

Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie  
Direktor: Professor Dr. med. Norbert Suttrop

## HABILITATIONSSCHRIFT

### **Molekulare Mechanismen der Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit pulmonalen Wirtszellen**

zur Erlangung der Venia legendi  
für das Fach Experimentelle Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der  
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bernd Thomas Schmeck  
geboren am 19.08.1974 in Siegen

Eingereicht am: 14. Dezember 2006

Dekan: Prof. Dr. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. Stephan Ludwig  
2. Prof. Dr. Tobias Welte

## Zusammenfassung

Die Pneumokokken-Pneumonie ist weltweit eine häufige Todesursache. Zunehmende Antibiotikaresistenzen stellen uns klinisch vor neue Herausforderungen und erfordern ein tieferes Verständnis der Interaktion und der Pathomechanismen zwischen *S. pneumoniae* und den Wirtszellen.

Lungenepithelzellen bilden eine erste Barriere gegen eine invasive Pneumokokkeninfektion. In den vorliegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sie bei Kontakt mit *S. pneumoniae* bestimmte CC- und CXC-, sowie Th1- und Th2-Zytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen und so eine lokale und systemische Immunantwort orchestrieren können. Die Pneumokokken werden dabei extrazellulär gemeinsam durch die transmembranären Mustererkennungsrezeptoren TLR1 und TLR2, im Zytosol durch Nod1 erkannt. Ihr Pathogenitätsfaktor Pneumolysin aktiviert TLR4. So wird eine Signalkaskade mit den Molekülen IRAK2, TRAF6, NIK, TAB2, TAK1 und Rip2 angestoßen und der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B an die DNA rekrutiert. Damit es aber zur Transkription z.B. des IL-8-Gens kommt, muss die p65/RelA-Untereinheit von NF- $\kappa$ B erst noch abhängig von der p38 MAP-Kinase und der Rac1-GTPase an den Serinen 276 und 536 phosphoryliert werden. Ebenfalls bedeutsam ist die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 an den IL-8-Promotor. Auch die Cyclooxygenase 2-Genexpression und der Freisetzung ihres Produkts Prostaglandin E<sub>2</sub> in pneumokokkeninfiziertem Lungenepithel werden durch NF- $\kappa$ B und die p38 MAP-Kinase reguliert.

Andererseits wird die mechanische Barrierefunktion des pulmonalen Epithels und Endothels durch Pneumokokken gestört. So führen die Pathogenitätsfaktoren Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Nekrose der Zellen, während die Bakterien über bisher unbekannte Faktoren auch epitheliale und endotheliale Apoptose induzieren. Die Apoptose wird dabei über den mitochondrialen Weg und die Aktivierung der Caspase 6 exekutiert. Der programmierte Zelltod konnte durch pharmakologische Erhöhung von cAMP und durch Hemmung der p38 und JNK MAP-Kinasen gehemmt werden.

In einem Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie konnte sowohl die Schädigung der epithelialen und endothelialen Barriere als auch die vermehrte Zytokin- und Cyclooxygenase 2-Expression nach p38 MAP-Kinasen- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung nachvollzogen werden.

## Abstract

Pneumococcal pneumonia is one of the most frequent causes of death worldwide. Increasing drug resistance becomes an important issue and makes a deeper understanding of pathogen-host-interaction necessary.

Lung epithelium constitutes a first barrier against invasive pneumococcal infection. In this work it has been shown that lung epithelial cells secrete a distinct panel of CC-, CXC, Th1-, and Th2-cytokines, as well as growth factors upon infection with *S. pneumoniae*. Thereby, they can orchestrate local and systemic immunoreaction.

Extracellular pneumococci are synergistically recognized by TLR1 and TLR2. Inside the cell they activate Nod1. The virulence factor pneumolysin is detected by TLR4. Subsequently, a signalling cascade including IRAK2, TRAF6, NIK, TAB2, TAK1, and Rip2 is activated and transcription factor NF- $\kappa$ B is recruited to the DNA. To induce transcription of e.g. the *il8* gene, the p65/RelA subunit of NF- $\kappa$ B has to be p38 MAP-kinase- and Rac1-dependently phosphorylated on serines 276 and 536. In addition, transcription factor AP-1 has to bind to the *il8* promoter. Similarly, gene expression of cyclooxygenase 2 and liberation of its product prostaglandin E2 depends on NF- $\kappa$ B and p38 MAP-kinase in pneumococci infected lung epithelium.

On the other hand, the mechanical barrier function of pulmonary epithelium and endothelium is disrupted by pneumococci. Virulence factors pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce necrosis, while viable bacteria induce epithelial and endothelial apoptosis by unknown factors. This apoptosis is executed via the mitochondrial pathway and caspase 6. It can be blocked by pharmacological elevation of cAMP and inhibition of p38 and JNK MAP-kinases.

Disruption of epithelial and endothelial barrier function as well as cytokine and cyclooxygenase 2-induction and p38 MAP-kinase- and NF- $\kappa$ B-activation were also found in a murine model of pneumococcal pneumonia.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Die Pneumonie.....	5
1.2	Mikrobiologie von <i>S. pneumoniae</i> .....	6
1.3	Pneumokokken als Infektionserreger .....	7
1.4	Pulmonale Immunität.....	10
1.5	Lungenepithel.....	12
1.6	Signalwege der Immunreaktion.....	13
<b>2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
2.1	Erkennung von <i>S. pneumoniae</i> durch pulmonale Epithelzellen.....	15
	<b>Schmeck, B.,</b> Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A. C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. <i>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.</i> 2006, 290(4): L730-L737.....	15
	Opitz, B., Puschel, A., <b>Schmeck, B.,</b> Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., Hippenstiel, S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae. <i>J Biol Chem.</i> 2004, 279(35): 36426-32.....	24
2.2	Pneumokokken-induzierte Signaltransduktion in pulmonale Epithelzellen..	32
	<b>Schmeck, B.,</b> Zahlten, J., Moog, K., van Laak, V., Huber, S., Hocke, A. C., Opitz, B., Hoffmann, E., Kracht, M., Zerrahn, J., Hammerschmidt, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. <i>Streptococcus pneumoniae</i> -induced p38 MAPK-dependent phosphorylation of RelA at the interleukin-8 promoter. <i>J Biol Chem.</i> 2004, 279(51): 53241-7.....	32
	<b>Schmeck, B.,</b> Moog, K., Zahlten, J., van Laak, V., N'Guessan, P. D., Opitz, B., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced cJun-N-terminal kinase- and AP-1-dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. <i>Respir Res.</i> 2006, 7(1): 98.....	40
	N'Guessan, P. D., Hippenstiel, S., Etouem, M. O., Zahlten, J., Beermann, W., Lindner, D., Opitz, B., Witzenrath, M., Rosseau, S., Suttorp, N., <b>Schmeck, B.</b> <i>Streptococcus pneumoniae</i> induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. <i>Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.</i> 2006, 290(6): L1131-8.....	50
2.3	Schädigung von Epithel- und Endothelzellen durch <i>S. pneumoniae</i> .....	59
	<b>Schmeck, B.,</b> Gross, R., N'Guessan, P. D., Hocke, A. C., Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. <i>Streptococcus pneumoniae</i> -induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. <i>Infect Immun.</i> 2004, 72(9): 4940-7.....	59
	N'Guessan*, P. D., <b>Schmeck*, B.,</b> Ayim, A., Hocke, A. C., Brell, B., Hammerschmidt, S., Rosseau, S., Suttorp, N., Hippenstiel, S. <i>Streptococcus pneumoniae</i> R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. <i>Thromb Haemost.</i> 2005, 94(2): 295-303. *) Geteilte Erstautorenschaft .....	68
	Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A. C., <b>Schmeck, B.,</b> Hippenstiel, S., Berger, K., Mitchell, T. J., de los Toyos, J. R., Rosseau, S., Suttorp, N., Schutte, H. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. <i>Crit Care Med.</i> 2006, 34(7): 1947-54.....	78
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>87</b>
3.1	Pathogen-Wirtszell-Interaktion.....	87
3.2	Signalweiterleitung .....	88
3.3	Apoptose .....	91
3.4	Ausblick .....	92
<b>4</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>95</b>

## ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift