Receptor: Molecular Basis of Biologic Function. *Steroids* **75**, 1–28 (2010).
151. Nordeen, S. K., Suh, B. J., Kühnel, B. & Hutchison, C. A. Structural determinants of a glucocorticoid receptor recognition element. *Mol. Endocrinol.* **4**, 1866–73 (1990).
152. McKenna, N. J. & O'Malley, B. W. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell* **108**, 465–74 (2002).
153. Barnes, Peter J. AND Michael, K. Nuclear facotr-kB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066–1071 (1997).
154. Bantel, H., Domschke, W. & Schulze-Osthoff, K. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance. *Gastroenterology* **119**, 1178–9 (2000).
155. Ismaili, N. & Garabedian, M. J. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1024**, 86–101 (2004).

156. Chen, W. *et al.* Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1754–66 (2008).
157. Wang, Z., Chen, W., Kono, E., Dang, T. & Garabedian, M. J. Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol. Endocrinol.* **21**, 625–34 (2007).
158. Irusen, E. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 649–57 (2002).
159. Wallace, A. D. & Cidlowski, J. A. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **276**, 42714–21 (2001).
160. Webster, J. C. *et al.* Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 9287–93 (1997).
161. Hollenberg, S. M. *et al.* Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* **318**, 635–41
162. Charmandari, E. *et al.* The human glucocorticoid receptor (hGR) beta isoform suppresses the transcriptional activity of hGRalpha by interfering with formation of active coactivator complexes. *Mol. Endocrinol.* **19**, 52–64 (2005).
163. Oakley, R. H. *et al.* The Dominant Negative Activity of the Human Glucocorticoid Receptor<sub>NL</sub> Isoform. *J. Biol. Chem.* **274**, 27857–27866 (1999).
164. Piotrowski, P. *et al.* Glucocorticoid receptor beta splice variant expression in patients with high and low activity of systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, 339–42 (2007).

## Literaturverzeichnis

165. Goleva, E. *et al.* Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 607–16 (2006).
166. Derijk, R. H. *et al.* A human glucocorticoid receptor gene variant that increases the stability of the glucocorticoid receptor beta-isoform mRNA is associated with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **28**, 2383–8 (2001).
167. Webster, J. C., Oakley, R. H., Jewell, C. M. & Cidlowski, J. A. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6865–70 (2001).
168. Hauk, P. J., Hamid, Q. A., Chrousos, G. P. & Leung, D. Y. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**, 782–7 (2000).
169. Dellinger, R. P. *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* **41**, 580–637 (2013).
170. Brouwer, M. C., McIntyre, P., Prasad, K. & van de Beek, D. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane database Syst. Rev.* **6**, CD004405 (2013).
171. Ewald, H. *et al.* Adjunctive corticosteroids for *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with HIV infection. *Cochrane database Syst. Rev.* **4**, CD006150 (2015).
172. Blum, C. A. *et al.* Corticosteroid treatment for community-acquired pneumonia--the STEP trial: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **15**, 257 (2014).
173. Wagner, H. N. *et al.* The effect of hydrocortisone upon the course of pneumococcal pneumonia treated with penicillin. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **98**, 197–215 (1956).
174. Salluh, J. I. F. *et al.* The role of corticosteroids in severe community-acquired pneumonia:

- a systematic review. *Crit. Care* **12**, R76 (2008).
175. Chen, Y., Li, K., Pu, H. & Wu, T. Corticosteroids for pneumonia. *Cochrane Libr.* 1–50 (2011).
176. Snijders, D., Daniels, J. M. A., de Graaff, C. S., van der Werf, T. S. & Boersma, W. G. Efficacy of corticosteroids in community-acquired pneumonia: a randomized double-blinded clinical trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 975–82 (2010).
177. Garcia-Vidal, C. *et al.* Effects of systemic steroids in patients with severe community-acquired pneumonia. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **30**, 951–6 (2007).
178. Siempos, I. I., Vardakas, K. Z., Kopterides, P. & Falagas, M. E. Adjunctive therapies for community-acquired pneumonia: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 661–8 (2008).
179. Shafiq, M., Mansoor, M. S., Khan, A. A., Sohail, M. R. & Murad, M. H. Adjuvant steroid therapy in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *J. Hosp. Med.* **8**, 68–75 (2013).
180. Meduri, G. U., Tolley, E. A., Chrousos, G. P. & Stentz, F. Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucoc. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 983–91 (2002).
181. Remmelts, H. H. F. *et al.* Dexamethasone downregulates the systemic cytokine response in patients with community-acquired pneumonia. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1532–8 (2012).
182. Meijvis, S. C. A. *et al.* Dexamethasone and length of hospital stay in patients with

- community-acquired pneumonia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **377**, 2023–30 (2011).
183. Hamid, Q. A. *et al.* Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **159**, 1600–4 (1999).
184. Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* **373**, 1905–17 (2009).
185. Webster Marketon, J. I. & Sternberg, E. M. The Glucocorticoid Receptor: A Revisited Target for Toxins. *Toxins (Basel)*. **2**, 1357–1380 (2010).
186. Fernández-Bertolín, L. *et al.* Effect of lipopolysaccharide on glucocorticoid receptor function in control nasal mucosa fibroblasts and in fibroblasts from patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps and asthma. *PLoS One* **10**, e0125443 (2015).
187. Webster, J. I. & Sternberg, E. M. Anthrax lethal toxin represses glucocorticoid receptor (GR) transactivation by inhibiting GR-DNA binding in vivo. *Mol. Cell. Endocrinol.* **241**, 21–31 (2005).
188. Tait, A. S. *et al.* The large clostridial toxins from *Clostridium sordellii* and *C. difficile* repress glucocorticoid receptor activity. *Infect. Immun.* **75**, 3935–40 (2007).
189. Giard, D. J. *et al.* In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1417–23 (1973).
190. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. & Todaro, G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* **17**, 62–70 (1976).
191. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59–74 (1977).

## Literaturverzeichnis

192. Belanger, A. E., Clague, M. J., Glass, J. I. & Leblanc, D. J. Pyruvate oxidase is a determinant of Avery's rough morphology. *J. Bacteriol.* **186**, 8164–71 (2004).
193. Ryu, M. *Technische Universität Berlin*. (2007).
194. Adcock, I. M. & Barnes, P. J. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest* **134**, 394–401 (2008).
195. Miller, A. L. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1569–83 (2005).
196. Hvalbye, B. K., Aaberge, I. S., Løvik, M. & Haneberg, B. Intranasal immunization with heat-inactivated *Streptococcus pneumoniae* protects mice against systemic pneumococcal infection. *Infect. Immun.* **67**, 4320–5 (1999).
197. Feldman, C. & Anderson, R. New insights into pneumococcal disease. *Respirology* **14**, 167–79 (2009).
198. Hakim, A., Barnes, P. J., Adcock, I. M. & Usmani, O. S. Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity. *FASEB J.* **27**, 4510–9 (2013).
199. Pletz, M. W. *et al.* [Epidemiology and Aetiology of Community-acquired Pneumonia (CAP)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **136**, 775–80 (2011).
200. Kothe, H. *et al.* Outcome of community-acquired pneumonia: influence of age, residence status and antimicrobial treatment. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **32**, 139–46 (2008).
201. Arnold, F. W., Wiemken, T. L., Peyrani, P., Ramirez, J. A. & Brock, G. N. Mortality

- differences among hospitalized patients with community-acquired pneumonia in three world regions: results from the Community-Acquired Pneumonia Organization (CAPO) International Cohort Study. *Respir. Med.* **107**, 1101–11 (2013).
202. Jain, S. *et al.* Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* **373**, 415–27 (2015).
203. Feikin, D. R. *et al.* Mortality from invasive pneumococcal pneumonia in the era of antibiotic resistance, 1995-1997. *Am. J. Public Health* **90**, 223–9 (2000).
204. Rosón, B. *et al.* Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch. Intern. Med.* **164**, 502–8 (2004).
205. Musher, D. M., Montoya, R. & Wanahita, A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 165–9 (2004).
206. Corrales-Medina, V. F. & Musher, D. M. Immunomodulatory agents in the treatment of community-acquired pneumonia: a systematic review. *J. Infect.* **63**, 187–99 (2011).
207. Hippenstiel, S. *et al.* [New aspects of the pathophysiology of pneumonia]. *Internist (Berl)*. **48**, 459–60, 462–4, 466–7 (2007).
208. Marik, P. E. Critical illness-related corticosteroid insufficiency. *Chest* **135**, 181–93 (2009).
209. Kolling, U. K. *et al.* Leucocyte response and anti-inflammatory cytokines in community acquired pneumonia. *Thorax* **56**, 121–5 (2001).
210. Ghoneim, H. E. & McCullers, J. A. Adjunctive corticosteroid therapy improves lung immunopathology and survival during severe secondary pneumococcal pneumonia in mice. *J. Infect. Dis.* **209**, 1459–68 (2014).

211. Sibila, O. *et al.* Effects of glucocorticoids in ventilated piglets with severe pneumonia. *Eur. Respir. J.* **32**, 1037–46 (2008).
212. Salluh, J. I. F. *et al.* Adrenal response in severe community-acquired pneumonia: impact on outcomes and disease severity. *Chest* **134**, 947–54 (2008).
213. Wunderink, R. G. Corticosteroids for severe community-acquired pneumonia: not for everyone. *JAMA* **313**, 673–4 (2015).
214. Chikanza, I. C. & Kozaci, D. L. Corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: molecular and cellular perspectives. *Rheumatology (Oxford)*. **43**, 1337–45 (2004).
215. Adcock, I. M., Ford, P. A., Bhavsar, P., Ahmad, T. & Chung, K. F. Steroid resistance in asthma: mechanisms and treatment options. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **8**, 171–8 (2008).
216. Farrell, R. J. & Kelleher, D. Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease. *J. Endocrinol.* **178**, 339–46 (2003).
217. Beck, I. M. E. *et al.* Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr. Rev.* **30**, 830–82 (2009).
218. Schaaf, M. J. M. & Cidlowski, J. A. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **83**, 37–48 (2002).
219. Pace, T. W. W., Hu, F. & Miller, A. H. Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain. Behav. Immun.* **21**, 9–19 (2007).
220. Itoh, M. *et al.* Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation. *Mol. Endocrinol.* **16**, 2382–92 (2002).
221. Szatmáry, Z., Garabedian, M. J. & Vilcek, J. Inhibition of glucocorticoid receptor-



- mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase. *J. Biol. Chem.* **279**, 43708–15 (2004).
222. Rogatsky, I., Logan, S. K. & Garabedian, M. J. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 2050–5 (1998).
223. Wang, X., Wu, H. & Miller, A. H. Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function. *Mol. Psychiatry* **9**, 65–75 (2004).
224. Kadioglu, A. & Andrew, P. W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* **25**, 143–9 (2004).
225. Mitchell, T. J. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res. Microbiol.* **151**, 413–9
226. Goleva, E. *et al.* The effects of airway microbiome on corticosteroid responsiveness in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 1193–201 (2013).
227. Papi, A. *et al.* Rhinovirus infection causes steroid resistance in airway epithelium through nuclear factor  $\kappa$ B and c-Jun N-terminal kinase activation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1075–1085.e6 (2013).
228. Stringaris, A. K. *et al.* Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol. Dis.* **11**, 355–68 (2002).
229. Kim, Y. S. & Täuber, M. G. Neurotoxicity of glia activated by gram-positive bacterial products depends on nitric oxide production. *Infect. Immun.* **64**, 3148–53 (1996).
230. Hirst, R. A. *et al.* Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from

- Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect. Immun.* **68**, 1557–62 (2000).
231. Freedman, N. D. & Yamamoto, K. R. Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol. Biol. Cell* **15**, 2276–86 (2004).
232. Tao, T., Lan, J., Lukacs, G. L., Haché, R. J. G. & Kaplan, F. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **35**, 668–80 (2006).
233. Li, L., Goleva, E., Hall, C. F., Ou, L.-S. & Leung, D. Y. M. Superantigen-induced corticosteroid resistance of human T cells occurs through activation of the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK-ERK) pathway. *J. Allergy Clin. Immunol.* **114**, 1059–69 (2004).
234. Braun, J. S. *et al.* Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect. Immun.* **75**, 4245–54 (2007).
235. Bermpohl, D. *et al.* Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J. Clin. Invest.* **115**, 1607–15 (2005).
236. Braun, J. S. *et al.* Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J. Infect. Dis.* **184**, 1300–9 (2001).
237. Mühlbauer, D. *et al.* Influenza virus-induced caspase-dependent enlargement of nuclear pores promotes nuclear export of viral ribonucleoprotein complexes. *J. Virol.* **89**, 6009–21 (2015).
238. Szymanski, K. V *et al.* *Streptococcus pneumoniae* induced regulation of cyclooxygenase-2 in human lung tissue. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* **40**, 1458–67 (2012).

239. Diederer, B. M. W. Legionella spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* **56**, 1–12 (2008).
240. Li, H. *et al.*  $\beta$ -sitosterol interacts with pneumolysin to prevent Streptococcus pneumoniae infection. *Sci. Rep.* **5**, 17668 (2015).
241. Lu, J. *et al.* Detoxified pneumolysin derivative Plym2 directly protects against pneumococcal infection via induction of inflammatory cytokines. *Immunol. Invest.* **43**, 717–26 (2014).
242. Anderson, R. *et al.* Comparison of the effects of macrolides, amoxicillin, ceftriaxone, doxycycline, tobramycin and fluoroquinolones, on the production of pneumolysin by Streptococcus pneumoniae in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 1155–8 (2007).
243. Statt, S. *et al.* Statin-Conferred Enhanced Cellular Resistance against Bacterial Pore-Forming Toxins in Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **53**, 689–702 (2015).
244. Wade, K. R., Hotze, E. M., Briles, D. E. & Tweten, R. K. Mouse, but not human, ApoB-100 lipoprotein cholesterol is a potent innate inhibitor of Streptococcus pneumoniae pneumolysin. *PLoS Pathog.* **10**, e1004353 (2014).
245. Welte, T., Marre, R. & Suttrop, N. [What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?]. *Med. Klin. (Munich)*. **101**, 313–20 (2006).
246. Austrian, R. & Gold, J. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **60**, 759–76 (1964).
247. Fine, M. J. *et al.* Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* **275**, 134–41 (1996).
248. Metersky, M. L., Waterer, G., Nsa, W. & Bratzler, D. W. Predictors of in-hospital vs postdischarge mortality in pneumonia. *Chest* **142**, 476–81 (2012).

## Literaturverzeichnis

249. AQUA-Institut GmbH, gemeinsamer B. Qualitätsreport 2012. Available at: <http://www.sqg.de/sqg/upload/CONTENT/Qualitaetsberichte/2012/AQUA-Qualitaetsreport-2012.pdf>. (Accessed: October 7, 2016)

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, Aline le Claire, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Molekulare Mechanismen der *Streptococcus pneumoniae* induzierten Glucocorticoid Rezeptor  $\alpha$  Translokationshemmung in pulmonalen Epithelzellen“, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

**Lebenslauf**

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

**Danksagung**

Die Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.