

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

DISSERTATION

***Streptococcus pneumoniae* induziert  
Apoptose in Lungenepithelzellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ralph Torsten Gross

aus Agnetheln, Rumänien

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

2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Th. Schneider

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

**Datum der Promotion: 27.03.2009**

Diese Arbeit ist meinen Eltern Rosemarie und Erhardt für Ihre liebevolle und unermüdliche Unterstützung während meines Studiums, womit sie einen großen Beitrag für das Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben, gewidmet. Des Weiteren widme ich diese Arbeit besonders meiner Frau Monica, die mir tatkräftig zur Seite gestanden hat und meiner Tochter Lara, die mir immer ein motivierender Faktor war.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>- 6 -</b>
1.1	<i>Pneumokokken</i>	- 7 -
1.1.1	Die Gattung <i>Streptococcus</i>	- 8 -
1.1.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 8 -
1.1.3	Virulenzfaktoren des <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 10 -
1.2	<i>Apoptose</i>	- 18 -
1.2.1	Geschichte	- 19 -
1.2.2	Morphologie	- 20 -
1.2.3	Signaltransduktion und Biochemie der Apoptose	- 22 -
1.2.4	Caspaseabhängige Apoptose	- 25 -
1.2.5	Caspaseunabhängige Apoptose	- 27 -
1.2.6	Apoptose und Mitochondrien	- 29 -
1.2.7	Klinische Bedeutung der Apoptose	- 33 -
1.3	<i>Fragestellung</i>	- 36 -
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>- 37 -</b>
2.1	<i>Materialien</i>	- 37 -
2.1.1	Chemikalien	- 37 -
2.1.2	Kulturmedien	- 39 -
2.1.3	Puffer und Lösungen	- 41 -
2.1.4	Zubehör	- 44 -
2.1.5	Antikörper für Western Blot	- 45 -
2.2	<i>Methoden</i>	- 46 -
2.2.1	Kultur von Alveolarepithelzellen (A549)	- 46 -
2.2.2	Kultur von Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)	- 46 -
2.2.3	Kultur von transfizierten Alveolarepithelzellen (A549, mit Überexpression des Bcl-2 Proteins)	- 47 -
2.2.4	Pneumokokken ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )	- 48 -
2.2.5	Pneumolysin	- 49 -
2.2.6	Messung der Laktatdehydrogenase	- 49 -
2.2.7	Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA	- 50 -
2.2.8	Immunhistochemische Apoptosebestimmung	- 51 -
2.2.9	Messung der Caspasenaktivität mittels kolorimetrischem Protease Assay	- 52 -
2.2.10	Western-Blot	- 53 -
2.2.11	Statistische Auswertung	- 56 -
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>- 57 -</b>
3.1	<i>Vorversuche</i>	- 57 -
3.1.1	Zeit- und dosisabhängige morphologische Veränderung der A549 und BEAS-2B Zellen nach Infektion mit Pneumokokken	- 57 -
3.1.2	Wachstum von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	- 59 -
3.1.3	Pneumokokkeninfektionskonzentration	- 59 -
3.1.4	Positivkontrollen (A549 und BEAS-2B Zellen)	- 61 -

3.2	<i>Pneumokokken und Alveolarepithelzellen</i> .....	- 64 -
3.2.1	D39 führt zur Nekrose. R6x induziert Apoptose .....	- 64 -
3.2.2	Pneumolysin und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> spielen keine signifikante Rolle bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Alveolarepithelzellen Typ II .....	- 67 -
3.2.3	Caspasenaktivität spielt eine wichtige Rolle in der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Alveolarepithelzellen.....	- 69 -
3.2.4	An der pneumokokkeninduzierten Apoptose sind auch Calpain und die Serinproteasen beteiligt.....	- 72 -
3.3	<i>Pneumokokken und Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)</i> .....	- 76 -
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>- 78 -</b>
4.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> führt sowohl zur Nekrose als auch zur Apoptose in Lungenepithelzellen .....	- 79 -
4.2	<i>Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen zur Nekrose in Lungenepithelzellen.</i>	- 81 -
4.3	<i>Die Caspasen 8, 9 und 6, nicht aber Caspase 3 werden bei einer Streptococcus pneumoniae Infektion aktiviert</i> .....	- 83 -
4.4	<i>Trypsin-, Chymotrypsinähnliche und Calpainproteasen spielen in der Streptococcus pneumoniae-induzierten Apoptose eine Rolle</i> .....	- 85 -
4.5	<i>Bcl-2 Proteinfamilie im pneumokokkeninduzierten Zelltod</i> .....	- 88 -
4.6	<i>Ausblick</i> .....	- 91 -
4.7	<i>Zusammenfassung</i> .....	- 92 -
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>- 94 -</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>- 111 -</b>
6.1	<i>Publikationen</i> .....	- 111 -
6.2	<i>Danksagung</i> .....	- 112 -
6.3	<i>Curriculum vitae</i> .....	- 113 -
6.4	<i>Erklärung an Eides Statt</i> .....	- 114 -

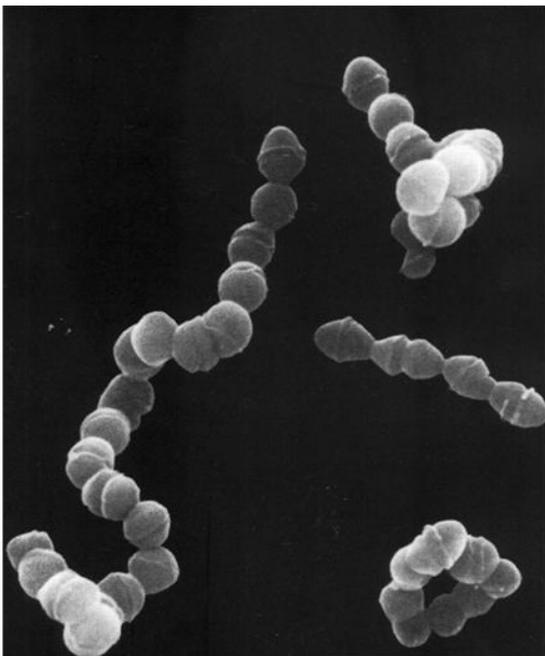
## 1 Einleitung

*Streptococcus pneumoniae* ist einer der häufigsten Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP = Community Aquired Pneumonia) und Meningitis (File TM 2004). Trotz wirksamer Medikamente gegen dieses Bakterium sind beide Erkrankungen immer noch mit einer hohen Morbidität und Mortalität behaftet (Jacobs RJ 2004). In den Vereinigten Staaten von Amerika gehört die CAP mit insgesamt 2 bis 3 Millionen Erkrankungen pro Jahr zu den sechs häufigsten Erkrankungen mit tödlichem Ausgang und ist unter den Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache. 1998 wurden in Deutschland ca. 240.000 Patienten wegen einer Pneumonie in einem deutschen Krankenhaus behandelt. Etwa doppelt so viele wurden ambulant behandelt ([www.capnetz.de](http://www.capnetz.de)).

Die stetig steigende Antibiotikaresistenzrate von *Streptococcus pneumoniae* gibt weiteren Anlass zur Sorge. In den 60er Jahren wurden die ersten penicillin-resistenten Pneumokokkenstämme beschrieben (Soares 1993). Seither wurde überall auf der Welt nicht nur eine zunehmende Penicillinresistenz (Pallares R 1987), sondern auch Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Lactamen (Hakenbeck R 1999), Macroliden (Lonks JR 2002), Tetracyclinen (Chopra I 2001), Sulfonamiden (Jacobs MR 2003, Fluorochinolonen (Whitney CG 2000) sowie multiresistenten Stämmen (Jacobs MR 2003) beobachtet. Aus diesem Grund ist weitere Forschung zur Aufklärung der Pathomechanismen von *Streptococcus pneumoniae* wichtig.

## 1.1 Pneumokokken

Pneumokokken sind lanzettförmige grampositive Bakterien, die als Diplokokken (in der Gramfärbung des Sputums) oder in Ketten (**Abb. 1**, Morphologie während der Vermehrung im flüssigen Wachstumsmedium) vorkommen. Sie wurden 1881 von G. Sternberg (USA) und L. Pasteur (Frankreich) gleichzeitig entdeckt. Da diese Bakterien im 19. Jahrhundert die Hauptursache der lobären Pneumonie waren, bekamen sie den Namen Pneumococcus. Eine weitere wichtige Rolle spielten die Pneumokokken bei der Entdeckung der DNA. 1928 prägte Griffith bei Pneumokokken den Begriff Transformation und 1944 entdeckte Avery et al., dass es sich hierbei um DNA-Transfer handelte. Seit 1974 heißen die Pneumokokken aufgrund ihrer Morphologie im flüssigen Wachstumsmedium offiziell *Streptococcus pneumoniae*. ([Mandell 2000](#))



**Abb. 1:** *Streptococcus pneumoniae*. Ketten bildende, lanzettförmige, grampositive Pneumokokken mit einer Größe von 0,5- 1,25 µm.

<http://genome.microbio.uab.edu/strep/info/strep5.gif>

### 1.1.1 Die Gattung Streptococcus

Theodor Billroth und Paul Ehrlich gaben 1874, nachdem beide in infizierten Wunden kettenbildende Kokken entdeckt hatten, dieser Gattung den Namen Streptococcus. Dieser stammt von den griechischen Wörtern streptos (gewunden) und coccus (Kugeln, Beeren) ab. Bei den Streptokokken handelt es sich um grampositive Kokken, die paarweise oder in Ketten vorkommen und sich sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen vermehren können. Weitere Merkmale sind die fermentative Kohlenhydratverwertung, keine Sporenbildung, fehlende Beweglichkeit, Unfähigkeit Katalase und Oxidase zu bilden, sowie in 6,5 % NaCl nicht wachsen zu können.

1903 erfolgte durch Hugo Schottmüller aufgrund ihres Hämolyseverhaltens auf hammelbluthaltigen Kulturmedien die Einteilung der Streptokokken in  $\alpha$ -  $\beta$ - und  $\gamma$ -hämolisierende Gruppen.

Um die Bakterienkolonie der  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken bildet sich ein grüner Vorhof, der durch die Umwandlung des Hämoglobins in ein grünes Pigment zustande kommt.

$\beta$ -hämolisierende Streptokokken zeichnen sich durch die Hämolyse der sich im Hammelblut befindenden Erythrozyten aus. Dies ist am durchsichtigen Hof, der sich um die Streptokokkenkolonie bildet, zu sehen. Bei der  $\gamma$ -Hämolyse findet gar keine Lyse der Erythrozyten statt.

Diese Einteilung hat klinisch eine große Relevanz, da alle Bakterien aus der Gruppe der  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken mit Ausnahme der Pneumokokken zur physiologischen Schleimhautflora gehören. Diesen stehen die  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken gegenüber, die alle obligat pathogene Keime sind.

### 1.1.2 *Streptococcus pneumoniae*

*S. pneumoniae* ist ein extrazellulärer Keim, der zu den  $\alpha$ -hämolisierenden Streptokokken gehört. Er unterscheidet sich von den anderen  $\alpha$ -hämolisierenden Spezies durch seine Empfindlichkeit gegenüber Optochin und Galle. Diese aktiviert die Muraminidase, ein Autolysin, welches zur Autolyse der

Pneumokokken führt. Die Identifizierung der Pneumokokken als Erreger einer Erkrankung erfolgt anhand der  $\alpha$ -Hämolyse auf Blutagar-Platten, Fehlen von Katalase und Hemmung ihres Wachstums durch Optochin und Galle. Neuerdings kommt der Nachweis von pneumokokkenspezifischer rRNA hinzu. Da den Pneumokokken Katalase fehlt sind sie auf eine externe Quelle wie z.B. Erythrozyten angewiesen. Die in den Erythrozyten enthaltene Katalase spaltet  $H_2O_2$ , welches die Pneumokokken selber produzieren, in Wasser und Sauerstoff. Aus diesem Grunde wachsen sie in Medien, die Erythrozyten enthalten, besonders gut.

Die meisten Pneumokokken weisen eine Zellwand, eine Kapsel und an der Bakterienoberfläche exprimierte Proteine (z.B. Psa A, Psp A, Cbp A) auf, von denen viele an der Pathogenität der Pneumokokken beteiligt sind. Alle klinisch relevanten Stämme besitzen eine Kapsel. Stämme ohne Kapsel sind avirulent. Optisch sehen die bekapselten Kolonien glänzend glatt aus (S-Form aus dem englischen smooth = glatt). Die Unbekapselten haben eine raue Oberfläche (R-Form aus dem englischen rough = rau). Die Hauptbausteine der Zellwand sind Peptidoglykane und Teichonsäure (auch C-Substanz genannt).

Polysaccharide sind die Bausteine der Kapsel und werden im Zytoplasma als Oligosaccharide synthetisiert, polymerisiert und mit Hilfe von Membrantransferasen an die Oberfläche transportiert wo sie mittels kovalenter Bindungen in der Zellwand verankert werden. Durch die unterschiedlichen Antigeneigenschaften der Polysaccharide werden die Pneumokokken von 1-90 in der Reihenfolge ihrer Entdeckung (amerikanische Einteilung) aufgelistet. In der weitaus bekannteren dänischen Einteilung werden die 90 Serotypen nach Antigenähnlichkeit in 21 Serogruppen, die je 2-5 verwandte Serotypen enthalten, eingeteilt (z.B. die Serogruppe 19 beinhaltet die Typen 19F, 19A, 19B und 19C, wobei F die erste Entdeckung ist und A, B und C die Reihenfolge nach ihrer Entdeckung angeben). In diesen Serogruppen befinden sich 65 der insgesamt 90 Serotypen, die restlichen 25 werden einzeln geführt.

### 1.1.3 Virulenzfaktoren des *Streptococcus pneumoniae*

Die eine Lungenentzündung verursachenden Pneumokokken gelangen am häufigsten aus dem Nasopharynx, der oft bei gesunden Menschen von diesen Bakterien besiedelt ist, ohne eine Krankheit in dem betreffenden Menschen auszulösen, in Form einer endogenen Infektion in die unteren Atemwege. Einmal in den Alveolen angekommen vermehren sie sich und können dann von dort in den Blutkreislauf gelangen (*Cundell JR a 1995*). Zum einen wird das Eindringen der Pneumokokken in die unteren Atemwege durch eine Schwächung der anatomischen Barriere und des Immunsystems erleichtert (siehe Kapitel Pneumonie), zum anderen benötigen die Pneumokokken eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren, um sich an die Zellen des Wirtes anheften zu können und diese zu schädigen.

Das Anheften der Pneumokokken erfolgt mittels Oberflächenmolekülen (z.B. Psa A) an Glykokonjugatrezeptoren, die sich an der Oberfläche von Epithelien der Atemwege befinden (*Cundell DR b 1995*). Es scheint so, als ob der Kontakt zwischen Pneumokokken und Epithelien an sich nicht ausreichend ist, damit die Bakterien sich an die Wirtszellen anheften. Erst nach einer Veränderung der Epithelzellen durch Aktivierung mittels Cytokinen, was zu einer vermehrten Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche führt, erfolgt die Adhärenz (*Tuomanen EI 2001*). Berichten von Cundell und Arbeitskollegen zufolge könnte der PAF (Platelet Aktivating Factor)-Rezeptor ein solcher Adhärenz-Rezeptor sein, da PAF das Cholin der Pneumokokkenzellwand binden kann (*Cundell DR c 1995*). Allerdings gibt es auch Berichte (*Tuomanen EI 2001*), dass bei verschiedenen Infektionsarten unterschiedliche Rezeptoren beteiligt sind. Zum Beispiel sind im Nasopharynx IgA-Rezeptoren, an die CbpA (siehe unten) binden kann, für die Adhärenz der Pneumokokken an die Epithelzellen verantwortlich. Nach dem ersten Kontakt erfolgt die weitere Expression von Rezeptoren an der Oberfläche der Epithelien durch Zellwandbestandteile des Erregers, die eine Freisetzung von Zytokinen (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) bewirken. Zum Beispiel führen Neuraminidasen durch Sialinsäureabspaltung zur Expression von PAF-Rezeptoren auf Epithelien, die als weitere Anheftungsmöglichkeit für die Pneumokokken dienen (*Cundell DR c 1995*).

### 1.1.3.1 Kapsel

Alle klinisch relevanten Pneumokokkenstämme haben eine aus Polysacchariden bestehende Kapsel. Im Vergleich dazu sind die gleichen Stämme ohne Polysaccharidkapsel klinisch weitgehend unbedeutend. Aus diesem Grund galt die Polysaccharidkapsel lange Zeit als Hauptvirulenzfaktor der Pneumokokken. Sie verhindert die Phagozytose und Zerstörung der Pneumokokken durch die Abwehrzellen des Wirtes. Drei mögliche Erklärungen stehen hierfür zur Verfügung: 1. Den phagozytierenden Abwehrzellen des Wirtes fehlen Rezeptoren zur Erkennung der Kapselmoleküle, 2. Elektrochemische Ladungen der Kapsel die einen Kontakt zwischen Bakterium und phagozytierenden Zellen verhindern. 3. Die Polysaccharidkapsel wirkt phagozytosehemmend, indem sie die Antigene, welche für die Aktivierung des Komplementsystems (C3b) und der Phagozyten verantwortlich sind, maskiert ([Mandell 2000](#)).

### 1.1.3.2 Pneumokokkenproteine und –enzyme.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass es neben der Kapsel noch andere Virulenzfaktoren geben muss, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der pneumokokkeninduzierten Pneumonie spielen. Dazu gehören auf der Zellwand der Pneumokokken, Hyaluronsäure, Neuraminidase A und B ([Boulnois GJ 1991](#)), Cholin Bindendes Protein A ([Rosenow C 1997](#)), pneumokokken Oberflächenantigen A ([Sampson JS 1994](#)), pneumokokken Oberflächenprotein A ([McDaniel LS 1991](#)) und im Zytoplasma der Pneumokokken Pneumolysin ([Feldmann C 1992](#)).

Vor der Entschlüsselung der Pneumokokken-Genomsequenz 1997 wusste man noch wenig über Pneumokokkenproteine und deren Funktion. Ab diesem Zeitpunkt hat sich das Wissen über neue Virulenzfaktoren, die an der Bakterienwand befestigt sind, um ein Vielfaches vermehrt. Bei den membrangebundenen Virulenzfaktoren handelt es sich um Proteine und Enzyme die von Pneumokokken an ihrer Oberfläche exprimiert werden. Zum einen erschweren sie die Phagozytose der Bakterien, induzieren zusätzliche Rezeptoren an der Wirtszelle, wodurch die Pneumokokken sich

besser an die Zellen anheften können, oder sie treiben die Entzündungsreaktion an, womit sich der Wirt zusätzlich selber schädigt. Die Oberflächenmoleküle sind entweder über das grampositive Anheftungsmotif LPXTGX (z.B. Neuraminidase, Hyaluronidase) (*Camara M 1994*) oder mittels nicht kovalenter Bindungen über Cholin (cholinbindende Proteine, Cbps, z.B. PspA, LytA und CbpA) an der Bakterienwand befestigt (*Mitchell TJ 2000*). Im Folgenden werden einige der wichtigsten Virulenzfaktoren als Beispiel beschrieben.

### ***Pneumokokken Oberflächenprotein A (PspA)***

PspA, ein lactoferrinbindendes Protein (*Hammerschmidt S 1999*), ist ein wichtiges Pneumokokkenoberflächenprotein, welches für die volle Entfaltung der Pneumokokkenvirulenz unbedingt vorhanden sein muss (*McDaniel LS 1984*). Es hat ein Molekulargewicht zwischen 67 und 99 kDa (*Waltman WD 1990*), ist nicht kovalent über Cholin an der Bakterienwand befestigt (*Yother J and J M White 1994*), und kommt in jedem klinisch relevanten Pneumokokkenstamm vor (*Crain MJ 1990*). Seine Wirkung, welche zur Pathogenität der Pneumokokken beiträgt, entfaltet PspA indem es die Komplementaktivierung des Wirtes durch Maskierung der C3b Komponente hemmt (*Cundell DR b 1995*). Die fehlende Opsonierung der Bakterien hat zur Folge, dass deren Zerstörung via Phagozytose erschwert ist. (*Briles DE 1997*).

### ***Cholinbindendes Protein A (CbpA)***

Bei dem 75 kDa großen CbpA handelt es sich um ein weiteres Pneumokokkenprotein, welches wie PspA und LytA nicht kovalent an den Cholinrest der Teichon- und Lipoteichonsäure, die beide Bestandteile der Bakterienwand sind, gebunden ist (*Jedrzejak MJ. 2001*). Die Funktionsweise des CbpA und generell aller cholinbindenden Proteine (CBP) ist noch nicht aufgeklärt. Einige Funktionen des CbpA konnten jedoch anhand von Negativ-Mutanten in Mäusen nachgewiesen werden. So ist bekannt, dass CbpA-negative Pneumokokkenstämme Schwierigkeiten haben, sich an cytokinaktivierte Zellen des Wirtes anzuheften. In vivo konnte gezeigt werden,

dass CbpA-negative Pneumokokken den Nasopharynx von jungen Mäusen kaum besiedeln konnten (*Rosenow C 1997*). Weiter besitzt CbpA die Fähigkeit mit Immunglobulin A zu interagieren, und dadurch die Pneumokokken vor IgA schützt (*Hammerschmidt S 1997*).

### ***Hyaluronidase***

Hyaluronidasen bilden eine Gruppe von Enzymen die bevorzugt Hyaluronsäure, einen wichtigen Baustein der extrazellulären Matrix bei den Wirbeltieren, abbauen. Durch die Degradation der Hyaluronsäure wird das Gewebe aufgelockert und somit die Invasion des Erregers erleichtert. Die Hyaluronidasen scheinen eine große Rolle bei der Wundinfektion, Pneumonie und Meningitis zu spielen.

Die von den Pneumokokken exprimierte Hyaluronidase wird Hyaluronsäure-Lyase (Hyl) genannt und ist ein weiteres Pneumokokkenoberflächenprotein welches, sehr wichtig für die Etablierung und Invasion von *S. pneumoniae* zu Beginn einer Krankheit ist (*Pritchard DG 1994*). Hyaluronidasen sind kovalent über das grampositive Anheftungsmotiv LPXTGX an Peptidoglykane der Bakterienwand gebunden (*Berry AM 1994*).

### ***Autolysin***

Autolysine sind eine Gruppe von Enzymen, zu deren Hauptaufgabe der Abbau des Peptidoglykan-Grundgerüsts der bakteriellen Zellwand gehört. Dies führt zur Lyse des Bakteriums. (*Rogers HJ 1980*). Zusätzlich spielen sie eine physiologische Rolle beim Umbau der Zellwand und der Vermehrung von Mikroorganismen (*Jedrzejak MJ 2001*). Das von den Pneumokokken gebildete Enzym N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase (LytA Amidase) befindet sich in der Zellwand, wo es die Peptidoglykane der Bakterienzellwand verdaut und damit zu deren Lyse führt. Dieses ca. 36 kDa große Molekül gehört ebenfalls zur Gruppe der Pneumokokkenoberflächenproteine, welche nicht kovalent an Cholin in der Bakterienwand verankert sind.

Bei der Lyse der Bakterien werden Bestandteile der abgebauten Zellwand in die

Umgebung abgegeben, was im Tiermodell zu einer starken Entzündungsreaktion geführt hat ([Tuomanen E 1999](#)). LytA ist unter normalen Bedingungen inaktiv. Bei Störungen, die zum Stopp der bakteriellen Biosynthese führen, z.B. Antibiotikabehandlung, Alterung der Bakterien oder Umweltbedingungen, die für Pneumokokken nicht mit dem Leben vereinbar sind, wird LytA aktiviert. Das aktive Enzym stoppt die Zellwandsynthese und führt zur Lyse des betreffenden Bakteriums. Bei der Lyse werden Zellwandbestandteile und viele sich im Zytoplasma befindende bakterielle Proteine in die Umgebung freigesetzt, was Abwehrreaktionen des Wirtes induziert. Eines der Proteine, die aus dem Zytoplasma freigesetzt werden, ist Pneumolysin, einer der bekanntesten und am besten untersuchten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* (siehe unten) ([Mitchell TJ 1997](#)). Daher werden dem LytA Enzym zwei Virulenz-Wirkmechanismen zugeschrieben: zum einen die Freisetzung von Zellwandbestandteilen, die zu einer starken Entzündungsreaktion führen, und zum anderen die Freisetzung von Pneumolysin aus dem Zytoplasma mit allen seinen Folgen ([Canvin JR 1995](#)). Balachandran und Mitarbeiter berichten auch von der Möglichkeit, dass Pneumolysin in der frühen Wachstumsphase der Bakterien auch unabhängig von deren Lyse freigesetzt werden kann ([Balachandran P 2001](#)). Eine Mutation des LytA Gens bewirkt im Mausmodell eine deutliche Abnahme der Virulenz im Vergleich zum Wild-Typ ([Berry AM and Paton JC 2000](#)).

#### 1.1.3.3 *Pneumolysin*

Pneumolysin, ein 53 kDa großes Protein, kommt in allen klinisch relevanten Pneumokokkenstämmen vor und gehört zu der Gruppe der thiol-aktivierten Zytolysine. Diese Toxine werden hauptsächlich von grampositiven Bakterien gebildet. Es befindet sich nicht wie alle vorher erwähnten Pneumokokkenproteine an der Oberfläche der Bakterien sondern im Zytoplasma, aus dem es nach Autolyse der Pneumokokken durch die Autolysine freigesetzt wird ([Paton JC 1993](#)). Allerdings berichten Balachandran et al, dass einige Pneumokokkenstämmen Pneumolysin aktiv ohne die Mithilfe von Autolysin freisetzen können, sodass noch nicht ganz klar ist, in welcher Beziehung Pneumolysin und Autolysin zueinander stehen. Zusätzlich zeigten sie in einem Mausmodell, dass autolysindefiziente Pneumokokkenstämmen

virulent sind, wohingegen pneumolysinnegative Pneumokokken eine deutliche Virulenzeinbuße zeigten ([Balachandran P 2001](#)). Das Besondere an diesem Toxin ist, dass es wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nur bei *S. pneumoniae* vorkommt. ([Braun JS 2001](#)).

Ein wichtiger Virulenzmechanismus des Toxins ist die direkte Schädigung der Zielzelle. Pneumolysin interagiert mit Cholesterin, oligomerisiert und bildet anschließend transmembranäre Poren, die aus 30 bis 50 Monomeren bestehen, einen Durchmesser von ca. 35 bis 45 nm haben und schließlich zur Lyse der betreffenden Zelle führen ([Rubins JB and EN Janoff 1998](#)). Außer der zytotoxischen Funktion hat das Pneumolysin die Fähigkeit zur direkten Aktivierung des Komplementsystems mit gleichzeitiger Hemmung der Oponierung. Diese Funktion beruht auf der Fähigkeit des Pneumolysins direkt an das freie Fc-Ende von Immunglobulin G binden zu können. Pneumolysin hemmt in sublytischen Konzentrationen die Migration und den Respiratory burst (bedeutet eine schnelle Zunahme der Stoffwechselaktivität beim Kontakt zwischen Mikroorganismus und Phagozyt, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten führt). Die bakterizide Wirkung von polymorphen Leukozyten und Makrophagen sowie die Immunglobulinproduktion der Lymphozyten kann durch Pneumolysin ebenfalls gehemmt werden ([Paton JC 1993](#)).

Weiterhin führt Pneumolysin zur Zerstörung der interzellulären Bindungen, womit die Integrität der epithelialen Zellschicht gestört ist und die Invasion der Pneumokokken in den gesamten Körper erheblich erleichtert wird. Des Weiteren erleichtert Pneumolysin das Eindringen der Pneumokokken in die unteren Atemwege, indem es die Zilienbewegung der Epithelzellen des oberen Respirationstraktes hemmt. Durch die Entzündung werden weitere Rezeptoren an der Oberfläche der Epithelzellen exprimiert, was die Adhärenz der Pneumokokken an die Bronchialepithelzellen fördert ([Rubins JB 1993](#)).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die proinflammatorische Wirkung. Pneumolysin führt zu einer vermehrten Freisetzung von NO, IL-1 und TNF $\alpha$  aus Makrophagen ([Rubins JB and Janoff EN 1998](#)) sowie Leukotrien B<sub>4</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub> und Superoxide aus neutrophilen Granulozyten ([Cockeran R 2001](#)). Aufgrund der Pneumolysinwirkung ist die anatomische Barriere des Bronchialepithels geschwächt, was das Eindringen der Pneumokokken

erleichtert. Wahrscheinlich beruhen das alveoläre Ödem und die Hämorrhagien während einer Pneumokokkenpneumonie auf der Interaktion von Pneumolysin mit den Alveolar- und Endothelzellen. Sie versorgt die Pneumokokken mit Nährstoffen und erleichtert diesen das Eindringen in die Blutbahn (Jedrzejewski MJ 2001).

#### 1.1.3.4 $H_2O_2$

In Eukaryonten kann  $H_2O_2$  von der Superoxiddismutase aus zwei Superoxidanionen, die durch Reduktion von Sauerstoff entstehen, unter Aufnahme von zwei Protonen oder durch eine nichtkatalytische Reaktion von Hydroxyperoxidradikalen gebildet werden. Superoxidradikale und andere schädliche Derivate entstehen durch Reduktion von Sauerstoff, welches überlebensnotwendig bei der oxidativen Energiegewinnung ist. Wasserstoffperoxid wird von Katalase abgebaut.

Glutathion ist ein Tripeptid mit einer Sulfhydrylgruppe. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung, da es mit Wasserstoffperoxid und organischen Peroxiden den schädlichen Nebenprodukten der aeroben Lebensweise reagiert. Zum Beispiel schützt es Erythrozyten vor Oxidationsschäden.  $H_2O_2 + H_2O_2$   
Katalase  $2 \times H_2O + O_2$  (Stryer 1991)

Wasserstoffperoxid ist eines der drei wichtigsten Pneumokokkenprodukte, welche während des Bakterienwachstums freigesetzt werden (Zysk G 2000). Da *S. pneumoniae* das wichtige Enzym Katalase fehlt, kann dieses Bakterium  $H_2O_2$ , ein Endprodukt des bakteriellen Metabolismus, nicht weiter abbauen. Wasserstoffperoxid wirkt sowohl auf eukaryote Zellen als auch auf Bakterien toxisch, indem es zu oxidativen DNA-Schäden mit Strangbrüchen und chemischen Veränderungen aller vier DNA-Basen führt (Spencer JP 1996). Es ist bekannt, dass  $H_2O_2$  Wachstum, Proliferation und Reparatur bei Bronchialepithelschäden hemmt. Eine weitere wichtige Rolle als Toxin scheint  $H_2O_2$  in der Wundheilung bei geschädigtem Lungenalveolarepithel zu spielen. Geiser und Mitarbeiter berichten über eine Hemmung der Wundheilung im verletzten Lungengewebe. Sie beobachteten eine verstärkte Apoptose der Alveolarepithelien besonders am Randsaum der Wunde. Diese Beobachtung

fürte zur Vermutung, dass eine erhöhte Apoptoserate der Epithelzellen eine Ursache für die gestörte Wundheilung durch  $H_2O_2$  sein könnte (*Geiser T 2004*). Wahrscheinlich hemmt  $H_2O_2$  die Zilienbewegung des Bronchialepithels indem es ATP als Energielieferant abbaut (*Kobayashi KM 1992*). Die Zilienbewegung in den oberen Atemwegen ist ATP-abhängig (*Ward PA 1991*). Pneumolysin und  $H_2O_2$  haben hier einen additiven Effekt auf das Bronchialepithel und sind somit beide wichtige Virulenzfaktoren der Pneumokokken, da sie die Etablierung und Invasion in die unteren Atemwege deutlich begünstigen.

## 1.2 Apoptose

Apoptose ist ein im Laufe der Evolution konserviertes Selbstmordprogramm einer Zelle, dessen physiologische Aufgabe es ist, überflüssige oder potenziell gefährliche Zellen aus einem Verband von vielen Zellen zu entfernen. Die Aktivierung dieses Selbstmordprogrammes erfolgt z.B. in der Embryogenese beim Untergang der Interdigitalhäute ([Merino R 1999](#)), zur Terminierung einer Immunantwort oder zur Eliminierung von mit Viren befallenen oder bösartig entarteten Zellen ([Green DR 2000](#)) und kommt überall in der Natur vor ([Vaux LD und Korsmeyer ST 1999](#)).

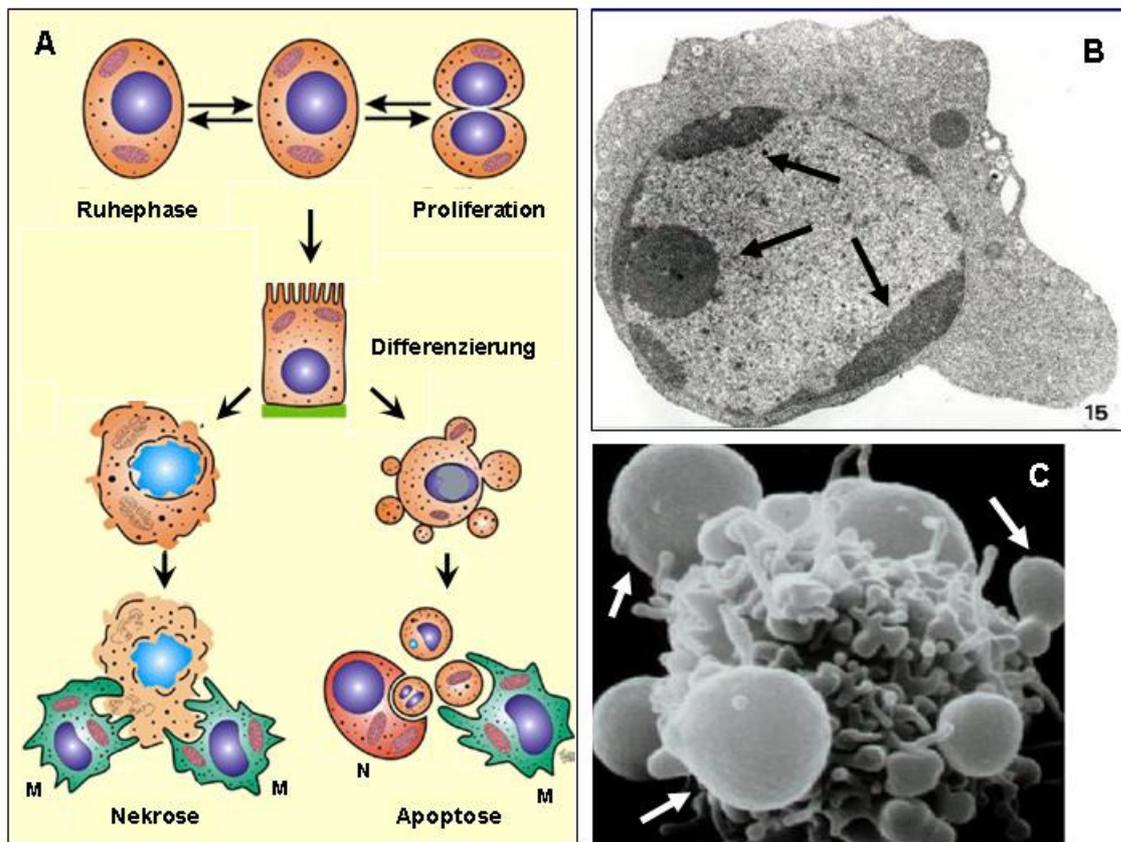
Apoptose ist bei Tieren und Pflanzen sowie prokaryontische Einzellern nachzuweisen. Der erste Hinweis für einen genetisch determinierten Zelluntergang konnte in der Entwicklung der Nematode *Caenorhabditis elegans* beobachtet werden ([Horvitz HR 1982](#)). Von den ursprünglich gebildeten 1090 somatischen Zellen wurden 131 apoptotisch, wozu die Proteasen CED-3 und CED-4 unentbehrlich sind. Auf der anderen Seite gibt es eine Protease CED-9, welche ihrerseits den programmierten Zelltod in *Caenorhabditis elegans* verhindern kann ([Hengartner MO und Horvitz HR 1994](#)). Es stellte sich heraus, dass die Protease CED-9 des *Caenorhabditis elegans* ein Homolog des in den Säugetieren vorkommenden Bcl-2 Onkogens ist. Bcl-2 konnte ebenfalls die Apoptose in *Caenorhabditis elegans* hemmen. Somit sind bereits bei den Nematoden zentrale Elemente des programmierten Zelltodes von Mammalia wieder zu finden, die auch entsprechend interagieren ([Hengartner MO und Horvitz HR 1994](#)). Dies spricht für ein sehr altes und stabiles System.

### 1.2.1 Geschichte

Noch bis vor einhundert Jahren wurde der zelluläre Tod als ein exogen induzierter schädlicher Vorgang betrachtet und war unter dem Namen Nekrose bekannt. Diese Art zu sterben wird durch extreme Abweichungen von den physiologischen Bedingungen ausgelöst: Sei es durch zu hohe Temperaturen bei Verbrennungen, Sauerstoffmangel nach einem Schlaganfall oder zu hohe Strahlenschädigung durch ionisierende Strahlung. Alle diese Todesursachen führen zu einem gemeinsamen morphologischen Erscheinungsbild mit bestimmten biochemischen Charakteristika. Sie schädigen die Zytoplasmamembran und damit die zelluläre Integrität. Die Schädigung der Zytoplasmamembran führt zu einem Einstrom von extrazellulären Ionen und Wasser. Die Folge ist eine Schwellung der Zelle und der zytoplasmatischen Organellen. Gleichzeitig nimmt die metabolische Aktivität ab. Nach der Lyse der Organellen und der Zelle selbst wird der gesamte Inhalt an die Umgebung abgegeben, was zu einer lokalen Entzündungsreaktion führt. Die zelluläre Nekrose entspricht dem pathologischen Zelltod. (*Searle J 1982*). Die morphologischen Veränderungen einer apoptotischen Zelle sind schon früh mit dem Lichtmikroskop beschrieben worden, aber die Bedeutung dieses Vorganges als physiologischer Prozess für die Zellzahlregulation und Embryogenese wurden erst Mitte des 20. Jahrhunderts begriffen. Karl Vogt glaubte 1842, als er bei der embryonalen Entwicklung von Kröten in deren Nervensystem sterbende Zellen beobachtete, etwas Spezifisches zu beobachten (*Vogt C 1842*). Man beobachtete auch während der Metamorphose von Insekten einen Zelltod, der von physiologischer Natur zu sein schien und morphologisch anders aussah als die Nekrose. Lockshin bezeichnete 1965 diese Art des Zelltodes "den programmierten Zelltod" (*Lockshin R and Williams C 1965*). 1972 formulierten Kerr, Whyllie und Currie nach Auswertung neuerer elektronenmikroskopischer Studien der Leber und mit Hormonen behandelter Lymphozyten das Konzept des programmierten Zelltodes, bei dem es sich im Gegensatz zur Nekrose meist um einen physiologischen Zelltod handelt. Der Name Apoptose stammt von James Cormack, Altphilologe der Universität of Aberdeen, und bedeutet im griechischen das Herabfallen der Blätter von Bäumen im Herbst (*Kerr JF 1972*).

### 1.2.2 Morphologie

Morphologische Veränderungen, die während einer Apoptose auftreten, sind eindeutig definiert und klar von der Zellnekrose abgegrenzt (*Kerr JFR, Wyllie AH und Currie AR 1972*). Zu Beginn der Apoptose verliert die Zelle den Kontakt zu ihren Nachbarzellen. Zusätzlich kann man eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Im Gegensatz zur Nekrose bleiben die Organellen intakt, wobei der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle noch für eine längere Zeit aufrechterhalten wird (**Abb. 2 A**). Ein wichtiges morphologisches Zeichen der Zelle in Apoptose ist die Schrumpfung des Zellkerns mit gleichzeitiger Verdichtung des Chromatins, was man unter dem Elektronenmikroskop an typischen Halbmondformen erkennt (**Abb. 2 B**). Ein weiteres wichtiges Phänomen ist das "Membran Blebbing" (**Abb. 2 B und C**). Hierbei handelt es sich um Ausstülpungen mit Bildung von Bläschen der Zytoplasmamembran, die nach der Abschnürung von der Zelle zu "Apoptotic Bodies" werden. Ein "Apoptotic Body" kann intakte Organellen, Vacuolen und kondensiertes Chromatin enthalten (*Kerr JFR, Wyllie AH und Currie AR 1972*).



**Abb. 2: Apoptose.** **A:** Nach der Differenzierung kann eine Zelle hauptsächlich über zwei Arten sterben. Bei der Nekrose platzt die Zellmembran mit Freisetzung des Zellinhalts in die Umgebung. Bei der Apoptose wird der Zellinhalt in kleine mit Zellmembran umgebene Pakete gepackt und anschließend von Makrophagen (**M**) und neutrophilen Granulozyten (**N**) phagozytiert. **B:** Eines der wichtigsten Merkmale bei der Apoptose ist die Kondensation der nuklearen DNA (**Pfeile**). **C:** Ein Zweites wichtiges Merkmal der Apoptose ist das „Membranblebbing“ (**Pfeile**) (*aus Stephan H 2000*).

*In vivo* exprimieren apoptotische Zellen bestimmte Signalmoleküle für die benachbarten Zellen sowie für Phagozyten, welche dann die apoptotischen Körperchen mittels verschiedener Rezeptoren schnell phagozytieren (innerhalb von 24 h), ohne dass eine lokale Entzündungsreaktion oder Schädigung des umliegenden Gewebes entsteht, ein weiteres wichtiges Merkmal, welches die Apoptose von der Nekrose unterscheidet. Das bekannteste Signalmolekül dieser Art ist das Phosphatidylserin, welches sich normalerweise nur auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet (*Fadok VA 2000*). *In vitro* wird bei fehlenden phagozytierenden Zellen in der Umgebung zu einem

späteren Zeitpunkt eine Lyse dieser apoptotischen Körperchen stattfinden, die der Nekrose sehr ähnlich ist, was zur Bezeichnung "sekundäre Nekrose" führte.

### 1.2.3 Signaltransduktion und Biochemie der Apoptose

Leben bedingt und erfordert Tod. So werden im menschlichen Körper etwa 100.000 Zellen pro Sekunde apoptotisch eliminiert und ebenso viele per Mitose neu gebildet. Heute wird eine gehemmte oder überschießende Apoptose als pathogenethisches Prinzip vieler Erkrankungen, wie Neoplasien, Infektionen, autoimmunen und kardiovaskulären Erkrankungen angesehen (*Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR 1972*).

Bei dem programmierten Zelltod handelt es sich um einen energieabhängigen und eng kontrollierten Selbstzerstörungsprozess, bei dem überflüssige oder schädliche Zellen aufgrund eines internen oder externen Apoptosesignals eliminiert werden. Für diesen imperativen Suizid muss ständig ein umfangreicher Proteinapparat unterhalten werden (*Krammer PH 2000*). Der Ablauf der Apoptose kann in drei Stadien eingeteilt werden: in der Induktionsphase führt ein von außen stammendes Signal oder ein intrazellulärer Entscheidungsprozess zur Aktivierung des apoptotischen Programms. Die Exekutionsphase führt dieses Programm aus, in der Endphase werden die zellulären Bestandteile ohne Entzündungsreaktion beseitigt.

Der programmierte Zelltod kann über zwei Signalwege in Gang gesetzt werden: Der intrinsische Transduktionsweg, der hauptsächlich von den Mitochondrien ausgeht, und der extrinsische Signalweg, bei dem membrangebundene Rezeptoren Signale von außen umsetzen und die Exekutionsphase einleiten. Der Fas-Rezeptor ist der wohl am besten untersuchte Vertreter der apoptoseinduzierenden TNF $\alpha$ -Rezeptorfamilie. Er ist auch bekannt unter dem Namen Apo-1 oder CD 95 und spielt eine zentrale Rolle in der caspaseinduzierten Apoptose. Nach dem Andocken eines Fas-Liganden oder eines agonistischen Antikörpers wird die Bildung eines DISC (Death-Inducing-Signaling-Complex) induziert, bestehend aus dem spezifischen Adaptormolekül FADD (Fas-associated death domain) und entweder der Procaspase 8 oder 10, welche über die DED (death effector domain) an FADD

gebunden sind. Nach dem Prinzip der induzierten Proximität reicht nun die geringe konstitutive Enzymaktivität zur Selbstaktivierung aus (*Krammer PH 2000*). Diese erste Phase des programmierten Zelltodes ist durch eine Reihe von Kontrollmechanismen unter ständiger Überwachung. So kann die Anzahl der exprimierten membrangebundenen Fas-Liganden durch NF- $\kappa$ B (Nuclear Faktor kappa B), AP1 (Activating Protein 1) oder NF-AT (Nuclear Factor of activated T cells) beeinflusst werden (*Green DR 1999*). Eine weitere Kontrolle übt FLIP (Fas-associated death domain (FADD)-like interleukin-1beta-converting enzyme inhibitory protein) aus. Hier handelt es sich um ein Protein mit caspasenähnlicher Struktur, aber ohne dessen enzymatische Aktivität. FLIP bindet an FADD statt an einer Caspase und verhindert so die Selbstaktivierung (*Hengartner MO 2000*). Der intrinsische Transduktionsweg wird durch intrazelluläre Schäden ausgelöst, die, wenn sie ein gewisses Ausmaß erreichen, zum Zelltod führen. In der Vermittlung des intrazellulären Signals sind die Bcl-2 Proteine eingeschaltet. Ist eine Zelle schädigenden Einflüssen ausgesetzt, wird dieses Signal durch die Proteine der Bcl-2 Familien integriert. Kommt es anschließend zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, wird die Apoptose eingeleitet. Bei einem intrinsischen Signal öffnet sich ein Membrankanal in der inneren Mitochondrienmembran. Es kommt zur Änderung des H<sup>+</sup> Gradienten, der zum Zusammenbruch des inneren Transmembranpotentials führt. Die Folge ist eine osmotische Schwellung der inneren Membran was zur Ruptur der äußeren Membran und somit zur Freisetzung von proapoptotischen Faktoren führt (*Green DR and Reed JC 1998*). Sie aktivieren Caspasen und führen zur caspasenabhängigen Apoptose. Der bekannteste Faktor ist Cytochrom C (ein Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium). Im Zytoplasma bilden Cytochrom C, Apaf 1 (apoptotic protease activating factor) und die Procaspase 9 das Apoptosom, welches die Caspasenkaskade in Gang setzt. Es gibt aber auch proapoptotische Faktoren, welche die Caspasen zur Apoptoseeinleitung nicht benötigen. Ein Vertreter dieser Gruppe ist AIF (apoptosis inducing factor). Er kann zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation ohne Caspasenaktivierung führen (*Cregan SP 2002*).

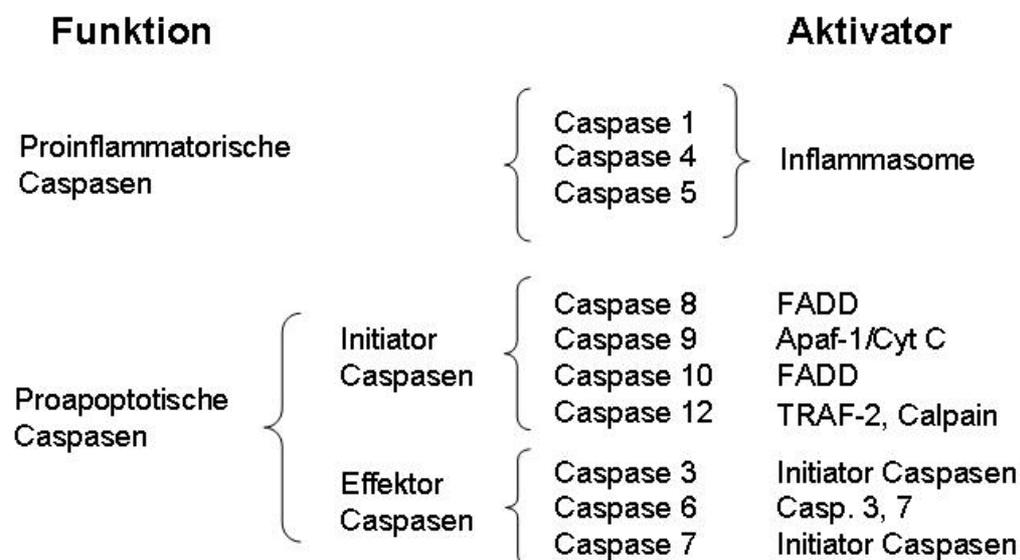
In der Exekutionsphase werden die Todessignale in die Tat umgesetzt. Somatische Zellen unterhalten einen proapoptotischen Proteinapparat von

Enzymen sowie Regulatoren, der durch seine Redundanz eine effektive Apoptoseexekution gewährleistet. Antiapoptotische Modulatoren müssen dagegen ständig transkriptionell induziert werden (*Strasser A 2000*).

Die zentrale Erscheinung des programmierten Zelltodes und auch bedeutende morphologische Kriterien sind die Spaltung wichtiger zytoplasmatischer Proteine, der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und der Polaritätsverlust der Zellmembran (*Hengartner MO 2000*). In der Endphase des programmierten Zelltodes werden mehr als einhundert Zielproteine, die für die Struktur (Aktin, Keratin 18 und 19, Gelsolin, Laminin A und B) und Integrität (DNA-Reparaturenzym PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) sowie die Kinase PAK2) der Zelle von großer Bedeutung sind, von den aktivierten proapoptotischen Proteasen degradiert (*Krammer PH 2000*). In diesem Stadium ist der programmierte Zelltod irreversibel und endet mit den typischen morphologischen Veränderungen: Chromatinkondensation und Bildung von apoptotischen Körperchen, die von den benachbarten Zellen und den Makrophagen aufgenommen werden ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen. Die Wirkung der Caspasen wird durch Endonukleasen ergänzt, die das Chromatin der Zelle in charakteristischer Weise abbauen und damit die genetische Information zerstören. Dies kann aber auch caspaseunabhängig durch AIF, Omi und Endonuklease G geschehen (*Jäättelä M 2002*). Im Zellkern liegt die DNA in Assoziation mit Strukturproteinen, den Histonen, vor. Der größte Anteil der DNA ist um einen Proteinkern aus Histonen gewickelt. Beim typischen apoptotischen Chromatinabbau wird die DNA in den Bereichen abgebaut, die nicht durch die Assoziation mit Histonen geschützt sind so, dass man schließlich DNA-Bruchstücke charakteristischer Größe (180 bp und Vielfache davon) erhält. Durch Auftrennung in einem elektrischen Feld kann man die sog. "DNA-Leitern" sichtbar machen. Diese Form der DNA-Hydrolyse wird als internukleosomaler Chromatinabbau bezeichnet und wird durch die von den Caspasen 3 und 7 aktivierte DNase, CAD, verursacht (Enari, 1998). Im Gegensatz zur Apoptose zeigen nekrotische Zellen diese Leiter nicht. Hier wird die DNA unspezifisch abgebaut. Diese Zerstörung des Chromatins der Zelle ist irreversibel, und der Nachweis einer DNA-Leiter gilt als wichtiges biochemisches Charakteristikum apoptotischer Zellen.

### 1.2.4 Caspaseabhängige Apoptose

Die wichtigste Gruppe proapoptotischer Enzyme sind die Caspasen. Sie sind praktisch Steuerelemente und Exekutoren des programmierten Zelltodes. Caspasen sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden (Cysteiny-Aspartasen). Die Aufgabe dieser Proteasen ist es, die Schlüsselproteine der Zelle, die für die Strukturhaltung, die Replikation und die Reparatur der DNA sowie für die Neusynthese von Proteinen wichtig sind, zu degradieren. Diese Proteasen sind sowohl an der Regulation als auch an der Ausführung des Zelltodes beteiligt und liegen im Zytoplasma in inaktiver Form vor. Diese Zymogene bestehen aus einer Prodomäne und einer Proteasendomäne ([Thornberry NA and Lazebnik Y. 1998](#)). Die Caspasen sind aber nicht nur für den Tod zuständig, einige von ihnen (Caspasen 1, 4, 5 und 11) spielen eine Rolle in der Reifung von proinflammatorischen Zytokinen sowie Zellwachstum und –differenzierung ([Wang J and Lenardo MJ 2000](#)). (siehe **Abb. 3**).

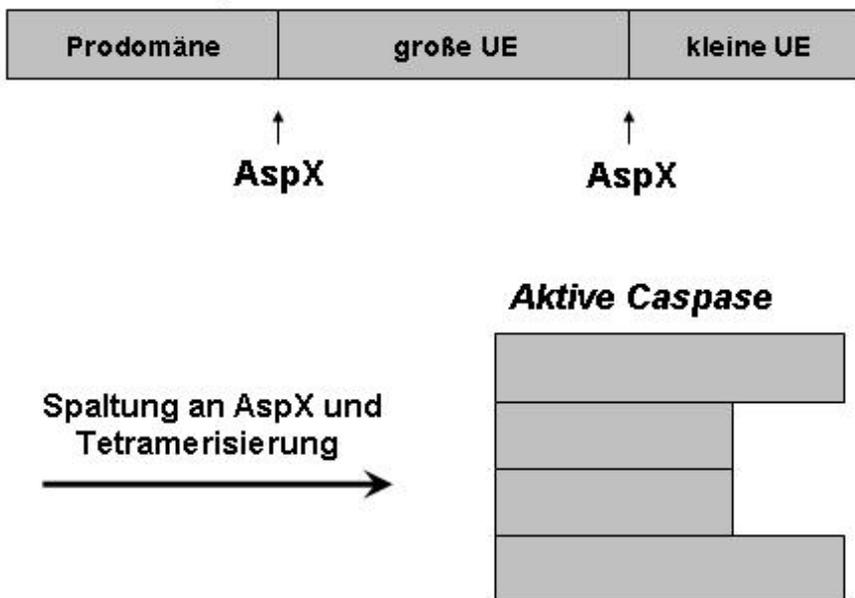


**Abb. 3: Einteilung der Caspasen.** Caspasen 1, 4 und 5 spielen eine Rolle bei Entzündungsreaktionen ([Wang J and Lenardo MJ 2000](#)), die Caspasen 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 bei dem programmierten Zelltod ([Thornberry NA and Lazebnik Y. 1998](#)). Unter Aktivator stehen einige mögliche Aktivatoren der jeweiligen Caspasen.

Caspasen können über mehrere Wege aktiviert werden. So werden die

Initiatorcaspasen 8 und 10 über die Fas/TNF-Rezeptorfamilie aktiviert. Nach Trimerisation des Rezeptors rekrutiert dieser über das Adaptermoleküle FADD und DED die Procaspasen 8 und 10 (*Strasser A 2000*). Dabei werden die Procaspasen so zueinander gebracht, dass sie dimerisieren und sich anschließend durch Spaltung selbst aktivieren (*Salvesen GS and Dixit VM 1999*). Dabei wird die Procaspase in eine lange und eine kurze Untereinheit geschnitten. Nach dem Abspalten des N-Peptides (Prodomäne), welches die DED enthält, wird aus je zwei kleinen und zwei großen Untereinheiten ein Tetramär gebildet, welche die aktive Form der Caspase darstellt (**Abb. 4**) (*Salvesen GS and Dixit VM 1999*).

### **Inaktive Caspase**



**Abb. 4: Aktivierung der Caspasen.** Nach Abspalten der Prodomäne entstehen aus zwei Procaspasen zwei kleine und zwei große Untereinheiten (UE), die sich zu einem Tetramär zusammenlegen und somit die aktive Form der Caspase bilden. Geschnitten wird immer nach einem bestimmten Aspartat (*Salvesen GS and Dixit VM 1999*).

Eine andere Möglichkeit der Caspasenaktivierung ist die stressinduzierte Mitochondrienaktivierung, die Signalproteine in das Zytosol abgeben welche Procaspase 9 rekrutieren. Das so gebildete Apoptosom, bestehend aus mehreren Apaf-1 und Procaspase 9 Molekülen, führt zur Aktivierung der

Caspase 9 (*Acehan D 2002*), wobei die Caspase weniger durch Spaltung als durch Dimerisierung und allosterischer Veränderung aktiviert wird (*Rodriguez J and Lazebnik Y 1999*). Alternativ kann der mitochondriale Mitoseweg auch über Bid, ein BH3 Protein welches von der Caspase 8 gespalten wird, aktiviert werden (*Yin X- M 1999*).

Die Effector-Caspasen 3, 6 und 7 werden durch Abspalten der inhibitorischen N-terminalen Prodomänen (*Saraste A and Pulkki K 2000*) hauptsächlich durch die Initiator-Caspasen aktiviert (*Adams JM 2003*).

Wichtige Regulatoren der Caspasen sind die Proteine der IAP-Familie (inhibitors of apoptosis proteins). So hemmt XIAP (x chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein) die Effektor-Caspasen 3 und 7 über die aminoterminalen BIR-Region (baculoviral IAP repeats, BIR = IAP repeat domaine) indem es an die aktiven Formen beider Caspasen spezifisch bindet (*Cryns V and Yuan J 1998*). Die IAPs ihrerseits werden von den aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien freigesetzten Proteinen DIABLO (direkt IAP Binding protein with log PI) und Omi gehemmt. So unterliegt der programmierte Zelltod einem komplexen, mehrstufigen und redundantem System von Aktivierung und Inhibition.

#### 1.2.5 Caspaseunabhängige Apoptose

In den letzten Jahren gibt es vermehrt Hinweise, dass der kontrollierte Zelltod auch caspaseunabhängig ablaufen kann. Es hat sich vielfach gezeigt, dass eine Hemmung der Caspasenaktivität mit einem Pancaspaseninhibitor den programmierten Zelltod nicht immer verhindern konnte (*Jäättelä M and Tschopp J 2003*). Gleichzeitig konnte man Unterschiede in den morphologischen Veränderungen der Zelle beobachten (*Jäättelä M and Tschopp J 2003*). Auf Grund dieser Gegebenheiten versucht man den programmierten Zelltod anhand des morphologischen Aussehens des Zellkerns in apoptotischen, apoptoseähnlichen, nekrose ähnlichen und nekrotischen Zelltod einzuteilen (*Jäättelä M and Tschopp J 2003*). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass Calpain und lysosomale Serinproteasen (z.B. Granzyme A und B) eine Rolle bei dem caspaseunabhängigen Zelltod spielen (*Leist M and Jäättelä M 2001*).

Bei Calpain handelt es sich um eine Cysteinylopeptidase mit einer Calmodulinähnlichen  $\text{Ca}^{2+}$  bindenden Domäne (Sorimachi H 1997). Es befindet sich im Zytosol und liegt hier in inaktiver Form vor, seine Zielproteine sind Bestandteile des Zytoskeletts (z.B. Fodrin). Im Gegensatz zu den Caspasen besitzt dieses Enzym keine spezifische Schneidestelle (Wolf BB 1999). Eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird zur Aktivierung von Calpain benötigt, was impliziert, dass Calpain in verschiedenen intrazellulären Signalwegen, die durch  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelt werden, eine Rolle spielt (Sorimachi H 1997). Es wird vermutet, dass Calpain eine Rolle bei dem pathologischen Prozess in der Entstehung der Alzheimerkrankheit und dem Untergang von Neuronen während einer ischämischen Attacke spielt (Sorimachi H 1997). Des Weiteren zeigte sich in vitro eine regulative Wirkung von Calpain auf p53 und mag so eventuell eine Rolle bei der Entstehung von malignen Krankheiten spielen (Sorimachi H 1997). Über Calpastatin, seinem natürlichen Inhibitor, wird seine Aktivität kontrolliert. Calpastatin seinerseits wird über Calpain und Caspasen inaktiviert. Calpain, welches durch Neurotoxine, Strahlung oder Etoposid aktiviert werden kann, spielt somit wohl im caspaseabhängigen als auch im caspaseunabhängigen programmierten Zelltod eine Rolle (Wang KK 2000).

Serinproteasen sind eine Enzymfamilie mit vielen Mitgliedern, z.B. Chymotrypsin, Elastase und Trypsin sind Verdauungsenzyme, Thrombin ein Gerinnungsenzym, Granzyme A, B zytotoxische Proteasen (Stryer L 1991). Diese spielen in vielen biologischen Prozessen (Verdauung, Entzündung, Blutgerinnung) eine wichtige Rolle. Gemeinsam ist diesen Enzymen ein sehr reaktiver Serinrest, Serin 195, der dieser Gruppe den Name Serinproteasen gibt (Stryer L 1991). Serinproteasen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Subgruppen eingeteilt, die chymotrypsin-, trypsin- und elastaseähnliche Enzymaktivität (Stenson- Cox C 2003). Welche genaue Rolle die Serinproteasen im programmierten Zelltod spielen, ist noch weitgehend unklar und bedarf weiterer Forschung. Durch Anwendung von Serinprotease-Inhibitoren wie TPCK (chymotrypsin-like N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), TLCK (trypsin-like N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) oder DCI (3, 4- dichloroisocoumarine) konnten einige Funktionen aufgeklärt werden. Es gibt Hinweise, dass sie sowohl beim caspaseabhängigen als auch beim

caspaseunabhängigen Zelltod beteiligt sind. So induziert Granzyme B, ein 32 kDa großes Enzym, welches sich in den Lysosomen von zytotoxischen Lymphozyten befindet und durch Poren (Perforin) in die Zielzelle gelangt, eine Aktivierung der Caspasenkaskade (*Trapani JA 2000*), indem es entweder über Bid oder direkt die Caspasen 9, 3, 6 und 7 aktiviert (*Johnson DE 2000*). Granzym B schneidet seine Substrate ebenfalls nach der Aminosäure Aspartat (*Stenson- Cox C 2003*). Eine Hemmung der Caspasen verhindert allerdings nicht den von Granzym B induzierten Zelltod. Es ändert sich aber die Morphologie der sterbenden Zelle, so dass man hier nicht mehr von einem apoptotischen, sondern von einem nekroseähnlichen Zelltod sprechen muss. Somit kann Granzym B auch einen caspaseunabhängigen Zelltod induzieren (*Stenson- Cox C 2003*). Eine weitere Serinprotease, die ebenfalls in Lysosomen von zytotoxischen Lymphozyten vorkommt, ist Granzyme A. Die trypsinähnliche Serinprotease hat eine Größe von 65 kDa und führt zu einem caspaseunabhängigen Zelltod, der durch Bcl-2 nicht beeinflussbar ist (*Stenson- Cox C 2003*). Granzym A führt zum Abbau von Lamin und zu langen DNA-Fragmenten, welche mit den gängigen Apoptose-Assays nicht detektierbar sind (*Lieberman J and Fan Z 2003*).

Andere Serinproteasen, die am apoptotischen Zelltod beteiligt sind, sind Omi und AP24 (apoptotic protein). Omi, das humane Homolog des bakteriellen Htr2A Proteins, befindet sich als inaktives 50 kDa großes Protein im mitochondrialen Intermembranraum und wird aus diesem als 36 kDa aktive Form in das Zytoplasma freigegeben wo es XIAP über die Bindung an die baculovirus IAP Domäne hemmt. AP24 ist ein 24 kDa großes Enzym mit einer chymotrypsinähnlichen Wirkung, dass über die Aktivierung der DNase II zur DNA-Degradierung führt (*Stenson- Cox C 2003*).

### 1.2.6 Apoptose und Mitochondrien

Mitochondrien scheinen nicht nur die Träger der Atmungskette und damit ATP-Lieferant der Zellen zu sein, sondern auch zentrale Integrations- und Exekutionselemente des Apoptosesystems (*Green DR 1998*). Überwiegen die proapoptotischen Stimuli, so werden, mit oder ohne Zusammenbruch des Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ), proapoptotische Moleküle aus dem

Intermembranraum in das Zytosol freigesetzt (*Gross A 1999*). Die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran kann von vielen Signalen initiiert werden. Über tBid, welches von Caspase 8, den Granzymen und Cathepsin durch Spaltung aus Bid gebildet wird, werden Bax und Bak (proapoptotische Proteine aus der Familie der Bcl-2 Proteine) aktiviert, die dann ihrerseits zur Permeabilisierung der äußeren Membran führen. Weitere Aktivatoren von Bax und Bak sind Bim und Bmf, die nach Schädigung des Zytoskeletts freigesetzt werden sowie Noxa und Puma, die von p53 aktiviert werden. P53 wiederum wird nach Schädigung der DNA aus dem Nukleus freigesetzt und kann über Bcl-2 Proteine oder über Superoxide zur Permeabilisierung der äußeren Membran führen. Eine weitere wichtige Quelle für apoptotische Signale ist das Endoplasmatische Retikulum, welches nach zellulärem Stress  $Ca^{2+}$  in das Zytosol freisetzt und somit direkt über Calcium oder indirekt über Calpain und Bax zur Freisetzung der apoptotischen Substanzen aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien führt (*Jäätelä M 2002*).

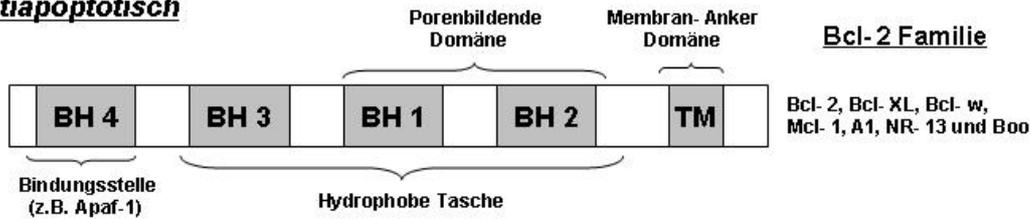
Bcl-2 und Bax regulieren die Ionenkanalaktivität des Permeabilitäts-Transitions Poren- Komplex (PTPC), der aus einem Adenin Nukleotid Translokator (ANT, ATP/ADP-Carrier) auf der inneren Mitochondrienmembran, einem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC, voltage-dependent anion channel) auf der äußeren Mitochondrienmembran und löslichen Matrix-Proteinen (z.B. Cyclophilin D) besteht (*Zamzami N und Kroemer G 2001*). Sie können direkt mit ANT oder VDAC interagieren, wobei Bax die Permeabilität der inneren Membran erhöht, was zur Schwellung des intermembranären Raums durch Einströmen von Wasser und Ionen (z.B. Chlorid) mit anschließender Störung der äußeren Membran und Freisetzung proapoptotischer Faktoren (AIF, Cytochrom c, DIABLO, Omi) in das Zytoplasma führt (*Jacotot E 2001*). Bcl-2 auf der anderen Seite wirkt diesem entgegen, indem es den Wassereinstrom verhindert, das Membranpotential stabilisiert und so die Freisetzung der proapoptotischen Faktoren verhindert (*Brenner C 2000*). Bcl-2 Proteine können aber auch untereinander dimerisieren und selber ionendurchlässige Poren in der Membran bilden. Je nach Kombination stabilisieren diese Poren das Membranpotential (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) oder destabilisieren es (Bax, Bad). Des Weiteren können sich die Mitglieder der Bcl-

2 Familie selber kontrollieren. So dimerisieren antiapoptotische Proteine mit proapoptotischen wobei diese sich dabei gegenseitig neutralisieren (*Cory S and Adams JM 2002*).

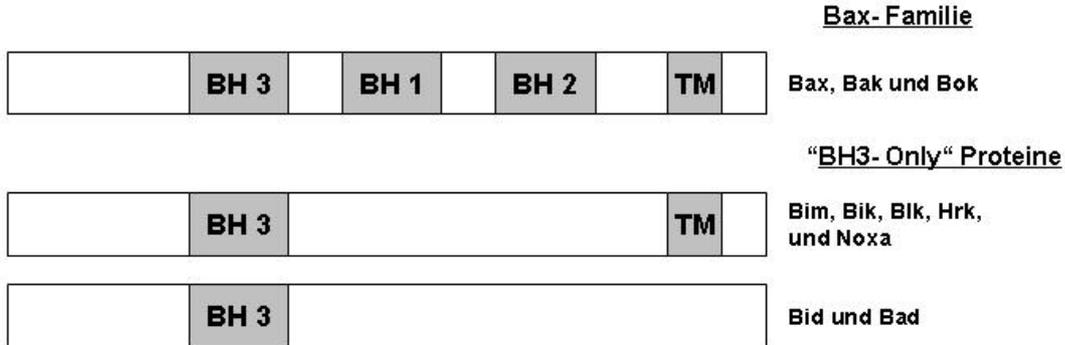
Inzwischen sind bis zu 20 Mitglieder dieser Proteinfamilie mit sowohl apoptotischen als auch antiapoptotischen Funktionen bekannt (**Abb. 5**). Alle Mitglieder besitzen mindestens eine der vier bekannten BH-Domänen (Bcl-2 homology domaine, BH1- BH4) und werden nach Struktur und Funktion in drei Untergruppen eingeteilt. Eine Gruppe bestehend aus den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, BCL-X<sub>2</sub>, Bcl-w, Mcl-1, A1, NR-13 und Boo, besitzt mindestens BH1 und BH2 sowie eine Membrananker-Domäne. Die zweite Gruppe, bestehend aus den proapoptotischen Proteinen Bax, Bak und Bok, besitzt BH1, BH2 und BH3, aber nicht die N-terminale BH4- Domäne. Die dritte Gruppe besteht ebenfalls aus proapoptotischen Proteinen (Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk und Noxa), besitzt aber nur eine kurze zentrale BH3 Domäne (*Burlacu A 2003*).

Die Bcl-2-Proteine werden unter anderem durch Phosphorylierung (Bad) und Spaltung (Bid) reguliert (Adams, 1998) und neutralisieren sich gegenseitig (Gruppe 1 vs. Gruppe 2 und Gruppe 3 vs. Gruppe 1). Es gibt drei Modelle, die die Wechselwirkungen zwischen den anti- und proapoptotischen Bcl-2 Proteinen beschreibt. Im ersten Model aktivieren die "BH3-only" Proteine die Gruppe von Bax/Bak. Diesen Prozess kann Bcl-2 hemmen. Im zweiten Model hemmen die "BH3-only" Proteine die antiapoptotischen Proteine, die wiederum Bax/Bak hemmen. Im dritten Model aktivieren "BH3-only" Proteine Bax/Bak und hemmen die antiapoptotischen Proteine, die zusätzlich noch von Bad gehemmt werden können (*Adams JM 2003*). Die verschiedenen Mitglieder dieser Familie verbinden sich untereinander zu Dimeren, die fördernd oder hemmend auf die Apoptose einwirken.

**antiapoptotisch**



**proapoptotisch**



**Abb. 5: Aufbau und Einteilung der Bcl-2 Proteinfamilie.** BH = Bcl-2 homology domäne (Cory S and Adams JM 2002).

Die antiapoptotische Gruppe mit ihrem bekanntesten Mitglied Bcl-2 befindet sich hauptsächlich auf der äußeren Mitochondrienmembran. Obwohl sie auch im Endoplasmatischen Retikulum und der Zellkernmembran vorkommt, scheint sie hauptsächlich auf die Mitochondrien zu wirken. Bcl-2 oder Bcl-X<sub>L</sub>- Dimere unterdrücken die Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für Wasserstoff- und Calciumionen, erhalten damit deren Funktionsfähigkeit und wirken so der Apoptose entgegen. Das frei im Zytosol vorkommende “BH3- only“ Protein Bid wird nach seiner Spaltung in tBid zum Aktivator von Bax und Bak, welche zur Mitochondrienmembran translozieren, Poren auf der äußeren Membran bilden und somit die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Wasserstoff- und Calciumionen erhöhen, womit die Freisetzung der proapoptotischen Substanzen gefördert wird. Andere “BH3-only“ Proteine wie Bim (wird nach Schädigung des Zytoskelettes freigesetzt) und Noxa (Aktivierung über p53 nach Schädigung der DNA) können ebenfalls Bax und Bak aktivieren (Hengartner MO 2000).

### 1.2.7 Klinische Bedeutung der Apoptose

In nahezu jedem Bereich der Medizin spielt Apoptose eine Rolle und reguliert mit der Mitose zusammen die Zellanzahl eines Zellverbandes. Beide stehen im Gleichgewicht zueinander. Wenn dieses durch eine unkontrolliert gesteigerte oder verminderte Zelltodrate gestört wird, kann eine Krankheit resultieren. So spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle bei der Embryogenese (z.B. Organentwicklung). Wird etwa bei der Ausbildung der Finger die Apoptoserate gehemmt, bleiben die Interdigitalhäute erhalten (*Merino R 1999*).

Zahlreiche Studien belegen das Auftreten und die offensichtliche aggravierende Relevanz vom programmierten Zelltod in instabilen arteriosklerotischen Plaques (*Kam PCA 2000*). Hier neigen die Endothelzellen bei Exposition gegenüber klassischen artherogenen Risikofaktoren, wie hohen Glukosespiegeln, oxidiertem LDL, oxidativem Stress oder hohen Angiotensin II-Konzentrationen vermehrt zur Apoptose (*Yaoita H 2000*).

Bei Autoimmunerkrankungen haben der Fas-Rezeptor und der Fas-Ligand eine übergeordnete Bedeutung. So müssen durch Antigene aktivierte T-Lymphozyten nachdem sich die Immunantwort aufgebaut hat wieder vom Ort des Geschehens entfernt werden, da sonst die von ihnen produzierten Zytokine das umliegende Gewebe schädigen würden. Nach wiederholter Antigenstimulation werden vermehrt Fas-Rezeptoren und Fas-Liganden an der Zelloberfläche der aktivierten T-Lymphozyten exprimiert, sodass diese sich gegenseitig kontrollieren (*Alderson MR 1995*). In neurodegenerativen Prozessen (Alzheimer-, Parkinson- oder Huntington- Krankheit) scheint der programmierte Zelltod ebenfalls von Bedeutung zu sein, obwohl noch nicht ganz klar ist, ob die Apoptose Ursache oder Produkt dieser Krankheiten ist (*Troy CM and Salvesen GS 2002*). Auf jeden Fall kann der neuronale Zelluntergang durch Hemmung der Caspasen reduziert werden. So konnte in Mäusen gezeigt werden, dass Nervenzellen, die keine funktionierende Caspase 12 besitzen, gegen Apoptose (z.B. neuronale Zelltod bei der Alzheimer-Krankheit, der durch Ansammlung von  $\beta$ -Amyloid Protein induziert wird) resistent sind (*Nakagawa T 2000*). Ein Charakteristikum von neoplastischen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellverbänden ist ungehemmtes Wachstum. Durch Veränderungen etwa des genetischen Codes sind diese Zellen praktisch

unsterblich geworden. Normalerweise begehen Parenchymzellen des Endo- oder Epithels, die angemessene Zell-Zell-Kontakte und Verbindungen zur Matrix verlieren Selbstmord, indem der programmierte Zelltod aktiviert wird. (*Hengartner MO 2000*). In den neoplasieanfälligen Phasen des Wachstums reagieren somatische Zellen auch durch den Zellzykluswächter p53 sehr empfindlich mit Apoptose auf DNA-Schäden. Die mutierten Gene haben oft mit der Apoptoseregulation zu tun. Bei verschiedenen Krebsarten ist oft das Tumorsuppressorprotein p53 betroffen, dessen Ausfall einen gestörten Ablauf der Apoptose bedeutet. Ein anderes Beispiel ist das Bcl-2 Gen, welches für das B-Zell-Lymphom verantwortlich gemacht wird. Dabei wird das antiapoptotische Bcl-2 Protein überexprimiert und somit die Lebensdauer der betroffenen Zelle verlängert (*Green DR and Martin SJ 1995*). Bei der Entstehung des Kolonkarzinoms kann eine Frameshift-Mutation der Bax-Gene die Ursache sein. Bax, ebenfalls ein Protein aus der Bcl-2 Familie, ist ein direkter Gegenspieler des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins. Wird dieser ausgeschaltet kann Bcl-2 ungehindert seine Wirkung entfalten (*Rampino N 1997*).

Auch bei Infektionskrankheiten spielt der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle. So können pathogene Bakterien aktiv den programmierten Zelltod beeinflussen und ihn entweder hemmen oder aktivieren. Daraus ergeben sich für den Erreger mehrer Vorteile. Durch Induktion der Apoptose in immunkompetenten Zellen (Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten) des Wirtes, wird dessen Abwehr geschwächt. Weiterhin zerstören sie durch Induktion des programmierten Zelltodes und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) das umliegende Gewebe und können sich so besser etablieren. Es gibt aber auch Beispiele von Keimen (besonders intrazelluläre Keime wie *Chlamydia pneumoniae*), in denen die Apoptose am Anfang einer Infektion gehemmt und im Spätstadium induziert wird. Dies hat den Vorteil, dass diese Erreger den Zellzyklus des Wirtes an ihren eigenen anpassen können. Chlamydia Spezies können die Apoptose von Epithelzellen und Monozyten in den ersten 2 Tagen der Infektion hemmen, indem sie die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien verhindern (*Fan T 1998*). 72 bis 96 Stunden nach Infektion allerdings, zeigt sich eine Induktion des programmierten Zelltodes (*Gibellini D 1998*). Anhand dieser Daten ist ein Model aufgestellt worden, in dem die Apoptose in der

Replikationsphase gehemmt und nach Beendigung des Lebenszykluses aktiviert wird so, dass die Chlamydien neue Zellen infizieren können. Ein weiteres Beispiel hierfür sind Rickettsien, die ihren Einfluss auf den Zelltod über NF- $\kappa$ B ausüben (*Clifton DR 1998*). Extrazelluläre Bakterien sind weniger auf eine Apoptosehemmung als auf deren Induktion angewiesen. *Staphylococcus aureus*, ein grampositives Bakterium, induziert Apoptose in Epithelzellen über die Aktivierung der Caspasenkaskade (*Wesson CA 2000*). Viren können ebenfalls den programmierten Zelltod auf allen Ebenen der Signaltransduktion beeinflussen und daraus ihren Nutzen ziehen, indem sie sich innerhalb der unsterblich gemachten Zellen vor der Immunabwehr des Wirtes verstecken oder in den Zellen der Immunabwehr selbst Apoptose induzieren, um so die größte Gefahr für sie auszuschalten. So hemmt das Cytomegalie Virus die Apoptose in der Wirtszelle über eine Überexpression des p53 Proteins (*Vaux DL 1994*). Bei einer HIV-Infektion werden besonders Immunabwehrzellen (CD4-positive Lymphozyten, Monozyten) geschädigt. Dies hat den Vorteil für das Virus, dass das Immunsystem des Wirtes so geschwächt wird, dass er das Virus nicht mehr beseitigen kann. Induktion der Apoptose wird über eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C, über eine Interaktion des Vpr (viral protein R) mit dem Permeabilitäts-Transitions Poren-Komplex (PTPC), in das Zytosol ausgelöst. Den genaueren Mechanismus haben Jacotot und Mitarbeiter beschrieben (*Jacotot E 2001*). Baculoviren hingegen verhindern die Apoptose ihrer Wirtszelle und können sich so vor dem Immunsystem des Wirtes verstecken. Allerdings haben sie einen anderen Mechanismus der Einflussnahme als das HIV entwickelt. So lassen sie von der Wirtszelle selbst zwei virale Proteine produzieren, das IAP und p35, welche beide die Aktivität der Caspasen reduzieren. Ebenfalls über eine Schwächung der Caspasenaktivität kann das Kuhpockenvirus, via Crm A (cytokine response modifier A) die Caspasen 1 und 8 binden und hemmen (*Kam PCA 2000*). Eine andere Möglichkeit für Viren, die Apoptose zu kontrollieren, besitzt das Epstein-Barr- und Herpesvirus saimiri. Diese beiden besitzen ein Bcl-2 Homolog welches über die Stabilisierung des Mitochondrien-Membran-Potentials antiapoptotisch wirkt (*Müller A and Rudel T 2001*).

### 1.3 Fragestellung

*Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) und Meningitis ([File TM 2004](#)). Trotz wirksamer Medikamente gegen dieses Bakterium sind beide Erkrankungen immer noch mit einer sehr hohen Morbidität und Mortalität behaftet ([File TM 2004](#)). Trotz dieser großen Bedeutung der durch die *Streptococcus pneumoniae* verursachten Lungenentzündung ist bis jetzt noch nicht aufgeklärt worden, wie die Bakterien den infizierten Organismus schädigen ([Heffelfinger JD 2000](#)). Diese Arbeit untersucht den Zelluntergang der Lungenepithelien während einer *Streptococcus pneumoniae*-Infektion anhand folgender Fragen:

1. Induzieren *Streptococcus pneumoniae* den Zelltod von pulmonalen Epithelzellen ?
2. Welche Rolle spielen die Caspasen beim pneumokokkeninduzierten Zelltod ?
3. Gibt es neben den Caspasen noch andere Mitspieler, die über den Zelltod entscheiden ?
4. Sind die Mitochondrien von Bedeutung ?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck
Acrylamid / Bisacrylamid 40%	Serva
Agarose	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphoterecin B	Roche
Antipain	Sigma
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Gibco
Bacto Agar	Difco
Bacto™ Todd Hewitt Broth	Becton
BioRad Reagenz	BioRad
Bovine Serum Albumine	Sigma
Borsäure	Merck
Brain Heart Infusion	Difco
Calciumchlorid-Hexahydrat	Merck
Chloroform	Merck
Citronensäure-Monohydrat	Merck
Columbia Agar	BD
Denhardt's Reagenz	Sigma
4-Dichloroisocumarin (DCI)	Sigma
Diethyl-Pyrococarbonat (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Serva

Human Recombinant Epidermal Growth Factor	Gibco
Epinephrin	
Essigsäure 100%	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Formaldehyd 37%	Sigma
Formamid (deionisiert)	Sigma
Forskolin	Sigma
Glucose (D+) – Monohydrat	Merck
L – Glutamine	Gibco
Glycerin	Merck
Hepes	Roth
ICE – Inhibitor II	Boehringer
IPTG	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid – Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat – Heptahydrat	Merck
Mevalonsäure	Sigma
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
$\beta$ – Mercaptoethanol	Serva
N – Acetylcystein (NAC)	Sigma
Natriumcitrat	Sigma
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat – Dihydrat	Merck

Di – Natriumhydrogenphosphat – Heptahydrat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natrium – Nitroprussid (SNP)	Sigma
Natriumsulfat	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin	Biochrom AG
Pepstatin A	Sigma
Retinolsäure	
Streptomycin	Biochrom AG
N, N, N', N' - Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
TNF - $\alpha$ (human)	R&D – Systems
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Triton X – 100	Serva
Trypsin EDTA	Boehringer
Tween – 20	Sigma
Zeocin <sup>TM</sup>	Invitrogen
Yeast Extrakt	Sigma

## 2.1.2 Kulturmedien

### 2.1.2.1 A549-Alveolarepithelzellen (transfizierte und nicht transfizierte Zellen)

500ml Alveolarepithelzellmedium (HAM'S F 12 mit L-Glutamin) von PAA mit

10% FCS

7ml Penicillin 10000 U/ Streptomycin

1 ml Amphotericin B 200x 25 mg/ 20 ml

Zur Kultivierung der humanen Epithelzellen (A549) musste das fetale Kälberserum für 45 min auf 56°C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt werden.

### 2.1.2.2 BEAS-2B-Bronchialepithelzellen

500 ml Bronchialepithelzellmedium (Keratinocyte – SFM) von Gibco mit

5 ml L – Glutamine 200 mM 100x

7ml Penicillin 10000 U/ Streptomycin 10000µg/ml

200 µl Amphotericin B 200x 25 mg/ 20 ml

200 µl Epinephrin

1 Aliquot Recombinant Epidermal Growth Factor (rEGF) (2,5 µg/ml)

1 Aliquot Bovine Pituitary Extract (BPG) (25 mg/ml)

50 µl Retinolsäure

### 2.1.2.3 *Streptococcus pneumoniae* (D39, R6x, R6x $\Delta$ ply):

1000 ml Pneumokokken Wachstumsmedium (autoklaviert):

30 g Bacto™ Todd Hewitt Broth

aqua bidest ad 1000 ml

0,5 % Yeast Extrakt

Einfriermedium:

80% Todd-Hewitt-Boullion

20% Glycerol

Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, stellte freundlicherweise die Pneumokokkenstämme D39, R6x, R6x $\Delta$ ply sowie das aufgereinigte Pneumolysin zur Verfügung.

Columbia Agar-Platten mit 5 % Schafsblut wurden von BD Mikrobiologie gekauft.

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

HBSS (10x)	KCl	4,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g
	NaCl	80,0 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,9 g
	D – Glukose	10,0 g
	a. bidest	ad 1000,0 ml
H/H -/-	HBSS (10x)	100,0 ml
	HEPES	6,0 g
	a. bidest	ad 1000,0 ml
H/H +/-	HBSS (10x)	100,0 ml
	CaCl <sub>2</sub>	0,185 g
	MgCl <sub>2</sub>	0,100 g
	MgSO <sub>2</sub>	0,100 g
	HEPES	6,0 g
	a. bidest	ad 1000,0 ml
Paraformaldehyd (20x)	Paraformaldehyd.	200,0 g
	a. bidest	ad 1000,0 ml
	Erhitzt auf 60°C (Abzug), tropfenweise 1M NaOH zugeben bis die Lösung klar wird, dann bei Raumtemperatur abkühlen	
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd (20x)	5,0 ml
	a. bidest	Ad 1000,0 ml
PBS–Stammlösung	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	58,5 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,8 g
	NaCl	320,0 g
	a. bidest	Ad 1000,0 ml

PBS	PBS – Stammlösung (20x)	50,0 ml
	a. bidest	Ad 1000,0 ml
		pH 7,4
TBE (10x)	Tris – HCl	890 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA	25 mM
		pH 8,3
TE (10x)	Tris – HCl	100 mM
	EDTA	10 mM
		pH 8,0

### ***Lösungen und Puffer für Western-Blot***

Auftragspuffer	Tridest	3,8 ml
	Tris – HCl	1,0 ml, 0,5 M, pH
	Glycerol	0,8 ml
	SDS (10 %, w/v)	1,6 ml
	Bromphenolblau (1 %, 0,4 ml	
	β – Mercaptoethanol (1 %, 0,4 ml	
Sammelgel	0,5 M Tris – HCl pH 6,8	
	10 % SDS	
	40 % Acrylamidlösung	
	Bidest	
	TEMED	
	10 % Ammoniumpersulfat	
Trenngel	1,5 M Tris HCl pH 8,8	
	10 % SDS	
	40 % Acrylamidlösungen	
	Bidest	
	TEMED	
	10 % Ammoniumpersulfat	

Je nach molekularem Gewicht des Zielproteins wurde eine andere prozentuale Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel gewählt.

Lämmli-Puffer	Tris-Base	(5x) 15 g
	Glycerin	72 g
	SDS	5 g
	Aqua bidest	1000 ml

Ponceau-S-Proteinfärbelösung	Ponceau-S	1 g
	Essigsäure	50 ml
	Aqua bidest	950 ml

Blotting-Puffer (10x) Stocklösung	Tris-Base	15 g
	Glycerin	72 g
	Aqua bidest	500 ml

Blotting-Puffer	Stocklösung (10x)	80 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua bidest	720 ml

#### *Lösungen für in-situ-Tunnel-Assay*

Fixierlösung	Aceton/Methanol	1:1	oder	3	%
Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton X-100 in aqua bidest				
Absättigungslösung	5 g Venimmun/ 100 ml Bidest (Stocklösung) 1:50 verdünnt mit PBS -/-, pH 7,4				
Waschlösung	PBS -/-, pH 7,4				

## 2.1.4 Zubehör

Zellkulturflaschen (T25 und T75)	Nuncon
Multischalen (mit 96, 24, 12 und 6 Vertiefungen)	Nuncon
Petrischalen (10 mm Durchmesser)	Nuncon
Hybond-ECL-Membran	Amersham
Nitrozellulose-Transfermembran	Qiagen
Gel-Blotting Papier	Roth
Größenstandart für Protein: Rainbow <sup>high</sup>	Amersham

### Spezielle Geräte:

ELISA-Photometer	SLT
Forschungsmikroskop BX60	Olympus
Laborwaage	Mettler
Mini-Protean-Gel-System	BioRad
Odyssey® Infrared Imaging System	LI-COR Bioscience
Phasenkontrast Mikroskop mit Fluoreszenzeinheit	Olympus
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Kontron
Sterilbank Laminair HB 2448	Heraeus
Zellkultur-Inkubator	Heraeus
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich

## 2.1.5 Antikörper für Western Blot

### Primärer Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Firma</b>
Caspase 3	Upstate
anti-Cleaved Caspase 6	Cell Signaling
Caspase 8 p20	Pharmingen
Caspase 9 p10	Santa Cruz
BID	Cell Signaling
Bax	Upstate
Bcl-2	Santa Cruz
PARP	Upstate
Beladungskontrolle:	
ERK-2	Santa Cruz
p38	Santa Cruz

### Sekundäre Antikörper

<b>Spezifität</b>	<b>Firma</b>
anti-Mouse IgG IRDye 800	Rockland Immunochemicals
anti-Rabbit IgG IRDye 800	Rockland Immunochemicals
anti-Mouse IgG Cy5.5	Rockland Immunochemicals
anti Rabbit IgG Cy5.5	Rockland Immunochemicals

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultur von Alveolarepithelzellen (A549)

Die A549 Zelllinie wurde 1972 von D. J. Giard aus einem 58-jährigen männlichen Kaukasier gewonnen. Dabei handelt es sich um Alveolarepithelzellen vom Typ 2 aus einem Lungenkarzinom. Beim Kauf von ATCC befanden sich die Zellen in der 68. Passage. Die Versuche wurden zwischen der 80. und der 100. Passage durchgeführt. Die Kultur erfolgte in T 75 Flaschen mit HAM'S F 12 mit L-Glutamin Medium, 10% hitzebehandeltes fetales Kälberserum (FCS), Amphotericin B und Streptomycin/ Penicillin im Brutschrank (bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>). Nach 6-7 Tagen waren die Zellen konfluent und wurden je nach Verwendungszweck in T 75 Flaschen (zur Vermehrung), 96-Well-Platten, 12-Well-Platten oder auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml vorgewärmtem PBS +/- gewaschen, mit 4 ml Trypsin-EDTA (0,5 %) für 4 Minuten im Brutschrank gelassen und nachdem sich die Zellen gelöst hatten in Kulturmedium mit Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B (Vermehrung) oder **ohne** Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B (Versuche) aufgenommen.

### 2.2.2 Kultur von Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)

Die BEAS-2B Zelllinie (41. Passage) wurde uns freundlicherweise von Dr. C. Harris vom National Institute of Health, Bethesda, MD, USA zur Verfügung gestellt.

BEAS-2B sind humane Bronchialepithelzellen, die mit dem Adenovirus 12-SV40 transformiert und dadurch immortalisiert wurden.

Die Versuche wurden zwischen der 70. und der 90. Passage durchgeführt. Die Kultur erfolgte in T 75 Flaschen mit Keratinocyten-SFM Medium und Zugabe von L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B, Epinephrin, human recombinant epidermal Growth Factor (rEGF), Bovine Pituitary Extract (BPG) und Retinolsäure im Brutschrank (bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>). Wenn die Zellen

nach 6-7 Tagen konfluent waren, wurden sie je nach Verwendungszweck in T 75 Flaschen (zur Vermehrung), 96-Well-Platten, 12-Well-Platten oder auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml vorgewärmtem PBS +/- gewaschen, mit 4 ml Trypsin-EDTA (0,5 %) vom Boden der Flasche abgelöst und in Kulturmedium **mit** (zur Vermehrung) oder **ohne** Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B (für die Versuche) aufgenommen.

### 2.2.3 Kultur von transfizierten Alveolarepithelzellen (A549, mit Überexpression des Bcl-2 Proteins)

Herr Dr. Tzipora Goldkorn aus Davis, CA, USA, stellte freundlicherweise diese Zelllinie zur Verfügung ([Zysk G 2001](#)).

Diese Alveolarepithelzellen vom Typ 2 (A549) sind stabil transfiziert mit einem Vektor zur Überexpression des Bcl-2 Proteins.

Die Kultur erfolgte in T 75 Flaschen mit HAM'S F 12 mit L-Glutamin Medium, 10% hitzebehandeltes fetales Kälberserum (FCS), Amphotericin B, Streptomycin/ Penicillin und **100 µg/ml Zeocin** (Antibiotikum aus der Familie von Bleomycin/Phleomycin, Invitrogen) im Brutschrank (bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>). Die konfluenten Zellen (nach 6-7 Tagen) wurden zur Vermehrung in T 75 Flaschen mit Kulturmedium plus 10% hitzebehandeltes fetales Kälberserum (FCS) plus Zeocin<sup>TM</sup>, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B aufgenommen. Für die Versuche wurden die Zellen je nach Versuch auf 96-Well-Platten, 12-Well-Platten oder auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm gesplittet. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml vorgewärmtem PBS +/- gewaschen, mit 4 ml Trypsin-EDTA (0,5%) vom Boden abgelöst und in Kulturmedium plus 10% hitzebehandeltes fetales Kälberserum (FCS) **ohne** Zusatz von Zeocin<sup>TM</sup>, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B aufgenommen.

## 2.2.4 Pneumokokken (*Streptococcus pneumoniae*)

### 2.2.4.1 Herkunft

Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, stellte freundlicherweise die Pneumokokkenstämme D39, R6x und *R6xΔply* zur Verfügung. D39 ist ein Pneumokokkenstamm vom Typ 2 nach der dänischen Nomenklatur. D39 besitzt eine Kapsel aus Polysacchariden. R6x ist ein unbekapselter Abkömmling des D39 Stammes (*Tiraby JG und Fox MS 1973*). Der *R6xΔply* pneumolysinfreie Stamm wurde durch Einbringen des pJDC9:ply Plasmids in den R6x Stamm erzeugt (*Zysk G 2001*).

### 2.2.4.2 Aufbewahrung

Für jeden Stamm wurden zwei Sicherheitsstocks und zwei Arbeitsstocks (in Einfriermedium) angelegt, die bei -80 °C gelagert wurden. Alle Versuche wurden mit den Bakterien aus diesen Arbeitsstocks durchgeführt.

### 2.2.4.3 Ausstreichen

Bakterien wurden auf Columbia Agar Platten (BD Mikrobiologie) mit einer 10 µl Platin-Öse ausgestrichen. Für einen Infektionsversuch wurden die Bakterien ausgestrichen und über Nacht in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wachsen gelassen (15-20 Stunden).

### 2.2.4.4 Infektion

Zur Infektion wurden Bakterien in der mid-logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Diese wurde mittels eines Spektralphotometers (600 nm) bei einer Optischen Dichte (OD) zwischen 0,2–0,4 ermittelt. Hierzu kamen die Bakterien in 20 ml Pneumokokken Wachstumsmedium und wurden im Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für 3-4 Stunden wachsen gelassen. Bei der entsprechenden OD wurden die Bakterien runter zentrifugiert (1800 g, 25 °C, 15 Minuten), der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet in der gleichen Menge des jeweiligen Zell-Kulturmediums **ohne** Antibiotika wie der Überstand (je nach der zu infizierenden Zelllinie) gelöst.

#### 2.2.4.5 Herstellung der Infektionskonzentrationen

Durch Ausstreichen auf Columbia Agar Platten (BD Mikrobiologie) und Auszählen wurde festgestellt, dass eine OD von 0,1, am Spektralphotometer gemessen, einer Bakterienkonzentration von ca.  $1 \times 10^8$  CFU/ml entsprechen. Alle weiteren Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung im jeweiligen Zellkulturmedium **ohne** Antibiotika hergestellt.

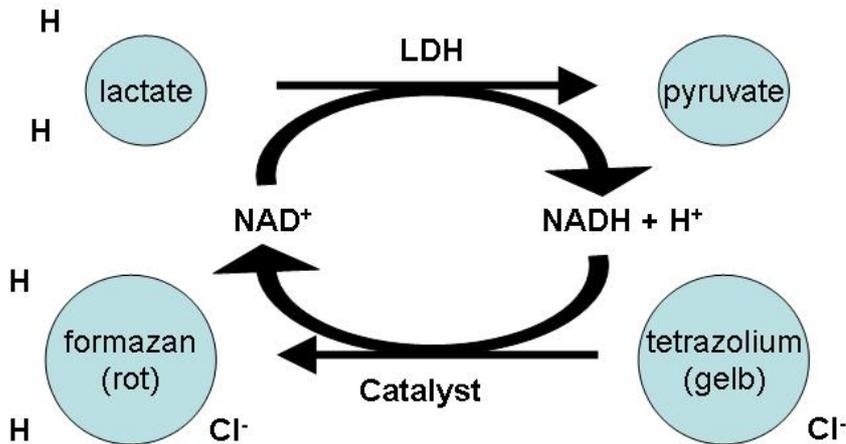
#### 2.2.5 Pneumolysin

Das rekombinante Pneumolysin wurde aus transfizierten *Escherichia coli* gewonnen und aufgereinigt ([Saunders K 1989](#)). Die Versuche wurden mit einer Konzentration von 0,21 mg/ml durchgeführt.

Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, stellte freundlicherweise das aufgereinigte Pneumolysin zur Verfügung.

#### 2.2.6 Messung der Laktatdehydrogenase

Um den nekrotischen vom apoptotischen Zelltod zu unterscheiden, wurde die Aktivität der von nekrotischen Zellen nach verschiedenen Stimuli in den Überstand freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) mit Hilfe eines kolorimetrischen Enzymassays (von Boehringer Mannheim) bestimmt. Hierfür wurden die Zellen zentrifugiert (200 g, Raumtemperatur, 10 min). Danach wurden 30 µl des Zellüberstandes mit 100 µl der Assay Reaktions-Mischung in eine Mikrotiterplatte versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation im Dunkeln wurde die Reaktion mit 50 µl HCL gestoppt. Im Anschluss wurde die Farbentwicklung im Photometer bestimmt. Die LDH-Aktivität wurde als Bruchteil der maximal aus Kontrollzellen nach deren Lysierung freigesetzten Aktivität angegeben. *Prinzip:* Die LDH reduzierte  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  durch Oxidation von Laktat zu Pyruvat. In einem zweiten Schritt wird enzymatisch per Diaphorase zwei Wasserstoffatome von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT(2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen. Dieses wird zu rotem Formazansalz reduziert und kann nun über seine Absorption bei 490 nm im Photometer bestimmt werden (**Abb. 6**).



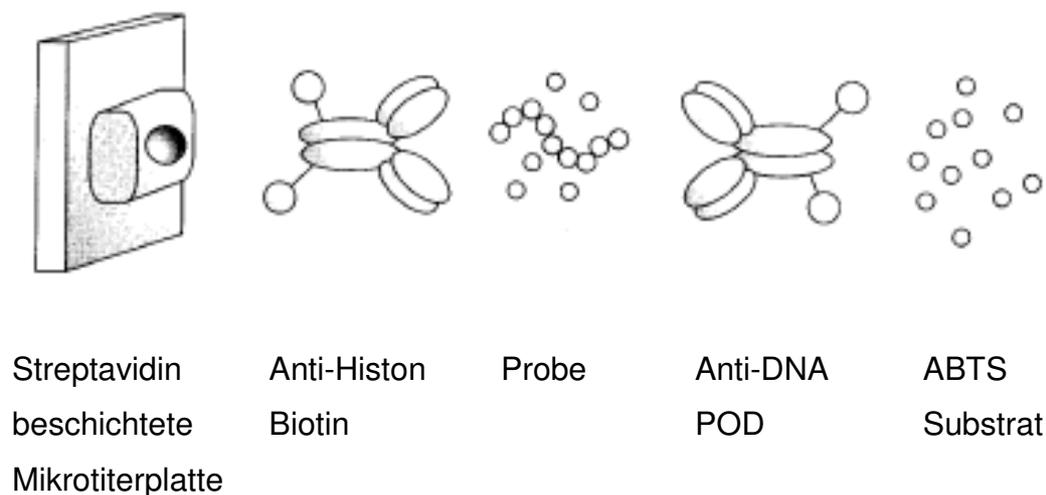
**Abb. 6: Messung der Laktatdehydrogenase.** Aus: Instruction Manual des Cytotoxicity Detection Kit [LDH] von Roche. *Prinzip:* Die LDH reduziert  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  durch Oxidation von Laktat zu Pyruvat. In einem zweiten Schritt werden enzymatisch per Diaphorase zwei Wasserstoffatome von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT(2-[4-Iodophenyl]-3-[4-Nitrophenyl]-5-Phenyltetrazoliumchlorid) übertragen. Dieses wird zu rotem Formazansalz reduziert und kann nun über seine Absorption bei 490 nm im Photometer bestimmt werden

### 2.2.7 Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA

Apoptose ist ein physiologischer Vorgang in der Zelle, der zum programmierten Zelltod führt. Ein sehr wichtiger Schritt dieses Prozesses ist die Fragmentierung der zellulären DNA in den frei zugänglichen Inter-Histon-Abschnitten so, dass histongebundene Mono- oder Oligonukleosome mit einer Länge von 180 Basenpaaren oder einem Vielfachen davon, entstehen. Diese Fragmente können quantitativ mit einem kolorimetrischen Sandwich-ELISA (Cell-Death-Detection Elisa<sup>Plus</sup>, Roche) bestimmt werden.

Zellen in 96-Well-Platten (Monolayer, Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$ ) wurden nach verschiedener Stimulation zentrifugiert (200 g, Raumtemperatur, 10 min) und dann 30 Minuten mit Lyse-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Mit einer erneuten Zentrifugation (200 g, Rumtemperatur, 10 min) wurden Zelltrümmer sowie nicht fragmentierte DNA pelletiert. Im Überstand befanden sich nun nur noch die histongebundenen Mono- oder Oligonukleosome. Davon wurden

jeweils 20 µl mit 80 µl vom Immunoreagenz in eine mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben. Nach Inkubation auf einem Schüttler (2 Stunden, bei Raumtemperatur) wurde drei mal mit Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wird das ABTS<sup>®</sup>-Substrat zugegeben und nach 10 min. Inkubation die Farbentwicklung mit dem ELISA-Photometer SLT gemessen. *Prinzip:* Ein biotinylierter anti-Histon-Antikörper (Klon H11-4) bindet die Histon-DNA-Fragmente an das Streptavidin, und ein an Peroxidase gekoppelter anti-Histon-Antikörper (Klon M-CA-33) markiert die gebundenen Fragmente zur quantitativen Detektion. Diese erfolgt als Absorptionsmessung nach Umwandlung des ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di [3-Ethylbenzthiazolinsulfonat])-Substrats bei 405 nm mittels Photometer (**Abb. 7**).



**Abb. 7: Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA.** Aus: Instruction Manual des Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> von Roche. *Prinzip:* Ein biotinylierter anti-Histon-Antikörper (Klon H11-4) bindet die Histon-DNA-Fragmente an das Streptavidin, und ein an Peroxidase gekoppelter anti-Histon-Antikörper (Klon M-CA33) markiert die gebundenen Fragmente zur quantitativen Detektion. Diese erfolgt als Absorptionsmessung nach Umwandlung des ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di [3-Ethylbenzthiazolinsulfonat])-Substrats bei 405 nm mittels Photometer

## 2.2.8 Immunhistochemische Apoptosebestimmung

Um den programmierten Zelltod auf der Ebene einzelner Zellen im intakten Monolayer zu bestimmen, fand die TUNEL (TdT [Deoxynukleotidyltransferase]-

mediated dUTP [Deoxyuridintriphosphat] Nick End Labeling) -Technik Verwendung. Bei der DNA-Fragmentierung weisen die Enden der Oligonukleosomen Einzelstrangbrüche, die so genannten „nick-ends“, auf. Deren 3'-OH Enden können sequenzunabhängig enzymatisch mit modifizierten Nukleotiden markiert und so detektiert werden.

Die Zellen, welche sich als Monolayer in einer 24 Platte auf einer Glasplatte (rund, Ø 1 cm, Gesamtzellzahl  $1 \times 10^5$ ) befanden, wurden einmal mit eiskaltem PBS -/- gewaschen, 20 min in Paraformaldehyd (3 % in PBS, pH 7,4) im Dunkeln bei Raumtemperatur fixiert, wieder einmal mit PBS -/- gewaschen und mit Triton X-100 (0,1 %) für zwei Minuten auf Eis permeabilisiert. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation im Zellkulturschrank. Mit diesem Schritt wurden die 3'-OH Enden der Einzelstrangbrüche durch die terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) mit Deoxyuridintriphosphat (dUTP) gekoppelt, welches mit Fluorescein markiert war. Nun konnten die Monolayer unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 564 nm Filter analysiert werden. F-Aktin wurde mit Rhodamin-markiertem Phalloidin (1,4 µg/ml) markiert.

Um eine fotografisch besser dokumentierbare Färbung zu erhalten, wurden die Zellen noch mit einem mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelten anti-Fluorescein-Antikörper (Spezies: Schaf) inkubiert. Durch die Umsetzung des Fast-Red<sup>®</sup>-Substrats (Boeringer Mannheim) ergaben sich lichtmikroskopisch gut dokumentierbare DNA-Fragment-Färbungen in apoptotischen Zellen ([Hippenstiel S 2002](#)).

#### 2.2.9 Messung der Caspasenaktivität mittels kolorimetrischen Protease Assay

Apoptose ist das Resultat einer programmierten intrazellulären Kaskade, die genetisch festgelegt ist. Einer der Mechanismen, der eine wichtige Rolle in der Apoptose spielt, ist die Aktivierung von intrazellulären Cysteinproteasen, genannt Caspasen. Diese sind verantwortlich für eine ganze Reihe biochemischer und morphologischer Veränderungen.

Die enzymatische Aktivität der Caspasen kann mit dem Kolorimetrischen „Caspase Protease-Assay“ quantitativ gemessen werden. Die Zellen (Schale

mit einem Durchmesser von 10 cm mit ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden zuerst lysiert, dann zentrifugiert (1 Minute bei 4 °C und 10.000 rpm). Der Überstand wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und eine Proteinmengenbestimmung nach Bradford (siehe auch Western Blot) durchgeführt. Anschließend wird jede Probe durch Zugabe von Lysepuffer auf 1000-2000 µg/250 µl Protein eingestellt. zweimal Reaktionspuffer (je 250µl pro Wert) wird mit DTT versetzt (je 2,5 µl pro/Wert, d.h. 1:100 verdünnt) und anschließend mit 50 µl Probe plus 50 µl zweimal Reaktionspuffer mit DTT auf die Mikrotiterplatte geben (also insgesamt 100 µl pro Wert). Danach werden 5 µl des jeweiligen Caspasensubstrates zugeben. Daraufhin erfolgt eine 90 minütige Inkubation bei 37 °C im Brutschrank, Schluß wird die Absorption bei 405 nm im Spektralphotometer gemessen.

*Prinzip:* Die Caspasen können die Aminosäuresequenzen VDVAD (Caspase-2), DEVD (Caspase-3), VEID (Caspase-6) IETD (Caspase-8) und LEHD (Caspase-9) erkennen, die somit als Substrat dienen. Die Substrate im Assay zur Messung der Enzymaktivität sind künstliche Peptide, die an ihrem C-Terminus mit para-Nitroaniline (pNA) markiert sind. Die Farbentwicklung nach der Spaltung des Substrates durch die aktiven Caspasen kann mittels eines Mikrotiter Reader bei einer Wellenlänge von 400 oder 405 nm gemessen werden. Das Ergebnis kann dann als Vielfaches der Negativkontrolle dargestellt werden.

## 2.2.10 Western-Blot

Mit der SDS-Gelelektrophorese wird das Gesamtprotein oder einzelne Fraktionen einer Probe gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die anschließende Übertragung des Proteins auf eine Nitrozellulosemembran ermöglicht die Immundetektion der Proteine durch spezifische Antikörper.

### 2.2.10.1 Extraktion des löslichen Gesamtproteins

Zellen auf einer Schale mit einem Durchmesser von 10 cm (ca.  $5 \times 10^6$  Zellen) wurden einmal mit 10 ml eiskaltem PBS +/- gewaschen und mit 40 µl Lysepuffer abgekratzt. Das Lysat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für drei

Minuten bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert, danach 10 µl des Überstandes zur Bradford Proteinmengenbestimmung abgenommen und der Rest vom Überstand bei -20°C weg gefroren.

#### *2.2.10.2 Proteinmengenbestimmung nach Bradford*

Die Proteinquantifizierung nach der Bradford-Methode mittels des BioRad Protein-Assays (BioRad) wurde folgendermaßen durchgeführt: Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue® verlagert bei Bindung an basische und aromatische Aminosäuren sein Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm, folglich kam es nach fünfminütiger Inkubation von 950 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung mit 10 µl der Proteinlösung in einer 1 ml Küvette zum Farbumschlag von grün-braun zu einem unterschiedlich intensiven Blau. Nun konnte im Spektralphotometer die Absorption bei 595 nm gemessen und anhand einer BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardkurve (1-8 µl einer Stocklösung mit 1 mg/ml Protein) die Proteinkonzentration bestimmt werden.

#### *2.2.10.3 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese*

In der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-Page) bindet das anionische Detergens SDS mit einem Massenverhältnis von 1,4:1 an das Polypeptidgerüst der Proteine und verleiht ihnen eine negative Außenladung proportional zu ihrer Länge. Im denaturierten Gel wandern die Proteine zur Anode und werden nach Durchlaufen des Sammelgels im Trenngel gemäß ihrem Molekulargewicht getrennt. Als prozentuale Zusammensetzung des Gels wurde gemäß der erwarteten Proteingröße für PARP (85 kD) 7,5 %, bzw. für ERK2, p38, Bax, Bcl-2, BID, Caspase 3, -6, -8, -9 (20-60 kD) 10 % gewählt.

Jeweils 40 µl der Probe wurden 1:1 mit Gelladepuffer versetzt und für 3 Minuten unter Schütteln auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen erfolgte das Auftragen in die Geltaschen. Zur Größenbestimmung wurde ein Amersham Rainbow high-Größenmarker in eine separate Tasche aufgetragen. Danach erfolgte die Elektrophorese in BioRad Mini-Gel-Kammern im Lämmli-Puffer-System bei 100 Volt Stromspannung für 15 Minuten und 120 Volt für 1 Stunde und 30 Minuten.

#### *2.2.10.4 Protein-Blot*

Um die aufgetrennten Proteine mit dem primären Antikörper besser zu erreichen, müssen die Proteine auf eine Polymerschicht übertragen werden. Dies geschieht, indem die Proteine, wegen ihrer negativen Ladung in Richtung Anode wandern und damit horizontal zur Gel-Laufrichtung auf eine geeignete Membran geblottet werden.

Das Trenngel wurde vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen, für 15 Minuten im Blotting-Puffer equilibriert und auf eine ebenfalls puffergetränkte Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham) aufgerollt. Danach wurden vorsichtig die störenden Luftblasen entfernt. Auf beiden Seiten des Sandwich wurden nun noch vier puffergetränkte Lagen 3 M-Whatman-Papiere (Whatman) und die Blotvorrichtung (Transblot, München) gemäß der Herstellerangaben mit zirkulierendem eiskaltem Blotpuffer in die Kammer eingesetzt. Daraufhin erfolgte der Proteintransfer bei 100 Volt und maximaler Stromstärke für 1 Stunde bei 4 °C. Um den gelungenen Proteintransfer und die gleichmäßige Spurbeladung zu kontrollieren, wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau-S-Lösung inkubiert und somit die Proteine angefärbt. Durch Waschen mit Aqua bidest wurden die Proteine wieder entfärbt.

#### *2.2.10.5 Antikörperexposition*

Zuerst wurden unspezifische Bindungen der Membran durch eine einstündige Inkubation im Block-Puffer bei Raumtemperatur abgesättigt. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C unter Schwenken mit dem primären Antikörper, der gegen das Zielprotein gerichtet war, im Block-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBS -/- wurde der Blot für eine Stunde ebenfalls im Block-Puffer mit dem sekundären Antikörper, der eine mit Cyanine 5.5-Osu beziehungsweise der andere mit IRDye 800 (MW 1067) gekoppelten Antikörper gegen IgG der Spezies des primären Antikörpers inkubiert. Die optimale Antikörperverdünnung wurde in Vorversuchen für alle primären Antikörper mit 1:1000 und für sekundären mit 1:2000 ermittelt. Wieder

erfolgte dreimaliges Waschen mit PBS +/- für jeweils fünf Minuten. Anschließend wurde gescannt und das Bild weiter mit dem Odyssey® Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) bearbeitet. IRDye 800 hat eine Lichtemission bei 806 nm und eine Absorption bei 778 nm. Cyanine 5.5 hat eine Lichtemission bei 703 nm und eine Absorption bei 678 nm.

#### 2.2.11 Statistische Auswertung

Abhängig von der Anzahl der verschiedenen Gruppen und der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte, wurde die Analyse als Ein-Weg-ANOVA (Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben) durchgeführt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als signifikant gewertet.

### 3 Ergebnisse

In dieser Studie wurden Lungenalveolarepithelzellen vom Typ II (A549) und Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) mit *Streptococcus pneumoniae* (D39 und R6x) infiziert. Man kann je nach koloniebildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml) schon ab 2 Stunden morphologische Veränderungen unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachten. Mit zunehmender Infektionsdauer starben mehr und mehr Zellen ab, die Zellen immer runder wurden, um sich schließlich vom Boden zu lösen.

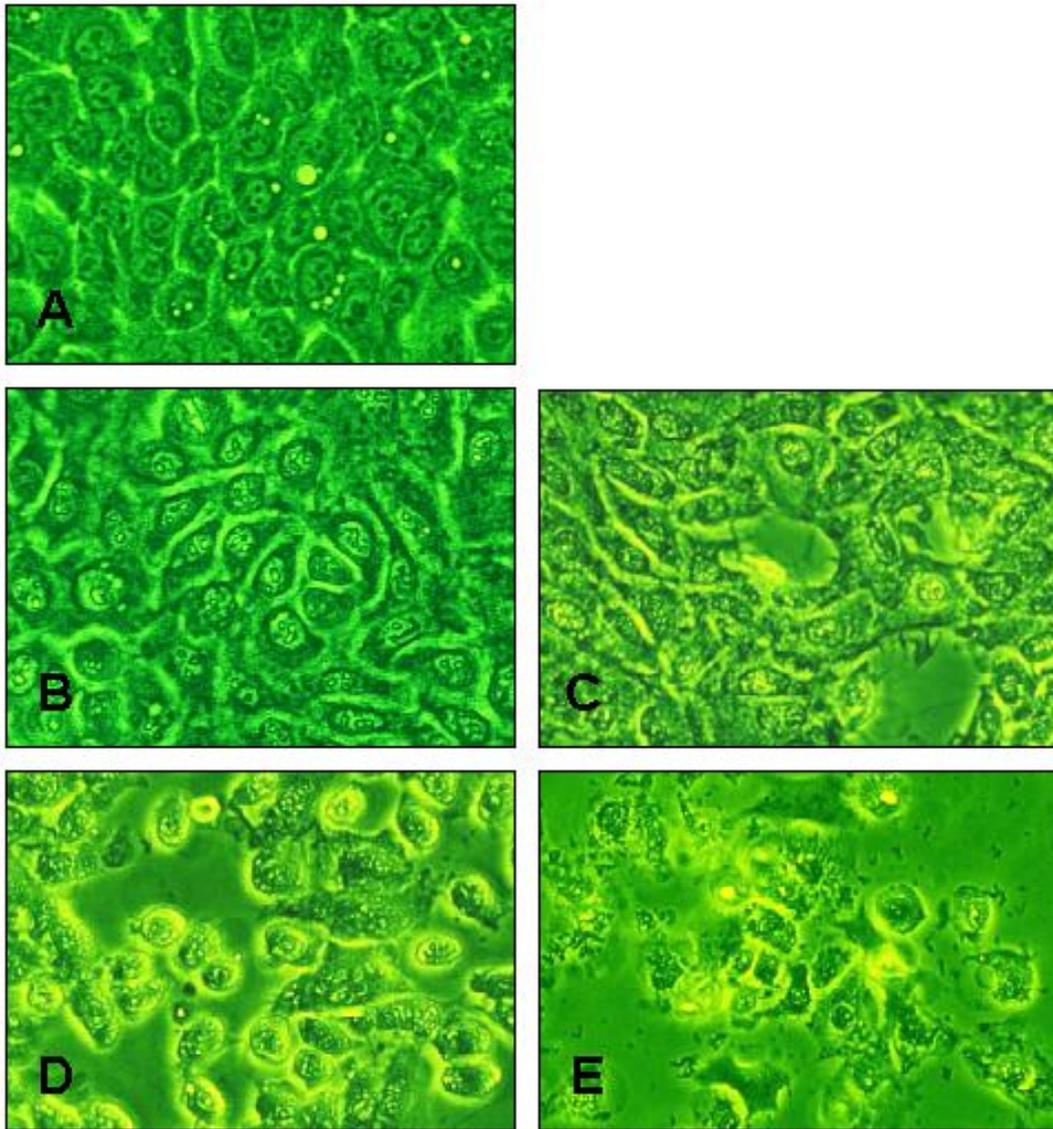
#### 3.1 Vorversuche

##### 3.1.1 Zeit- und dosisabhängige morphologische Veränderung der A549 und BEAS-2B Zellen nach Infektion mit Pneumokokken.

Nach Infektion der Epithelzellen (A549 und BEAS-2B) mit unterschiedlichen Dosen der Pneumokokken (CFU/ml) konnte man unter dem Phasenkontrastmikroskop morphologische Veränderungen bis hin zum Zelluntergang beobachten. Um diese Veränderung der infizierten Zellen besser beurteilen und einordnen zu können, wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop bewertet. **Tab. 1.** und **Abb. 3.**

**Tab. 1:** Beurteilung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop.

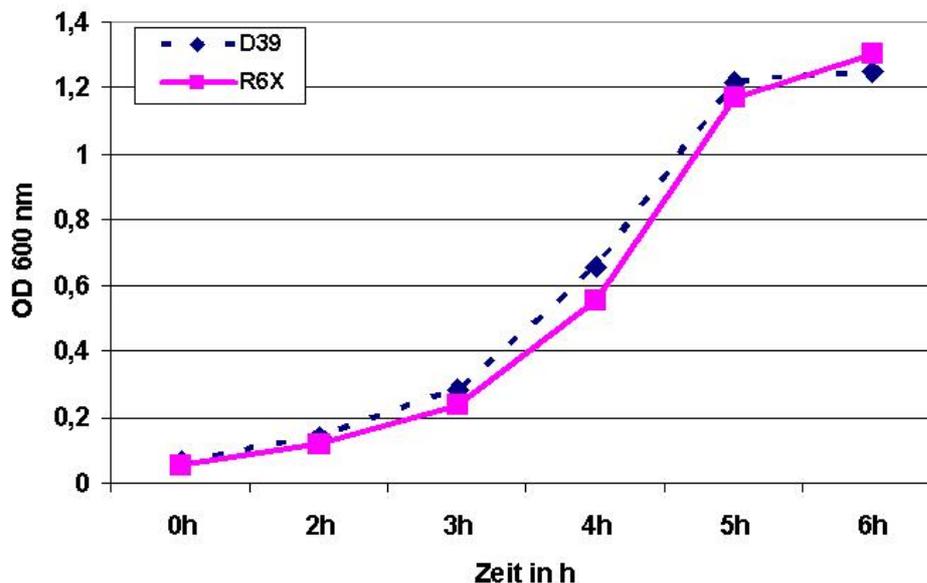
1	Konfluenten Monolayer ohne Löcher. Große, polygonale Zellen.
2	Konfluenten Monolayer ohne Löcher. Zellen sehen runder und kleiner aber immer noch gut aus.
3	Konfluenten Monolayer ohne Löcher. Vermehrt Granula im Zytoplasma. (Zellen wirken gestresst).
4	Monolayer mit kleinen Löchern. Zellwand ist unscharf. Abstand zwischen Zellen wird größer.
5	Kein Monolayer mehr, große Löcher im Zellrasen.
6	Kleine Zellinseln. Der Hauptteil der Zellen schwimmt im Medium.



**Abb. 8: Beurteilung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop.** Alveolarepithelzellen vom Typ II (A549). Bewertung: A = 2, B = 3, C = 4, D = 5 und E = 6. In diesem Fall ist A der Leerwert und B - E Infektion der Zellen mit R6x ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) nach 8 h (B), 12 h (C), 16 h (D) und 24 h (E). Photos wurden mit der Spiegelreflexkamera (Olympus) bei einer Vergrößerung 40.000x unter dem Phasenkontrastmikroskop gemacht.

### 3.1.2 Wachstum von *Streptococcus pneumoniae*

Die Pneumokokkenstämme D39 und R6x wurden für mehrere Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) in Bacto™ Todd Hewitt Broth + 0,5 % Hefe Extrakt wachsen gelassen. Zum Zeitpunkt 0 und anschließend stündlich ist im Spektralphotometer Uvicon UV 860 bei 600 nm die Optische Dichte gemessen worden. Die Bakterien durchlaufen die typischen Wachstumsphasen: latente, logarithmische und stationäre Phase (**Abb.9**). Für die Infektionsversuche wurden die Pneumokokken in ihrer mittlogarithmischen Wachstumsphase verwendet.

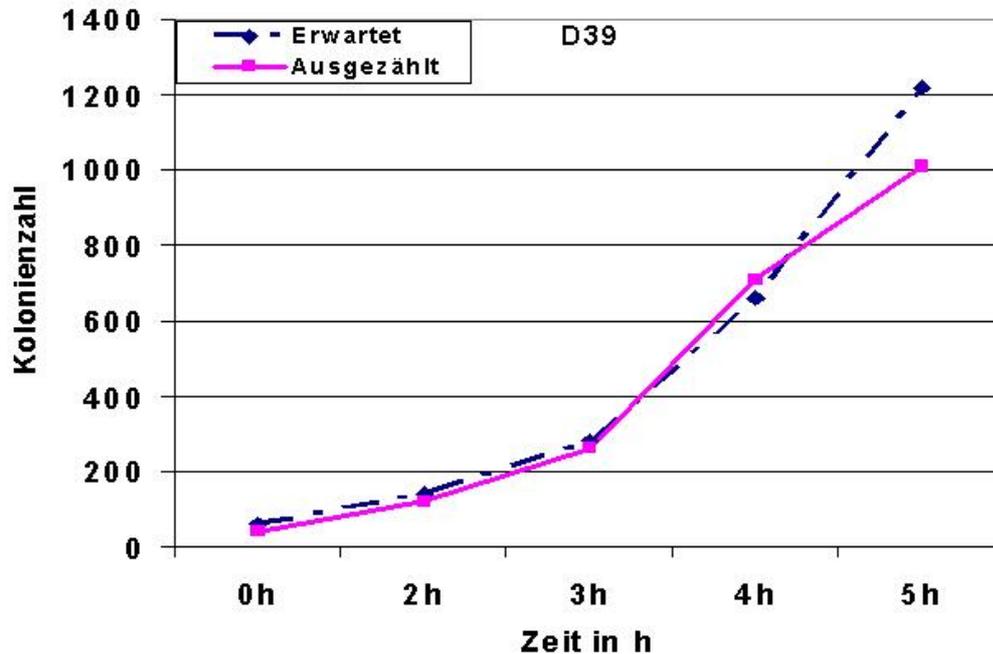


**Abb. 9: Wachstumskurve.** Wachstum des *Streptococcus pneumoniae* (D39 und R6x) in THY + 0,5 % YE bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Optische Dichte (OD) wurde stündlich bei 600 nm gemessen.

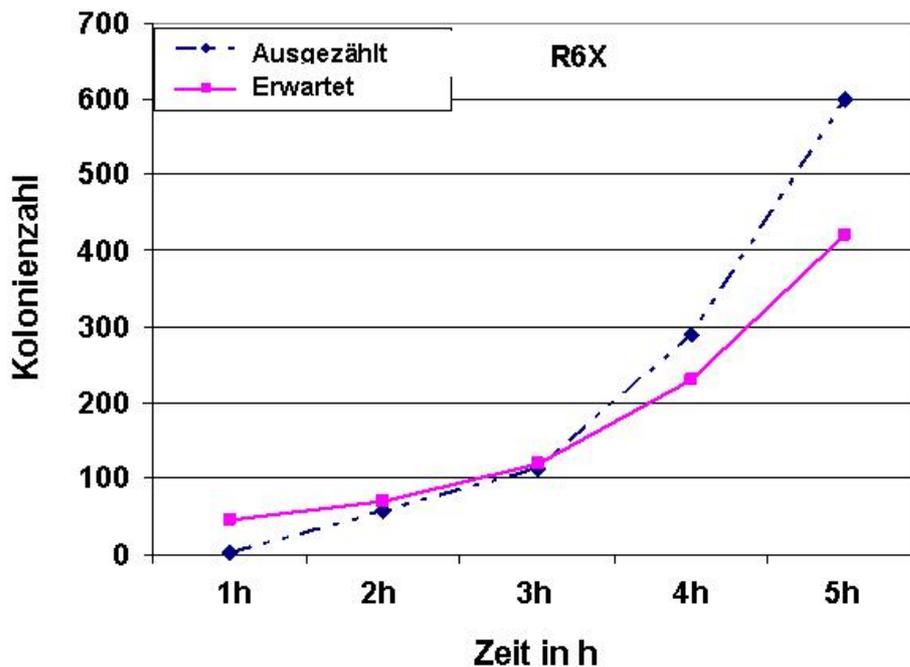
### 3.1.3 Pneumokokkeninfektionskonzentration

Um festzustellen, wie viele koloniebildende Einheiten (CFU) sich in einem ml befanden, sind 100 µl der Boullion mit Bakterien bei unterschiedlichen ODs auf Columbia Agar-Platten mit 5 % Schafsblut (BD) ausgestrichen und nach 15 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) ausgezählt worden. Eine OD von 0,1 entsprach dabei einer Konzentration von  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Nach verschiedenen Austestungen wurde für die Bakterienstämme D39 und R6x bestätigt, dass eine OD von 0,1 bei 600 nm ca.  $1 \times 10^8$  CFU/ml entspricht. Zur Kontrolle wurden

beide Stämme stündlich ausgestrichen, für 15 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) stehen gelassen und anschließend ausgezählt. Wie man in **Abb. 10** und **11** sehen kann entsprechen die ausgezählten Kolonien den errechneten Kolonienzahlen.



**Abb. 10: Kolonienanzahl des D39 Pneumokokkenstammes.** Die in THY + 5 % YE wachsenden D39 Pneumokokken wurden zu jeder Stunde ausgestrichen und ausgezählt. Die ausgezählten Kolonien sind als Kurve dargestellt (CFU pro 100 µl). Die gestrichelte Kurve ist die errechnete Kurve in der Annahme, dass eine OD von 0,1 (bei 600 nm)  $1 \times 10^8$  CFU/ml entspricht.

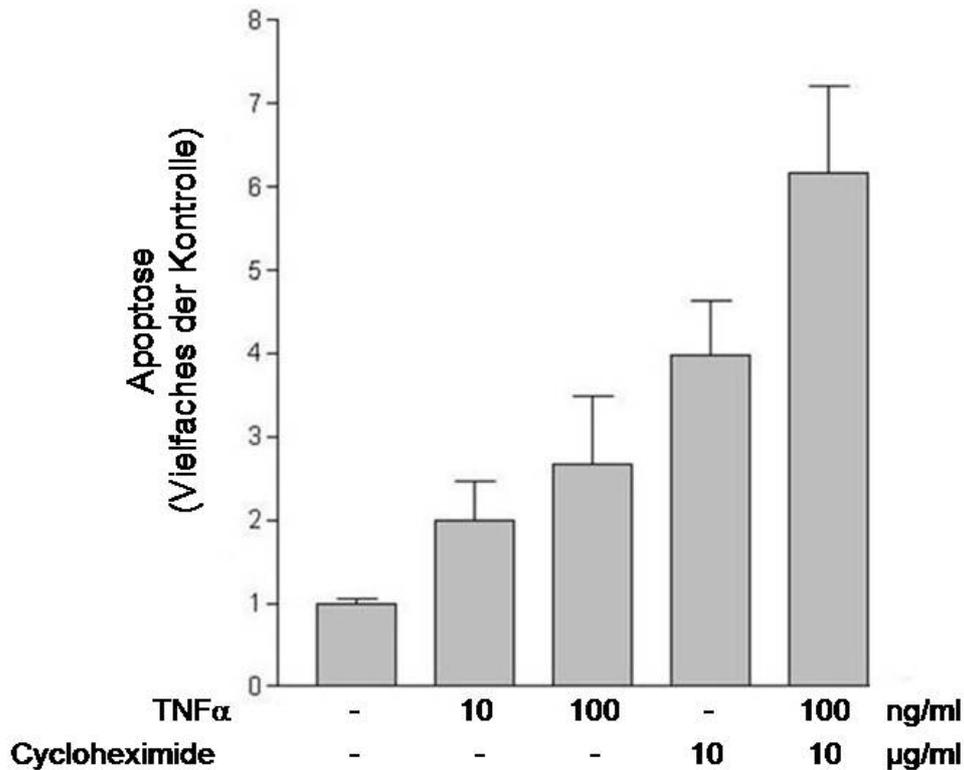


**Abb. 11: Kolonienanzahl des R6x Pneumokokkenstammes.** Die in THY + 5% YE wachsenden R6x Pneumokokken wurden zu jeder Stunde ausgestrichen und ausgezählt. Die ausgezählten Kolonien sind als Kurve dargestellt (CFU pro 100µl). Die gestrichelte Kurve ist die errechnete Kurve in der Annahme, dass eine OD von 0,1 (bei 600 nm)  $1 \times 10^8$  CFU/ml entsprechen.

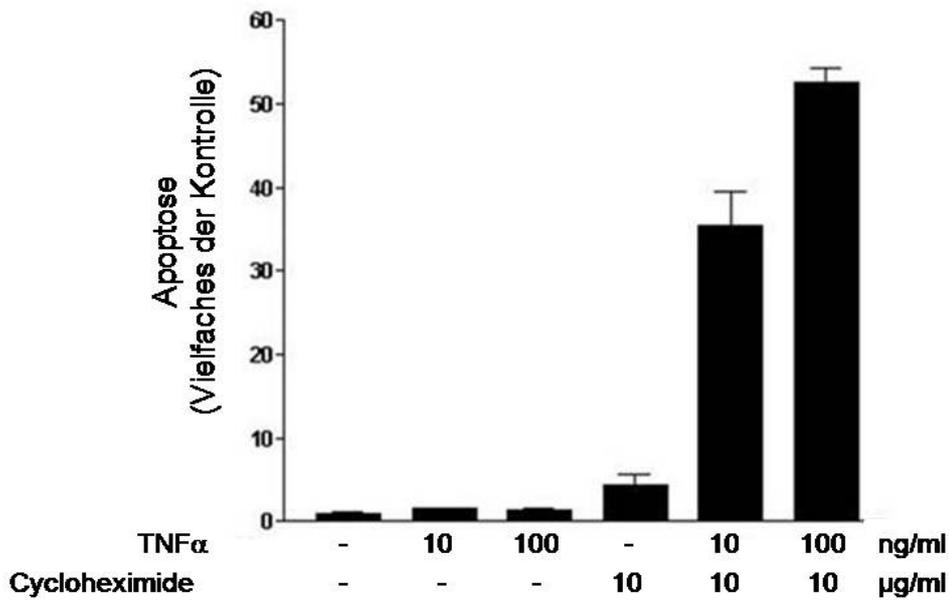
#### 3.1.4 Positivkontrollen (A549 und BEAS-2B Zellen)

Als Positivkontrollen für die Messung der Apoptose wurden  $\text{TNF}\alpha$  und Cycloheximide (CHX) verwendet. Es ist bekannt, dass  $\text{TNF}\alpha$  alleine Apoptose in verschiedenen Zelltypen induzieren kann. In Kombination mit CHX wird dieser Effekt zusätzlich verstärkt. A549 und BEAS-2B Epithelzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von  $\text{TNF}\alpha$  und CHX stimuliert. Nach 16 Stunden Stimulation wurde der Anstieg der histonassoziierten DNA Fragmente mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Kit von Roche, als Maß für Apoptose, gemessen. (**Abb 12 und 13**). Die Freisetzung des LDH aus dem Zytoplasma als Nekrose-Marker wurde mit dem Cytotoxicity Detection Kit von Roche gemessen. Der Anstieg der Histon-assoziierten-DNA Fragmente und die Freisetzung des LDH auf höchstens 40 % der Postivkontrolle (vollständige Lyse von unstimulierten Zellen; Daten nicht gezeigt) bestätigen die Apoptosewirkung

beider Substanzen. Für alle weiteren Versuche wurde TNF $\alpha$  100 ng/ml + CHX 10  $\mu$ g/ml als Positivkontrolle verwendet.



**Abb. 12: Apoptoserate bei BEAS-2B Epithelzellen nach Stimulation mit TNF  $\alpha$  und Cycloheximide (CHX).** BEAS-2B Epithelzellen wurden mit 10 oder 100 ng/ml TNF $\alpha$  und 10  $\mu$ g/ml CHX stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Mono- und Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) gemessen. Werte sind als Vielfaches des Leerwertes (unstimulierte Zellen) angegeben. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen.



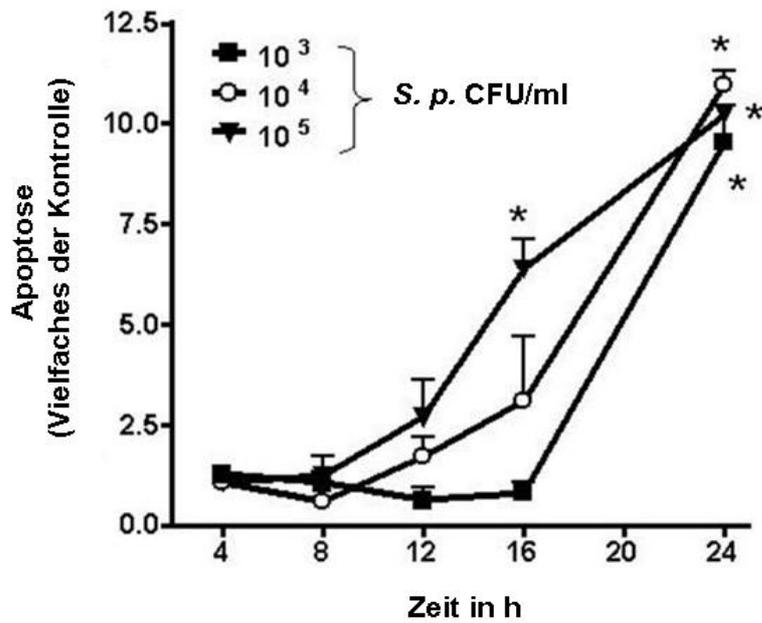
**Abb. 13: Apoptoserate bei A549 Epithelzellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und Cycloheximide (CHX).** A549 Epithelzellen wurden mit 10 oder 100 ng/ml TNF $\alpha$  und 10  $\mu$ g/ml CHX stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Mono- und Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) gemessen. Werte sind als Vielfaches des Leerwertes (unstimulierte Zellen) angegeben. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen.

## 3.2 Pneumokokken und Alveolarepithelzellen

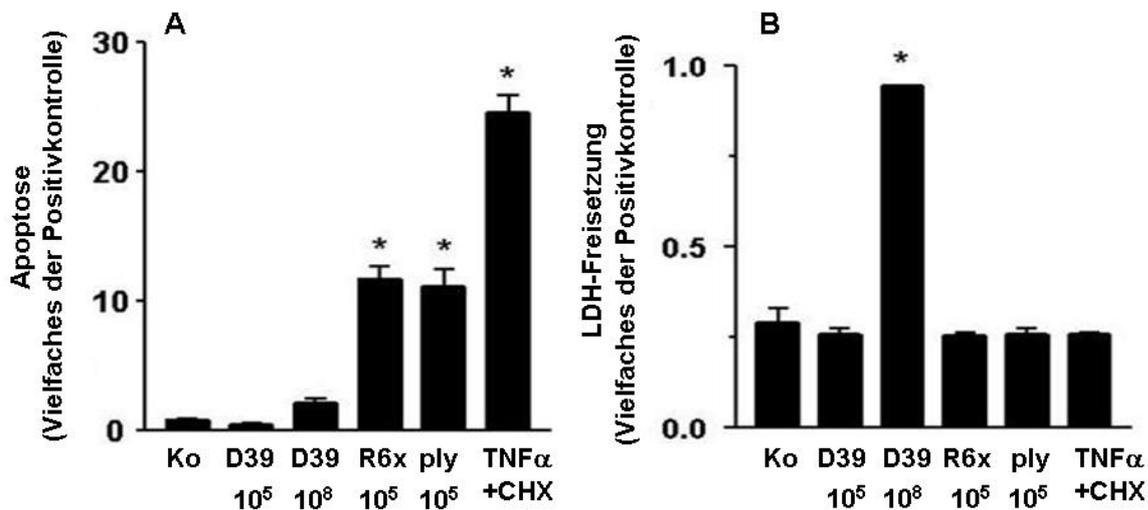
Nach Infektion der Alveolarepithelzellen Typ II (A549) mit Pneumokokken beobachtet man unter dem Phasenkontrastmikroskop eine dosis- und zeitabhängige morphologische Veränderung bis hin zur völligen Zerstörung der Zellen (**Abb. 8.**).

### 3.2.1 D39 führt zur Nekrose. R6x induziert Apoptose

Nach Infektion von Alveolarepithelzellen vom Typ II (A549) mit dem bekapselten D39 (Typ 2 nach der dänischen Nomenklatur) und dem unbekapselten R6x Pneumokokkenstamm konnte ab der 12. Stunde ein Anstieg der Mono- und Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) gemessen werden. (**Abb.14**). Die Messung der Laktadehydrogenase LDH-Aktivität als Marker für Nekrose mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche) zeigte, dass der bekapselte D39 Pneumokokkenstamm zur Nekrose, der unbekapselte R6x aber zur Apoptose führte. Bereits eine Dosis von  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x Pneumokokken zeigt einen deutlichen Anstieg der freien Nukleosomen. Demgegenüber führt die gleiche Dosis des D39 Stamms zu keiner großen Veränderung. Eine Anhebung der Dosis auf  $1 \times 10^8$  CFU/ml führte neben einer Erhöhung der Oligonukleosomen auch zur Steigerung der LDH-Aktivität (**Abb. 15**).

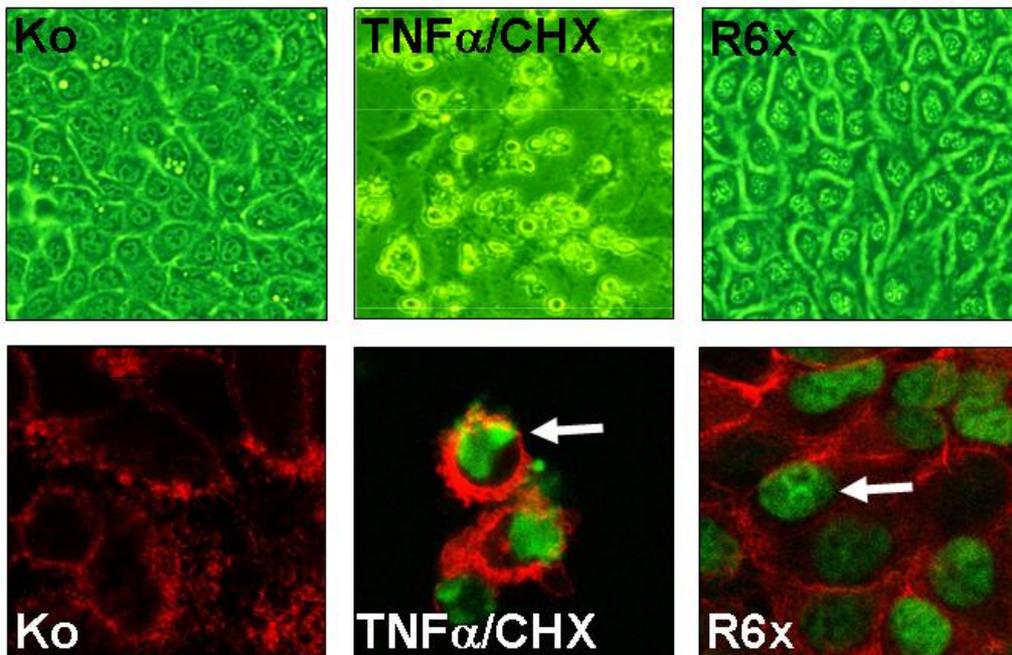


**Abb. 14: Zeit- und dosisabhängige Apoptoseinduktion.** A549 Alveolarepithelzellen vom Typ II wurden mit R6x Pneumokokken in einer Konzentration  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml infiziert. Gemessen wurden Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) (hier als Vielfaches der Kontrolle angegeben) zu den Zeiten 4, 8, 12, 16 und 24 Stunden. Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 15: A549 Alveolarepithelzellinfektion mit diversen Pneumokokkenstämmen.** A549 Alveolarepithelzellen vom Typ II wurden mit D39, R6x und R6x $\Delta$ ply Pneumokokken infiziert. Gemessen wurden Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) (hier als Vielfaches der Kontrolle angegeben) **A** und LDH-Aktivität als Marker für Nekrose mit dem Cytotoxicity Detection Kit (Roche) **B**. TNF $\alpha$  10 ng/ml + CHX 10  $\mu$ g/ml = Positivkontrolle. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Um die Ausprägung der DNA-Fragmentierung nach Infektion mit R6x-Pneumokokken auch auf nuklearer Ebene sehen zu können, wurden Alveolarepithelzellen (A549) auf Glasplättchen mit einem Durchmesser von 1 cm gepflanzt und anschließend mittels der TUNEL-Technik markiert, um sie so der fluoreszenzmikroskopischen Analyse (564 nm Filter) zugänglich zu machen. Während bei nicht infizierten Zellen kaum Zellkerne angefärbt wurden, waren bei einer Infektion der A549-Zelle mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken für 12 Stunden fast alle Zellkerne grün angefärbt. Zum Vergleich wurde ebenfalls für 12 Stunden TNF $\alpha$  10 ng/ml + Cycloheximide (CHX) 10  $\mu$ g/ml genommen. Hier sieht man auch eine Anfärbung fast aller Zellkerne. **Abb. 11.**

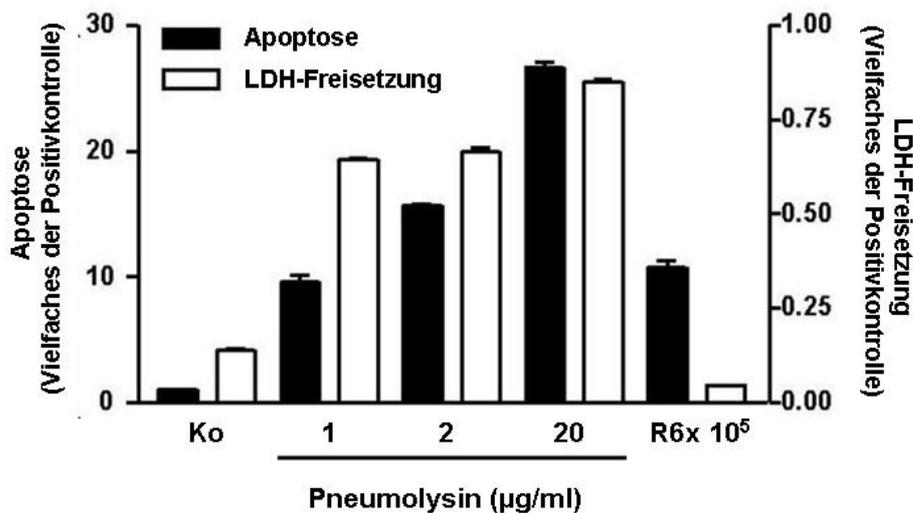


**Abb. 16: Licht- und fluoreszenzmikroskopische Apoptosedarstellung.**  
**Obere Reihe:** Lichtmikroskopiebilder von unbehandelten (Kontrolle = Ko), stimulierten mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10  $\mu$ g/ml CHX (Cycloheximide) und infizierten Alveolarepithelzellen mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x Pneumokokken. **Untere Reihe:** Fluoreszenzmikroskopiebilder von unbehandelten, stimulierten mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10  $\mu$ g/ml CHX und infizierten Alveolarepithelzellen mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x. Markierung der Zellkerne (DNA-Fragmente) mittels TUNEL-Methode. Pfeile zeigen auf angefärbte und kondensierte DNA-Fragmente. Bilder zeigen repräsentative Ausschnitte von drei unterschiedlichen Versuchen.

### 3.2.2 Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spielen keine signifikante Rolle bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Alveolarepithelzellen Typ II (A549)

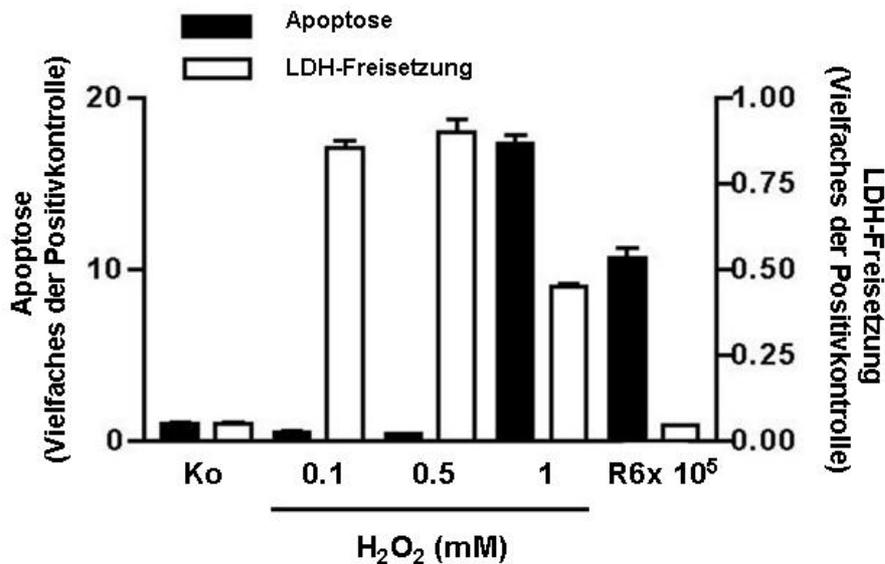
Um die Rolle des wichtigen Pneumokokken-Toxins Pneumolysin zu überprüfen, wurde der Bakterienstamm R6x $\Delta$ *ply* (Pneumolysin-Deletionsmutante von R6x) verwendet. Dieser Stamm erzeugte nach 16 Stunden bei der Dosis von  $1 \times 10^5$  CFU/ml eine ähnliche Apoptoserate wie der R6x Stamm in gleicher Konzentration hervor. (**Abb. 15**). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass aufgereinigtes Pneumolysin in höheren Dosen zur Nekrose führt. A549

Epithelzellen wurden mit 1, 2 und 20 µg/ml stimuliert und nach 16 Stunden die Bildung von DNA-Fragmenten (Apoptose Kit von Roche) und die LDH-Aktivität (Cell Cytotoxicity Kit von Roche) gemessen. (**Abb. 17**). Zwar stiegen die Oligonuklesomen an, aber der gleichzeitige Anstieg der LDH-Aktivität auf fast 75% der Positivkontrolle (lysierte unbehandelte A549-Zellen) schon bei einer Dosis von 1 µg/ml deutet auf Nekrose hin.



**Abb. 17: Alveolarepithelzellstimulation mit Pneumolysin.** Alveolarepithelzellen (A549) Typ II wurden mit 1, 2 und 20 µg/ml aufgereinigtem Pneumolysin stimuliert und nach 16 Stunden die Bildung von DNA-Fragmenten (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> von Roche) und die LDH-Aktivität (Cytotoxicity Detection Kit von Roche) gemessen. Positivkontrolle für die LDH-Aktivität sind lysierte unbehandelte A549-Zellen. Zum Vergleich eine Stimulation mit R6x Pneumokokken. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen.

Gleichzeitig wurde auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ein weiterer wichtiger Pathogenitätsfaktor der Pneumokokken, untersucht. Nach Stimulation der A549 Epithelzellen mit 0,1; 0,5 und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 16 Stunden konnte gezeigt werden, dass es hier ebenfalls zur Nekrose kommt. (**Abb. 18**).

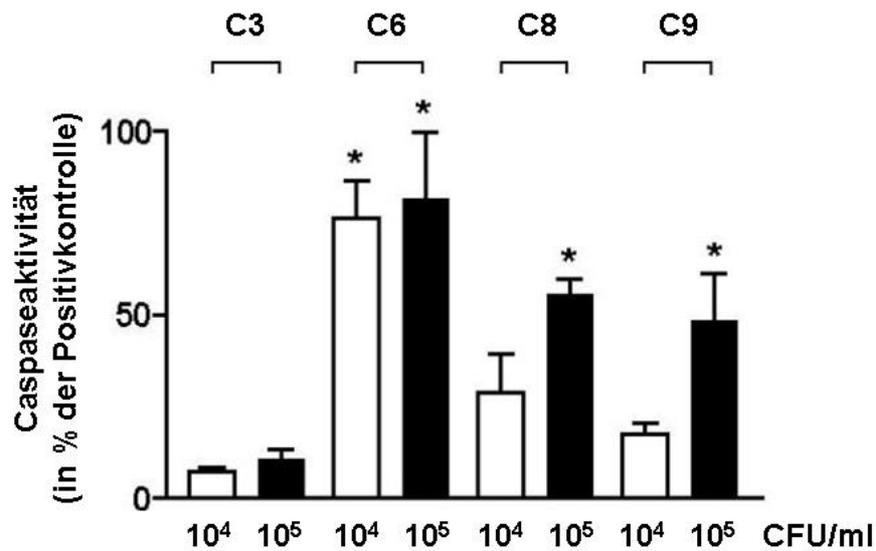


**Abb. 18: Alveolarepithelzellstimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Alveolarepithelzellen (A549) Typ II wurden mit 0,1, 0,5 und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimuliert und nach 16 Stunden die Bildung von DNA-Fragmenten (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> von Roche) und die LDH-Aktivität (Cytotoxicity Detection Kit von Roche) gemessen. Positivkontrolle für die LDH-Aktivität sind lysierte unbehandelte A549-Zellen. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen.

### 3.2.3 Caspasenaktivität spielt eine wichtige Rolle in der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Alveolarepithelzellen

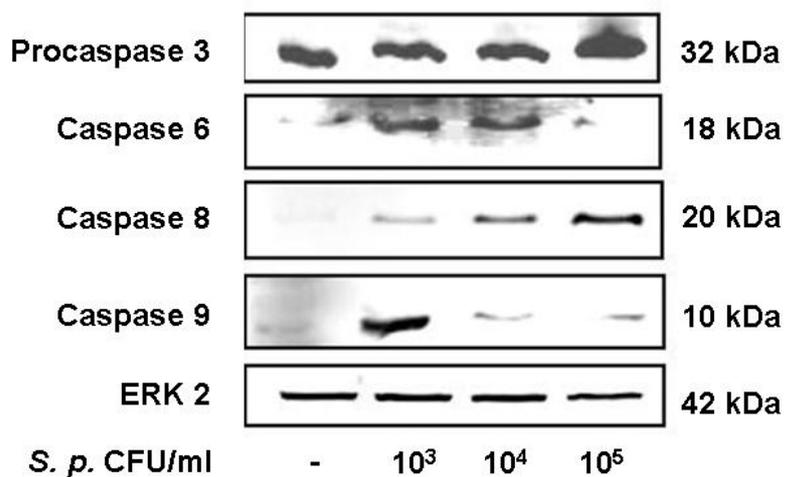
Proteasen spielen eine wichtige Rolle in der Ausführung der Apoptose. Mehrere solcher Enzyme sind bekannt, von denen die Familie der Caspasen am längsten und besten erforscht ist. Da die Caspasen in der klassischen Apoptose eine zentrale Rolle spielen, untersuchten wir als erstes, ob und welche Caspasen nach einer Pneumokokkeninfektion aktiviert werden.

Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II wurden mit  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x infiziert. Nach 8 Stunden wurde mit dem Caspase Colorimetric Protease Assay von ApoTarget die Aktivierung der Caspasen 3, 6, 7, 8 und 9 gemessen. Wie man in **Abb. 19** sehen kann, werden die Initiator-Caspasen 8, 9 und die Effektor-Caspase 6 aktiviert. Demgegenüber werden die Effektor-Caspasen 3 und 7 (nicht gezeigt) nicht aktiviert.



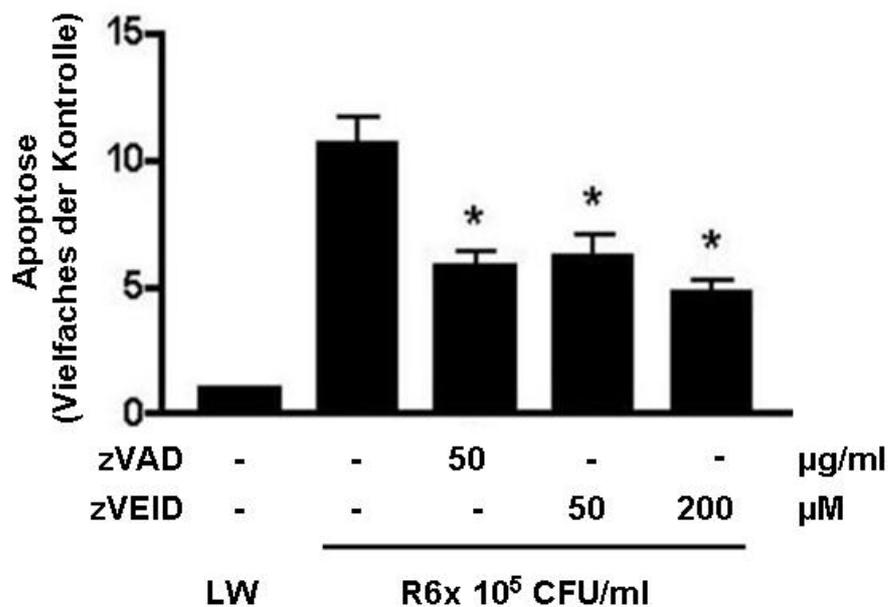
**Abb. 19: R6x Pneumokokkeninfektion aktiviert die Caspasen 6, 8, 9.** Alveolarepithelzellen wurden mit  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken infiziert. Nach 8 Stunden wurde die Aktivierung der Caspasen mit dem Caspase Colorimetric Protease Assay von ApoTarget gemessen. Die Positivkontrolle war  $10 \text{ ng/ml TNF}\alpha + 10 \text{ }\mu\text{g/ml CHX}$ . Alle Werte werden in Prozent der Positivkontrolle angegeben. Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle

Die Aktivierung der Caspasen 8, 9 und 6 konnte mit dem Western Blot bestätigt werden. Ebenso die Nichtaktivierung der Caspase 3. In **Abb. 20** ist die inaktive Form der Caspase 3 (32 kDa) gezeigt. Von den Caspasen 9, 8, 6 sind jeweils die aktiven Produkte gezeigt.



**Abb. 20: R6x Pneumokokken aktivieren die Caspasen 9, 8, 6, nicht aber die Caspase 3.** Alveolarepithelzellen (A549) wurden mit  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken infiziert. Nach 8 Stunden wurde das gesamte lösliche Protein extrahiert und mit der SDS-PAGE aufgetrennt. ERK 2 (42 kDa) wurde als Beladungskontrolle genommen. Gezeigt sind repräsentative Blots von vier verschiedenen Versuchen.

Um herauszufinden, welche Rolle die Caspasenaktivierung bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose spielt, inhibierten wir alle Caspasen mit dem Pancaspasen-Inhibitor I (Z-VAD-FMK) und speziell Caspase 6 mit dem Caspase 6 Inhibitor (Ac-VEID-FMK). Wie man in **Abb. 21** sehen kann, wurde die Apoptoserate um 50-60 % gesenkt.

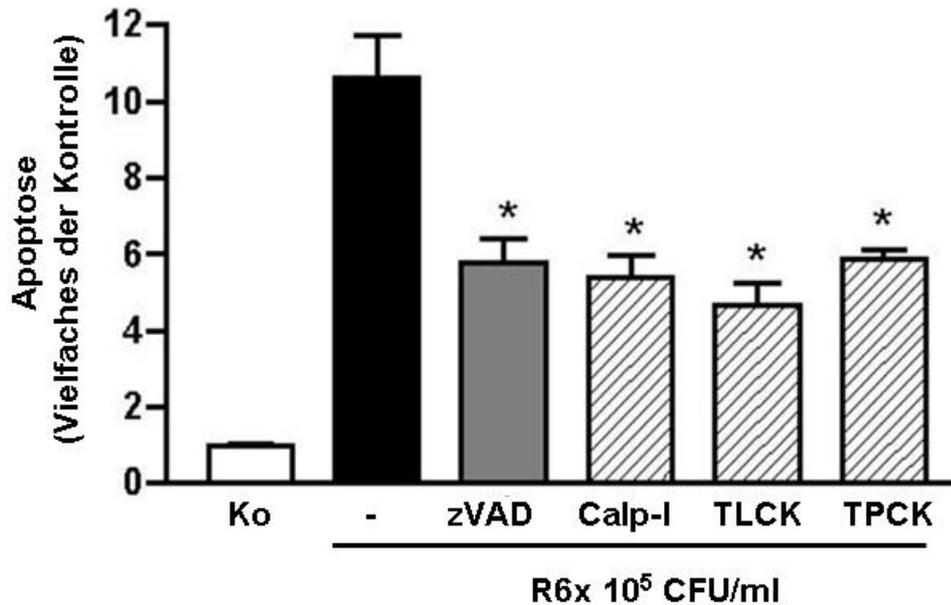


**Abb. 21: Pancaspase-Inhibitor I (Z-VAD-FMK) und Caspase-6-Inhibitor (Ac-VEID-FMK) reduzieren die pneumokokkeninduzierte Apoptoserate.** Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II wurden mit dem Pancaspase-Inhibitor I (50 µg/ml, Z-VAD-FMK) und dem Caspase-6-Inhibitor (50 und 200 µM, Ac-VEID-FMK) eine Stunde vor Infektion mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Bildung von Oligonukleosomen (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>) gemessen. Positivkontrolle sind unbehandelte A549-Zellen, die mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken infiziert wurden. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur *Streptococcus pneumoniae* Infektion ohne Inhibitoren.

### 3.2.4 An der pneumokokkeninduzierten Apoptose sind auch Calpain und die Serinproteasen beteiligt

Da eine Caspaseninhibition die pneumokokkeninduzierte Apoptose nicht vollständig verhinderte, wurde nach anderen Proteasen gesucht. Eine Inhibition von Calpain mit dem Calpain Inhibitor III (Calbiochem) reduzierte die pneumokokkeninduzierte Apoptose ebenfalls nur um 50 %. Darauf wurden noch zusätzlich Serinproteasen mit dem Chymotrypsin Inhibitor N<sup>α</sup>-Tosyl-Phe-Chloromethyl Ketone (TPCK, Calbiochem) und dem Trypsinproteasen Inhibitor N<sup>α</sup>-Tosyl-Lys-Chloromethyl Ketone, Hydrochloride (TLCK, Calbiochem)

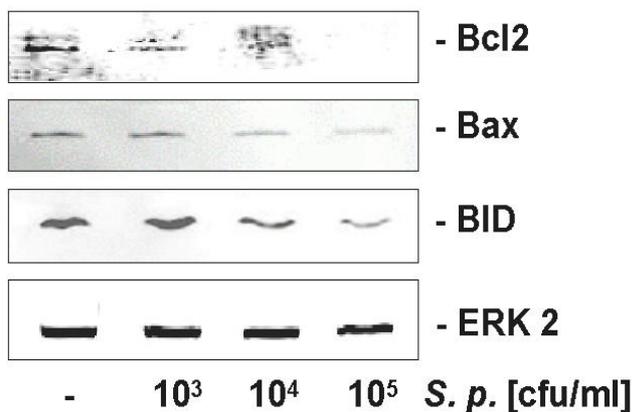
gehemmt (**Abb. 22**). Hier war ebenfalls nur eine Reduktion der Apoptoserate um ca. 50% zu beobachten. Eine Kombination aller vier Inhibitoren reduzierte die pneumokokkeninduzierte Apoptose ebenfalls höchsten um 60%. (Daten nicht aufgeführt)



**Abb. 22.: Calpain Inhibitor III und Serinprotease-Inhibitoren Chymotrypsin Inhibitor N $\alpha$ -Tosyl-Phe-Chloromethyl Ketone (TPCK) und Trypsinproteasen Inhibitor N $\alpha$ -Tosyl-Lys-Chloromethyl Ketone, Hydrochloride (TLCK) reduzierten die pneumokokkeninduzierte Apoptoserate.** Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II wurden mit dem Pancaspase-Inhibitor I (Z-VAD-FMK), Calpain Inhibitor III und den Serinproteasen-Inhibitoren TLCK und TPCK eine Stunde vor Infektion mit  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Bildung von Oligonukleosomen (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>) gemessen. Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur *Streptococcus pneumoniae* Infektion ohne Inhibitoren.

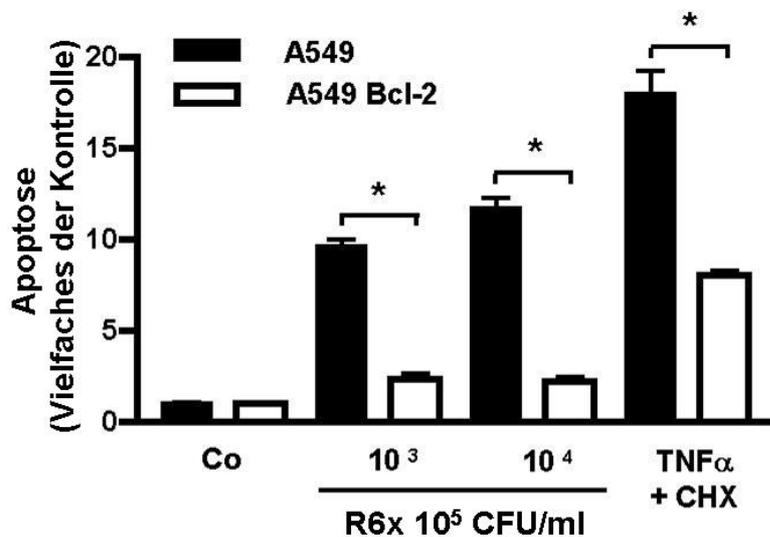
### 3.2.4.1 Die Apoptoseregulation durch die Bcl-2 Familie

Während der Pneumokokkeninfektion wurde die Menge von Bcl 2 (26 kDa), einem antiapoptotischen Protein der Bcl-2 Familie, im Zytoplasma der Zelle reduziert (**Abb. 23**). Eine weitere Veränderung nach einer Pneumokokkeninfektion war die Spaltung des inaktiven proapoptotischen Vorläuferproteins Bax (**Abb. 23**), ebenfalls ein Mitglied der Bcl-2 Familie, in eine kleinere, aktive Form (23 kDa). Diese könnte dann an der äußeren Mitochondrienmembran ansetzen (*Wolter K G 1997*) und aus dem intermembranären Mitochondrienraum, z.B. über Porenbildung, proapoptotischen Proteine (z.B. AIF, Cytochrom c) in das Zellzytoplasma freisetzen (*Gross A 1998*). Ein weiteres proapoptotisches Protein BID (22 kDa), ein BH3-„only“ Protein, welches eine Konformationsänderung von Bax induzieren kann (*Desagher S 1999*), wurde ebenfalls bei einer R6x-Infektion durch Spaltung des inaktiven Vorläuferproteins in eine 15 kDa große aktive Form („truncated“- BID) überführt (**Abb. 23**).



**Abb.23: Pneumokokken aktivieren Bax und BID und deaktivieren Bcl-2.** Alveolarepithelzellen (A549) wurden mit  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^5$  CFU/ml R6x-Pneumokokken infiziert. Nach 8 Stunden wurde das gesamte lösliche Protein extrahiert und mit SDS-PAGE aufgetrennt. ERK 2 (42 kDa) wurde als Beladungskontrolle genommen. Gezeigt sind repräsentative Blots von vier verschiedenen Versuchen.

Die Bedeutung von Bcl-2 für R6x-induzierte Apoptose wurde mit stabil transfizierten Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II mit Bcl-2 Überexpression untersucht. Diese Zellen wurden mit  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  CFU/ml und 10ng/ml TNF $\alpha$  + 10 $\mu$ g/ml CHX stimuliert. Nach 16 Stunden wurden die Oligonukleosomen mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> als Marker der Apoptose gemessen. Wie man in **Abb.24** sehen kann, wurde im Vergleich zu nicht transfizierten Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II die pneumokokkeninduzierte Apoptoserate um bis zu 75 % und die TNF $\alpha$ /CHX-induzierte Apoptoserate um bis zu 50 % reduziert.

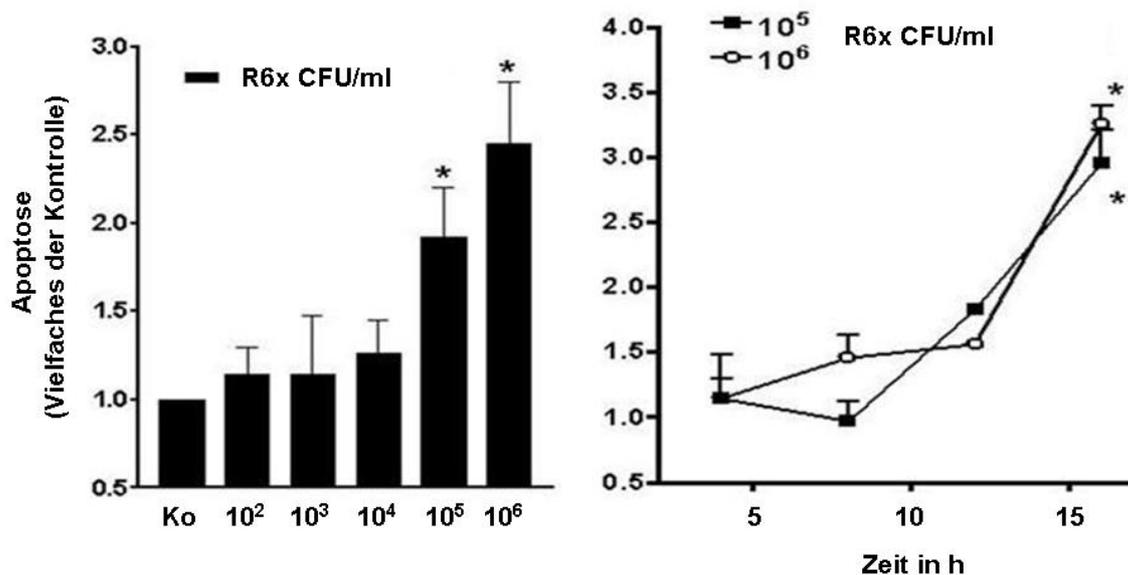


**Abb. 24: Bcl-2 Überexpression hemmt die R6x- und TNF $\alpha$  + CHX-induzierte Apoptose.** Stabil transfizierte Alveolarepithelzellen (A549) vom Typ II mit Bcl-2 Überexpression (weiße Balken) und nicht transfizierte Alveolarepithelzellen vom Typ II (schwarzer Balken) wurden mit  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$  CFU/ml R6x und 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10  $\mu$ g/ml CHX für 16 Stunden stimuliert. Gemessen wurden Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (hier als Vielfaches der Kontrolle angegeben). Mittelwerte +/- SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur Infektion von Zellen mit Bcl-2-Überexpression.

### 3.3 Pneumokokken und Bronchialepithelzellen (BEAS-2B)

Wie verhalten sich nun Bronchialepithelzellen, die ja vor den Alveolarepithelzellen mit dem Erreger bei einer Pneumokokkeninfektion in Berührung kommen?

Eine Infektion von Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) mit unterschiedlichen Pneumokokkenstämmen führte entweder zu einem nekrotischen oder apoptotischen Untergang der infizierten Zelle: Der bekapselte D39-Stamm führte zur Nekrose (Daten nicht gezeigt) und der unbekapselte R6x-Stamm induzierte Apoptose in den betroffenen Zellen (**Abb. 25**). Die BEAS-2B Zellen wurden mit D39 und R6x Pneumokokken in einer Dosis von  $1 \times 10^2$  bis  $1 \times 10^6$  CFU/ml infiziert. Nach 4, 8, 12 und 16 Stunden wurden die Oligonukleosomen als Marker der Apoptose (Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> und die LDH-Aktivität im Überstand als Nekrose-Marker (Cytotoxicity Detection Kit, Daten nicht gezeigt) gemessen.



**Abb. 25: Zeit- und dosisabhängige Apoptoseinduktion in Bronchialepithelzellen nach Infektion mit R6x.** BEAS-2B Bronchialepithelzellen wurden mit R6x in einer Konzentration  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  CFU/ml infiziert. Gemessen wurden Oligonukleosomen als Marker der Apoptose mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> (Roche) (hier als Vielfaches der Kontrolle angegeben) zu den Zeiten 4, 8, 12 und 16 Stunden. Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei verschiedenen Versuchen. \* bedeutet das  $p < 0,05$  im Vergleich zur Kontrolle.

## 4 Diskussion

Trotz großer Fortschritte in der Medizin steht die Pneumonie in den USA als Todesursache an sechster Stelle, hinter den koronaren Herzerkrankungen, malignen Neoplasien, zerebralen Infarkten, Unfällen und COPD ([Mandell 2003](#)). Unter den Infektionskrankheiten ist die Pneumonie sogar die Haupttodesursache, wobei *Streptococcus pneumoniae* der häufigste Erreger ist ([File TM 2004](#)). In Deutschland erkranken schätzungsweise jährlich etwa 400.000 Menschen an einer Pneumonie ([www.CAPNETZ.de](http://www.CAPNETZ.de)).

Das tracheobronchiale und alveoläre Epithel funktioniert mit seinen zillienbesetzten und schleimproduzierenden Zellen sowie den für die Reparatur wichtigen Typ II Alveolarepithelzellen als eine wichtige anatomische und funktionelle Barriere gegen pathogene Keime. Es ist die erste Abwehrlinie des Immunsystems, die mit pathogenen Keimen in Berührung kommt.

Da Pneumokokken die Haupterreger der ambulant erworbenen Pneumonie sind ([File TM 2004](#)), wurde in dieser Studie, die Interaktionen zwischen den Epithelzellen und dem Erreger untersucht: In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass infizierte Lungenepithelien einen jeweils vom Pneumokokkenstamm abhängenden, unterschiedlichen Zelltod erleiden können. So induziert *Streptococcus pneumoniae* R6x (unbekapselt) einen apoptotischen und D39 (bekapselt) einen nekrotischen Zelltod in alveolären und bronchialen Epithelzellen. Hohe Konzentrationen von Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen führen zur Nekrose der Alveolarepithelzellen. Bei dem pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod werden die Regulatorencaspasen 8 und 9 sowie die Exekutions-Caspase 6 aktiviert. Eine signifikante Aktivierung der Exekutions-Caspase 3 konnte nicht nachgewiesen werden. Dass Caspasenaktivierung in dem pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod eine Rolle spielt, konnte mittels eines Pancaspasen-Inhibitors sowie eines spezifischen Caspase-6-Inhibitors, welche beide eine deutliche, aber nicht vollständige Reduktion der Apoptoserate bewirkten, gezeigt werden. Eine Inhibition von Calpain, Trypsin- und Chymotrypsin-

ähnliche Proteasen führte ebenfalls zu einer deutlichen aber nicht vollständigen Reduktion der Apoptoserate. Darüberhinaus spielen Mitglieder der Bcl-2 Familie als Kontrollproteine des mitochondrialen Membranpotentials eine wichtige Rolle im pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod. So konnte eine Spaltung der proapoptotischen Proteine Bid und Bax sowie die Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nachgewiesen werden. Des Weiteren führte eine Überexpression des Bcl-2 Proteins zu einer signifikanten Reduktion der pneumokokkeninduzierten Apoptoserate bei infizierten Alveolarepithelzellen.

#### **4.1 *Streptococcus pneumoniae* führt sowohl zur Nekrose als auch zur Apoptose in Lungenepithelzellen**

Der Kontakt mit Pneumokokken löst eine starke Entzündungsreaktion des Immunsystems aus, welche mit vermehrtem Zelltod einhergeht und zu einer akuten Luftnot führen kann ([Bardales RH 1996](#)). Von den Lungenepithelzellen freigesetztes IL-8 ([Madsen M 2000](#)) lockt neutrophile Granulozyten an, welche die Entzündung noch verstärken, was zur weiteren Schädigung des umliegenden Gewebes führt. Die rekrutierten Granulozyten werden daran gehindert, Bakterien zu phagozytieren, indem ein bakterielles Oberflächenprotein (CbpA) deren Opsonierung verhindert. Dies hat zur Folge, dass nur die schädigende Wirkung der Entzündung zum Tragen kommt und die Invasion der pathogenen Keime weiter erleichtert wird. Eine hohe epitheliale Apoptoserate könnte die Pneumokokkeninvasion deutlich begünstigen und zu invasiven Erkrankungen wie Meningitis und Septikämien führen. Hakansson et al. beschrieben 1996 einen erhöhten Zelluntergang mit einem Anstieg von Oligonucleosomen in Epithelzellen, die mit Pneumokokken infiziert wurden und äußerten den Verdacht, dass es sich dabei um Apoptose handeln könnte. Der Zelltod konnte bereits zwei Stunden nach Infektion mit  $10^8$  CFU/ml nachgewiesen werden, wobei die Sterberate konzentrationsabhängig war. In unseren Experimenten zeigte sich, dass die bronchialen und alveolären Epithelzellen je nach Pneumokokkenstamm dosisabhängig entweder den nekrotischen oder apoptotischen Zelltod starben. Der unbekapselte R6x Stamm induzierte den programmierten Zelltod mit den typischen morphologischen und

biochemischen Veränderungen, wohingegen der bekapselte D39 Stamm eine massive Freisetzung von LDH ohne Anstieg von DNA-Fragmenten verursachte als Zeichen der Nekrose. Ähnliches berichteten 2003 Ali und Kollegen bei den Makrophagen. Unbekapselte Pneumokokken induzierten hier eine höhere Apoptoserate als die bekapselten (Ali F 2003). Auch zeigte sich, dass die unbekapselten Pneumokokken leichter phagozytiert werden konnten, was vermuten lässt, dass wahrscheinlich die Kapsel den Kontakt zwischen apoptoseinduzierenden Faktoren und der Wirtszelle vermindert oder ganz verhindert. Zusätzlich konnten Hammerschmidt und Kollegen mittels Elektronenmikroskop eine Kapselreduktion bei bekapselten Pneumokokken vor dem Bakterien-Zell-Kontakt beobachten (Hammerschmidt S 2005), so daß *Streptococcus pneumoniae* offenbar beim Zellkontakt die Kapsel abwirft.

Die Polysaccharid-Kapsel ist für eine systemische Infektion notwendig. Sie verhindert eine Phagozytose und ist somit ein wichtiger Bestandteil bei der Pneumokokkenpathogenese. Dies könnte eine Erklärung sein, warum klinisch relevante Stämme eine Kapsel haben, Pneumokokken ohne Kapsel hingegen als apathogen gelten (Kelly T 1994). Im in vitro System ohne Komplementsystem und Makrophagen scheinen die unbekapselten Bakterienstämme genauso oder sogar virulenter, als die bekapselten zu sein, da eine Kapsel für eine direkte Interaktion zwischen Bakterium und Zelle eher hinderlich ist und die Bakterien durch das Fehlen von Makrophagen und Komplementsystem geschützt sind (Hammerschmidt S 2005).

Interessant ist auch, dass Pneumokokken in neutrophilen Granulozyten ebenfalls Apoptose und Nekrose induzieren können. Von Zysk und Kollegen wurde 2000 beschrieben, dass je nach Stärke des Stimulus der Tod der Granulozyten bestimmt wurde. So führten lebende Pneumokokken zur Nekrose und hitzeinaktivierte Bakterien zur Apoptose (Zysk G 2000). In einem anderen Modell beschreiben Braun et al. eine gleich starke Apoptoseinduktion in Neuronen der Hipokampus-Region, sowohl durch den unbekapselten als auch durch den bekapselten Stamm (Braun JS 2002).

Bei Bakterien in einem intrazellulären Lebenszyklus ist es besonders wichtig, dass deren Lebenszyklus mit dem der Wirtszellen einigermaßen synchron abläuft. Ein zu früher Tod der Wirtszelle wäre fatal für die Vermehrung der

pathogenen Keime. Folglich haben die Bakterien verschiedene Strategien entwickelt, um auf unterschiedlichen Ebenen den programmierten Zelltod beeinflussen können. Ein interessantes Beispiel sind Chlamydien, bei denen es sich um obligat intrazelluläre Keime mit einem biphasischen Lebenszyklus handelt. Sie können Ursache für respiratorische Infektionen, Geschlechtskrankheiten und Konjunktivitis sein und wurden in letzter Zeit auch mit der Arteriosklerose in Verbindung gebracht (*Taylor- Robinson D 1998*). Es ist bekannt, dass sie die Apoptose sowohl hemmen als auch induzieren können. So kann *Chlamydomphila pneumoniae* in der Frühphase der Infektion, die Apoptoserate in Lungenepithelzellen reduzieren (*Rajalingam KH 2001*). *Chlamydia psittaci* hingegen führt zu einem späteren Zeitpunkt zur Apoptose seiner Wirtszellen (*Ojcius DM 1998*). Anhand dieser scheinbar widersprüchlichen Daten hat man die Hypothese aufgestellt, dass Chlamydien während ihrer replikativen Phase die Apoptose hemmen und nach Beendigung ihres Lebenszykluses das Gegenteil tun, um sich so weiter verbreiten zu können.

Andere Beispiele für Bakterien mit intrazellulärem Lebenszyklus sind *Mycobacterium tuberculosis* und *Legionella pneumophila*. Die Mykobakterien induzieren Apoptose in Lungenmakrophagen, die eine Art Schutz für den Wirt darstellen, weil er nur so die Vermehrung der Bakterien eindämmen kann (*Keane J 1997*). Legionellen, die für die Legionärskrankheit verantwortlich sind, vermehren sich ebenfalls intrazellulär und induzieren ebenfalls Apoptose in Makrophagen und Lungenepithelzellen (*Gao LY and Abu Kwaik Y 1999*).

#### **4.2 Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen zur Nekrose in Lungenepithelzellen**

Die von uns beobachtete pneumokokkeninduzierte Apoptose in Lungenepithelien scheint unabhängig von Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu sein. Einige Stunden vor der DNA-Fragmentation nach Pneumolysin- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Exposition konnte eine erhöhte Freisetzung von LDH, als Zeichen der Nekrose, gesehen werden, sodass die DNA-Fragmentation ein Nebeneffekt zu sein

scheint. Um einen zytotoxischen Effekt auszulösen, muss man relativ hohe Dosen an Pneumolysin (1 bis 20 µg/ml) verwenden. Zum Beispiel produziert eine Pneumokokkenkonzentration von 10<sup>5</sup> CFU/ml ungefähr 20 ng Pneumolysin pro ml in 12 h ([Spreer A 2003](#)). Dies zeigt die Wichtigkeit des Zusammenspiels der Virulenzfaktoren. In Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen fanden Hirst et al. heraus, dass pneumolysinexponierte A549 Zellen und humane Monozyten an Nekrose starben. Apoptose wurde nicht beschrieben ([Hirst RA 2002](#)). Ähnliches berichten auch Zysk und Kollegen für neutrophile Granulozyten, die je nach Stimulusstärke sowohl Nekrose als auch Apoptose beobachteten. Dabei führte Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in diesem Model zur Nekrose ([Zysk G 2000](#)). Andererseits induzierten sowohl Pneumolysin als auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einer experimentellen Meningitis in Mäusen den programmierten Zelltod in Neuronen und Gliazellen ([Braun JS 2002](#)).

Eine weitere wichtige Rolle als Pathogenitätsfaktor scheint H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Wundheilung bei geschädigtem Lungenalveolarepithel zu spielen. Geiser und Mitarbeiter berichteten über eine Hemmung der Wundheilung im verletzten Lungengewebe. Sie beobachteten eine verstärkte Apoptose der Alveolarepithelien besonders am Randsaum der Wunde. Diese Beobachtung führt zur Vermutung, dass eventuell eine erhöhte Apoptoserate der Epithelzellen eine Ursache für die gestörte Wundheilung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ([Geiser T 2004](#)). In anderen Studien zeigte sich jedoch, dass freie Radikalfänger die Apoptose nicht verhindern konnten ([Loeffler JM 2001](#)). Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unterschiedliche pathogenetische Effekte in der bakteriellen Lungenentzündung und Meningitis ausüben können. Deswegen sollten zelluläre Effekte einer Pneumokokkeninfektion im organ- und zellspezifischen Kontext betrachtet werden. Andere apoptoseinduzierende Faktoren müssen neben Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einer Pneumokokkeninfektion in Betracht gezogen werden. Des Weiteren verwendeten wir von einem Bronchialepithelkarzinom abstammende alveoläre Epithelzellen sowie mit einem Adenovirus 12-SV40 transformierte Bronchialepithelzellen, bei denen möglicherweise der programmierte Zelltod verändert ist. Aus diesem Grund sollten weitere Versuche an frisch isolierten Lungenepithelzellen sowie weitere Untersuchungen der Apoptose an infiziertem Lungengewebe durchgeführt werden, um diese Ergebnisse zu diesem Thema zu bestätigen.

#### **4.3 Die Caspasen 8, 9 und 6, nicht aber Caspase 3 werden bei einer *Streptococcus pneumoniae* Infektion aktiviert**

In Lungenepithelzellen kommt es nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* zu einer Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 und 9. Dabei wird die Caspase 8 wohl retrograd über die Mitochondrien und nicht über die TNF $\alpha$ -Rezeptorfamilie via DISC-Komplex aktiviert ([Salvesen GS and Dixit VM 1999](#)). Caspase 9 wird nach Freisetzung aus dem intermembranären Mitochondrienraum durch Cytochrom C via Apoptosom aktiviert ([Hu Y 1999](#)). Als eine Verbindung zwischen diesen beiden Caspasen wurde die Spaltung des proapoptotischen BH3 Proteins Bid durch Caspase 8 ([Desagher S 2000](#)) beobachtet. Bid ist ein Mitglied der Bcl-2 Proteinfamilie und führt über eine Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials zur Aktivierung der Caspase 9 mit anschließender Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 ([Li H 1998](#)).

Bei den drei Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 scheint Caspase 3 in vielen Systemen die Hauptrolle bei der Entwicklung apoptotischer Veränderungen zu spielen ([Slee EA 2001](#)). Alle drei scheinen eine wichtige Rolle bei der Meningitis und Sepsis zu spielen. So fanden Mehring et al., dass in einem Mausmodell mit Pneumokokkenmeningitis und Sepsis mehrere Caspasen, unter diesen auch Caspase 6, verstärkt exprimiert wurden. In einer anderen Studie konnte in einer experimentellen Pneumokokkenmeningitis durch eine Inhibition der Caspasen die Apoptose von Zellen im Hippokampus verhindert werden ([Braun JS 1999](#)). Im Gegensatz hierzu konnte bei der Apoptose neuronaler Zellen keine erhöhte Caspaseaktivität nachgewiesen werden ([Braun JS 2001](#)). Daher lag es nahe, als erstes die Rolle der Caspasen bei der Apoptose in Lungenepithelien zu klären. Auffällig an den hier beobachteten Ergebnissen war die Aktivierung der Caspase 6 ohne eine Aktivitätssteigerung der Caspase 3. Caspase 6 spielt eine wichtige Rolle in der Spaltung von Lamin A, was wiederum wichtig ist in der apoptotischen Nukleuskondensation ([Ruchaud S 2002](#)). Eine weitere Bedeutung kommt der Caspase 6 bei der Apoptose von neuronalen Zellen zu ([Rouaux C 2003](#)). So wird Caspase 6 mit dem Tod der Neurone und der Spaltung des Tau-Proteins in Verbindung gebracht, ohne dass die Caspase 3

aktiviert wird. Aus diesem Grund vermuten die Autoren, dass die Substrate, welche bisher nur der Caspase 3 zugeschrieben wurden, eventuell auch Substrate der Caspase 6 sein könnten (Guo H 2004). In einem anderen Model beobachteten Dario Diaz und Kollegen im Darmepithel, dass Apoptose auch ohne Caspase 3, nur durch Aktivierung der Caspasen 8 und 6 ablaufen kann. Hier führte Caspase 8 über eine Spaltung von Procaspase 6 zur Degradierung der nuklearen Laminen mit anschließender Kondensation des Zellkerns. (Darío Díaz G 2003). Zheng et al zeigten ebenfalls, dass das Ausschalten der Caspase 3 die Apoptose nicht verhindern konnte, und dass ein apoptotischer Stimulus über eine kompensatorische Aktivierung der Caspasen 6 und 7 immer noch zu den typischen Zeichen der Apoptose führen konnte (Zheng TS 2000). Tang und Kollegen wiederum beschreiben die Apoptose in Brustkarzinomzellen als Caspase 3-abhängig, konnten aber eine Mitbeteiligung von Caspase 6 nicht ausschließen (Tang D 2000).

Eine Caspase 6-Aktivierung wurde ebenfalls in Epithelzellen durch eine Infektion mit *Pseudomonas aeruginosa* (Cannon CL 2003) und *Helicobacter pylori* (Potthoff A 2002) beobachtet. Eine fehlende Aktivierung der Caspase 3 bei einer bakteriellen Infektion wurde bisher noch nicht beschrieben. Es ist aber bekannt, dass in einigen experimentellen Systemen Caspase 6 über Caspase 3 aktiviert werden kann (Allsopp TE 2000). Es gibt aber auch Arbeiten, die eine Aktivierung von Caspase 6 ohne eine Aktivierung der Caspase 3 zeigen konnten (Miyashita T 1998). Ebenso besteht auch die Möglichkeit, dass manche Caspase-Aktivitäts-Assays eine zu niedrige Caspasenaktivität aufgrund von Enzymsequestrierung anzeigen (Kottke TJ 2002). Die in diesen Versuchen beobachteten Daten, welche mit dem Caspase Activity Assay gewonnen wurden, konnten auch mittels Western Blot bestätigt werden und obwohl TNF $\alpha$ /Cycloheximide zu einer Spaltung der inaktiven Procaspase 3 in den aktiven Zustand führte, wurde die Procaspase 3 durch Pneumokokkeninfektion nicht aktiviert. Aus diesem Grund kann man annehmen, dass es sich bei der von Pneumokokken in A549 Zellen induzierte Apoptose um einen Caspase 3 unabhängigen Prozess handelt.

#### 4.4 Trypsin-, Chymotrypsinähnliche und Calpainproteasen spielen in der *Streptococcus pneumoniae*-induzierten Apoptose eine Rolle

Um die physiologische Bedeutung der Caspasenaktivierung in Epithelzellen, die mit Pneumokokken infiziert wurden, genauer definieren zu können, wurden die Caspasen mittels spezifischer Enzyminhibitoren irreversibel gehemmt. So führte die Präinkubation von humanen Alveolarepithelzellen mit dem Pancaspase-Inhibitor zVAD-fmk oder dem Caspase-6-Inhibitor zVEID zu einer starken Reduktion der pneumokokkeninduzierten Apoptoserate. Allerdings konnten nicht alle Zellen vor dem programmierten Zelltod gerettet werden. Deshalb wurde mit zusätzlichen Experimenten untersucht, ob eventuell weitere Proteasen, welche auch ohne Caspasen zum programmierten Zelltod führen konnten, eine Rolle bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose spielen. Bisher galt die Aktivierung der Caspasen für den Ablauf des programmierten Zelltodes als unerlässlich. In den letzten Jahren allerdings wurden immer mehr Arbeiten veröffentlicht, die vermuten lassen, dass der kontrollierte Zelltod auch caspaseunabhängig ablaufen könnte ([Jäättelä M 2002](#)).

Die am besten untersuchten Proteasen, die zu einem caspaseunabhängigen Zelltod führen können, und aber auch gemeinsam mit den Caspasen wirken können, sind die Calpaine und die Serinproteasen ([Leist M and Jäättelä M 2001](#)). So gibt es Hinweise, dass serinähnliche Proteasen (Granzyme A, B Omi) ([Wolf BB und Green DR 2002](#)) und ebenso die Cysteinprotease Calpain ([Mathiasen IS 2002](#)) bei dieser Art von Zelltod eine Rolle spielen könnten.

So führt eine Hemmung von Calpain I und II mit einem Calpaininhibitor und auch die Verwendung von Serinproteasen-Inhibitoren (TLCK und TPCK) in Alveolarepithelzellen (A549) zu einer signifikanten Reduktion der pneumokokkeninduzierten Apoptoserate. Hier konnte aber ebenfalls wie bei einer Caspasenihibition nur eine unvollständige Reduktion der Apoptose beobachtet werden.

Calpaine sind Cysteinproteasen, die im Zytosol vorkommen und für ihre Aktivierung vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  benötigen ([Wang KK 2000](#)). Calpastatin als natürlicher Inhibitor wird entweder von Calpain selbst oder den Caspasen

gehemmt.

In HL-60 Zellen führt die Aktivierung von Calpain über die Spaltung von Bax zum zellulären Tod ([Wood DE 1998](#)). Dabei vermuten Wood und Mitarbeiter, dass Calpain von Caspasen aktiviert wird ([Wood DE and Newcomb EW 1999](#)). Es gibt aber auch die Möglichkeit einer caspasenunabhängigen Rolle von Calpain im programmierten Zelltod. Eine Hemmung der Caspasen mit dem Pancaspase Inhibitor zVAD-fmk verhindert nicht den Zelltod von neuronalen Zellen, neutrophilen Granulozyten oder Thymozyten, sondern ändert nur die morphologische Erscheinung des programmierten Todes ([Xiang J 1996](#)). Des Weiteren kann Calpain in Brustkrebszellen caspaseunabhängig zur Apoptose führen, die durch eine Überexpression von Bcl-2 gehemmt werden kann ([Mathiasen IS 2002](#)).

Altnauer und Mitarbeiter auf der anderen Seite konnten erst kürzlich zeigen, dass Calpain bei der Apoptose von neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle über die Aktivierung der Effektor-Caspase 3 und somit für den klassischen Apoptoseweg spielt ([Altnauer F 2004](#)). Eine Hemmung von Calpain verhinderte die Spaltung von Bax, einem proapoptotischen Bcl-2 Protein, welches via Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials zur Freisetzung von Cytochrom C und Smac, einem IAP-Inhibitor in der Fas-Rezeptor-induzierten Apoptose, führt. Über die Regulation von Calpastatin kann Caspase 8 die Aktivität von Calpain regulieren. Calpain spaltet den NH<sub>2</sub> Rest von Bax ab, womit Bax nicht mehr mit den antiapoptotischen Bcl-2 Proteinen interagieren kann und so seine volle proapoptotische Wirkung zur Entfaltung bringen kann. Zusätzlich zeigten Studien am *C. elegans* und auch an Mäusen bei denen bestimmte Gene ausgeschaltet wurden, dass BH3-only Proteine (z.B. tBID, BIM, BAD) sowohl einen caspaseabhängigen als auch einen caspaseunabhängigen Weg einschlagen können ([Abraham MC and Shaham S 2004](#)). Vermutlich hängt es von der Zelllinie und dem Stimulus ab, ob Calpain zum klassischen Zelltod via Caspasen oder zu einem apoptose- sowie nekroseähnlichen programmierten Zelltod führt.

Obwohl bis dato wenig über die Funktion der Serinproteasen im Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod bekannt ist, gibt es Studien, die gezeigt haben, dass eine Inhibition der Serinproteasen, die Induktion der

Apoptose durch verschiedene Stimuli in Hepatozyten gehemmt werden kann ([Gong B 1999](#)). Wobei die Rolle dieser Proteasen Zelltyp- und Stimulusabhängig ist. Weitere Informationen liefern Mitsui und Kollegen. Hier spielen Serinproteasen eine wichtige Rolle in der durch Colchizin ausgelösten caspasenabhängigen und caspasenunabhängigen Apoptose. So konnte eine Hemmung der Caspasen durch den Pancaspase Inhibitor z-VADfmk die Apoptoserate in Nervenzellen nicht reduzieren. Der Serinproteaseblocker TLCK ebenfalls nicht. Nur eine Kombination von beiden führte zu einer signifikanten Lebensverlängerung der Nervenzellen, was zu der Vermutung führt, dass bei dem neuronalen Zelltod durch Colchicin gleichzeitig caspasenabhängige wie caspasenunabhängige Signalwege zum programmierten Zelltod führen ([Mitsui C 2001](#)).

Wichtige Serinproteasen werden von den aktivierten Lymphozyten freigesetzt, z.B. Granzym B, die dann über eine schnelle Caspasenaktivierung zum Zelltod führen. Werden diese Caspasen mittels eines Pancaspase Inhibitors gehemmt, führt Granzyme B zu einem nekroseähnlichen programmierten Zelltod ([Johnson DE 2000](#)). Granzym A ist ein anderes Beispiel, da es über die Aktivierung einer DNAse ebenfalls zu apoptotischen Zelltod führt ([Beresford PJ 2001](#)).

Eine andere Serinprotease, Omi/Htra2, wird nach Veränderung des Mitochondrien-Membranpotentials aus dem intermembranären Raum der Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt. Hier kann sie dann auf zwei Wegen seine apoptotische Wirkung entfalten: zum einem über die Hemmung der IAPs, zusammen mit Smac/DIABLO, und zum anderen über eine direkte Degradation der DNA, ohne Beteiligung der Caspasen ([Kauffmann SH and Hengartner MO 2001](#)).

In der pneumokokkeninduzierten Apoptose bei Alveolarepithelzellen scheinen Serinproteasen ebenfalls eine Rolle zu spielen. So führt eine Inhibition mit dem Chymotrypsin Inhibitor N<sup>α</sup>-Tosyl-Phe-Chloromethyl Ketone (TPCK) und trypsinähnliche Proteasen Inhibitor N<sup>α</sup>-Tosyl-Lys-Chloromethyl Ketone, Hydrochloride (TLCK) zu einer deutlichen Reduktion der Todesrate. Allerdings werden nicht alle Zellen gerettet. Vermutlich werden mehrere Apoptosesignalwege gleichzeitig beschritten, so dass, wenn einer gehemmt wird, es trotzdem noch zum Zelluntergang kommt. Eine Kombination von

Caspase-, Calpain- und Serinproteasen Inhibitoren reduziert die pneumokokkeninduzierte Apoptose stärker, als wenn nur ein einzelner Inhibitor verwendet wird. Jedoch werden auch hier nicht alle Zellen gerettet, so dass man annehmen muss, dass noch weitere bisher unbekannte Proteasen an diesem Prozess beteiligt sind.

#### 4.5 Bcl-2 Proteinfamilie im pneumokokkeninduzierten Zelltod

Um die physiologische Rolle von Bcl-2 bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose genauer bestimmen zu können infizierten wir Lungenalveolarepithelzellen, die Bcl-2 überexprimierten, mit *Streptococcus pneumoniae*. Es zeigte sich, dass diese Zellen deutlich unempfindlicher gegenüber dem pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod waren als diejenigen, die nicht Bcl-2 überexprimierten. Dies führt zur Vermutung, dass Bcl-2 Proteine eine wichtige Rolle in der von Pneumokokken in Lungenalveolarepithelzellen induzierten Apoptose spielen. Die unvollständige Reduktion der Apoptoserate in den TNF $\alpha$ -/Cycloheximide-stimulierten Lungenalveolarepithelzellen könnte aufgrund der von Cycloheximide inhibierten Proteintranslation des transfizierten Bcl-2 zustande kommen. Interessanterweise sichern sich Mykobakterien ihr intrazelluläres Überleben über die Induktion der Bcl-2 Produktion ([Mogga SJ 2002](#)). Die hier gezeigte Spaltung von Bax in *Streptococcus pneumoniae* stimulierten Epithelzellen könnte durch eine Aktivierung von Calpain zustande kommen. Diese Annahme stützt sich auf die Ergebnisse von Altnauer et al. und Gao et al, die herausfanden, dass die Spaltung von Bax eine zentrale Rolle in der von calpaininduzierten mitochondrienabhängigen Apoptose spielt ([Altnauer F 2004](#)).

Ein anderer möglicher Aktivator von Bax könnte ein BH3-only Protein, z.B. t-Bid, sein ([Kauffmann SH 2001](#)). Das aktive 15 kDa große t-Bid, welches als Spaltprodukt von Bid entsteht, wandert aus dem Zytosol zu den Mitochondrien, wo es direkt mit der Mitochondrienmembran oder mit anderen Bcl-2 Mitgliedern interagiert ([Espotis MD. 2002](#)). Seine proapoptotische Wirkung entfaltet es als

Kontrollprotein entweder über eine Hemmung der antiapoptotischen Bcl-2 Proteine oder Aktivierung der proapoptotischen Bcl-2 Proteine ([Wang K 1996](#)). Im Prinzip stellt Bid eine wichtige Verbindung zwischen der rezeptor- und mitochondrienvermittelten Apoptose dar ([Li H 1998](#)). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Pneumokokken infizierten Lungeneithelien sowohl Bax als auch Bid gespalten wurden. Dies deutet auf eine Aktivierung hin. Bid bewirkte in Coloncarzinomzellen über eine Potentialveränderung an der mitochondrialen Membran die Freisetzung von AIF, welches die Wirkung von Caspase 6 auf die nuklearen Laminae verstärkte und gleichzeitig zur Degradation der DNA führte ([Diaz GD 2003](#)). Des Weiteren führte Bid über die Aktivierung von Bak und Bax mit anschließender Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien zur caspasenvermittelten (Caspase 9, 3 und 7) Apoptose ([Korsmeyer SJ 2000](#)). Es gibt viele Hinweise auf eine mitochondriale Mitbeteiligung an der viren- und bakterieninduzierten Apoptose ([Boya P 2001](#)). Zum Beispiel wurde beschrieben, dass Chlamydien die Apoptose von infizierten Zellen über die Degradation von BH3-only Proteinen induzieren ([Fischer SF 2004](#)). Neumeister et al zeigten 2002, dass Mitochondrien bei dem legionelleninduzierten Zelltod eine zentrale Rolle spielen ([Neumeister B 2002](#)). Und Braun et al 2001, dass die Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien bei pneumokokkeninfizierten Neuronen zu deren DNA-Degradation führt ([Braun JS 2001](#)). Hier zeigte sich, dass in mit pneumokokkeninfizierten Lungeneithelien, Bcl-2 runterreguliert und Bax aktiviert wurde. Bcl-2, ein antiapoptotischer Faktor ([Desagher S 2000](#)), kann bei Überexpression zur vollständigen Reduktion der Apoptoserate führen. Für Viren ist eine Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins beschrieben. Adenoviren kodieren für das E1B-19K Protein, welches ein Homolog des humanen Bcl-2 ist, mit ähnlichen Zielproteinen und Funktionen ([Boyd 1994](#)). Ein anderes Beispiel ist das Epstein Barr Virus, welches mit seinem BHRF1-Protein ebenfalls ein Bcl-2 Homolog bildet und somit die Apoptose seiner Zielzelle verhindern kann. Darüber hinaus scheint dieser Virus die Fähigkeit zu besitzen, die Bcl-2 Produktion der Zielzellen anregen zu können ([Henderson S 1993](#)). Bei dem Hepatitis B Virus auf der anderen Seite wird die Apoptosewirkung des proapoptotischen HBV-X (hepatitis B virus X protein) Proteins durch eine Überexpression von Bcl-2 gehemmt ([Schuster 2000](#)). Bei *Helicobacter pylori*, der Hauptursache für die Entstehung

von Magenzulzera, wird die apoptotische Wirkung des Vac A Zytotoxins, welches die Veränderung des Mitochondrienmembranpotentials bewirkt, ebenfalls durch Bcl-2 gehemmt (*Galmiche A 2000*).

Abschließend kann gesagt werden, dass die Bcl-2 Proteinfamilie bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Lungeneithelien eine wichtige Rolle zu spielen scheint.

## 4.6 Ausblick

In der abschließenden Zusammenschau ergeben sich Perspektiven für weiterführende Studien:

Mögliche Signalwege zur Apoptoseinduktion durch *S. pneumoniae* sind die direkte Schädigung beziehungsweise Veränderung des Membranpotentials der Mitochondrien mit Freisetzung von proapoptotischen Substanzen oder die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren mit anschließender Aktivierung der Caspase-Kaskade (**Abb. 26**). So kann zum Beispiel Pneumolysin zu einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg mit anschließender Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus dem intermembranären Mitochondrienraum führen. Apoptose kann aber auch durch die Bakterienwand via Toll Like Rezeptoren der Immunabwehrzellen und Rezeptoren der zu stimulierenden Zelle, wie zum Beispiel in Gehirnzellen mit anschließender Aktivierung der Caspasenkaskade, induziert werden. Ist die Induktor-Caspase 8 aktiviert, kann diese ihrerseits Calpain, Bid und Caspase 6 aktivieren ([Wood DE 1998](#)). Calpain selbst kann dann seinerseits Bid und Bax aktivieren und könnte somit als ein Signalverstärker dienen. Bax führt anschließend mit anderen Mitgliedern der proapoptotischen Bcl-2 Familie zu Membranpotenzialveränderungen und/oder Porenbildung an der Mitochondrienmembran, was als Folge die Freisetzung von mehreren proapoptotischen Substanzen (Cytochrom C, AIF,  $\text{Ca}^{2+}$ , Omi/Htra2) aus dem intermembranösen Raum hat. Diese wiederum führen zum programmierten Zelltod mit, je nach auslösender Substanz, unterschiedlichem morphologischem Bild (**Abb. 26**).

Ob bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose AIF oder auch andere Serinproteasen wie zum Beispiel Omi/Htra2 eine wichtige Rolle spielen, kann in weiteren Experimenten untersucht werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Caspasen, Mitochondrien und Calpain eine wichtige Rolle spielen und diese Ergebnisse zum besseren Verständnis der Pathogenese einer Pneumokokkeninfektion in Lungeneithelien beitragen.

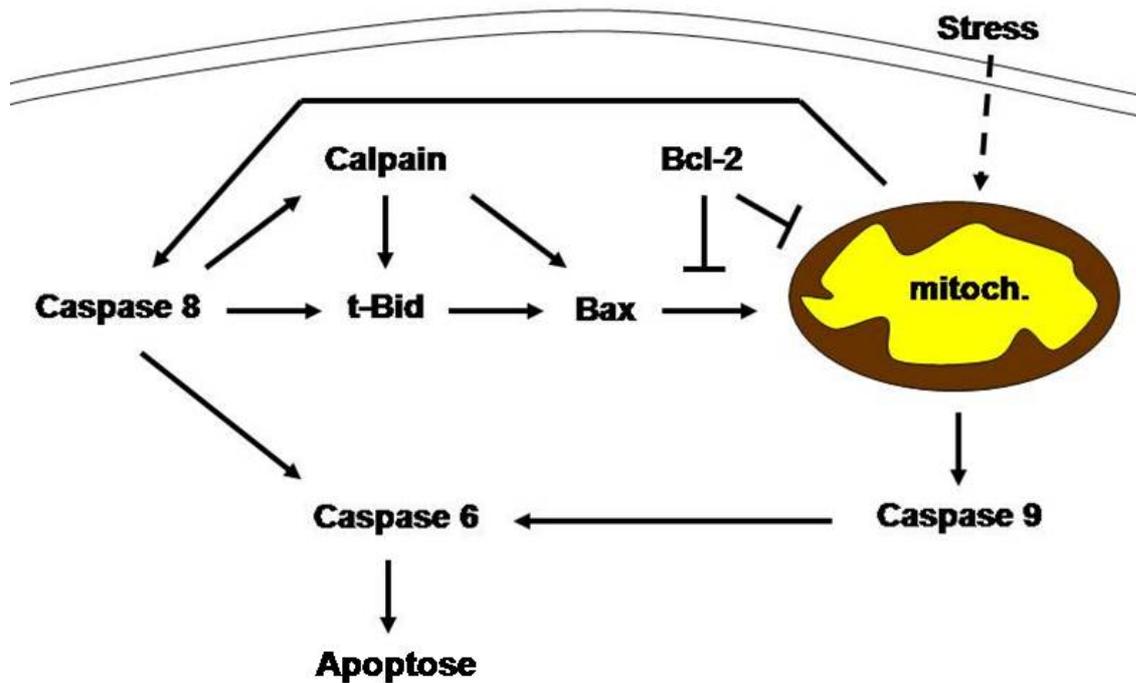
## 4.7 Zusammenfassung

Trotz großer Fortschritte in der Medizin steht die Pneumonie in den USA als Todesursache an sechster Stelle, hinter den koronaren Herzerkrankungen, malignen Neoplasien, zerebralen Infarkten, Unfällen und COPD. Unter den Infektionskrankheiten ist die Pneumonie sogar die Haupttodesursache, wobei *Streptococcus pneumoniae* der häufigste Erreger ist. In Deutschland erkranken schätzungsweise jährlich etwa 400.000 Menschen an einer Pneumonie.

Das tracheobronchiale und alveoläre Epithel funktioniert mit seinen zillienbesetzten und schleimproduzierenden Zellen sowie den für die Reparatur wichtigen Typ II Alveolarepithelzellen als eine wichtige anatomische und funktionelle Barriere gegen pathogene Keime. Es ist die erste Abwehrlinie des Immunsystems, die mit pathogenen Keimen in Berührung kommt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß in infizierten Alveolar- und Bronchialepithelzellen bekapselte *S. pneumoniae* Nekrose und unbekapselte *S. pneumoniae* Apoptose induzieren. Die zwei wichtigen Pathogenitätsfaktoren Pneumolysin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spielen bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Alveolarepithelzellen keine bedeutsame Rolle. In den apoptotischen Epithelzellen kann eine erhöhte Aktivität der Caspasen 6, 8 sowie 9 gemessen werden. Eine Aktivitätssteigerung der Caspase 3 kann nicht beobachtet werden. Nach Zugabe eines Caspase 6- und Pancaspaseinhibitors reduziert sich die Apoptoserate signifikant. Nach Inhibierung von Calpain sowie chymotrypsin- und trypsinähnlichen Proteasen kann ein deutlicher Abfall der pneumokokkeninduzierten Apoptoserate beobachtet werden. Die zur Bcl-2 Familie gehörenden Apoptoseregulatoren Bcl-2, Bax und Bid wurden ebenfalls untersucht. Hier kann eine Spaltung von Bid sowie eine Reduktion von Bcl-2 und Bax nachgewiesen werden. Eine Überexpression von Bcl-2 senkt die Apoptoserate (**Abb. 26**).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die pneumokokkeninduzierte Apoptose sowohl von Caspasen als auch Proteasen, die nicht der Caspasenfamilie angehören, abhängig ist. Des Weiteren spielen verschiedene Apoptoseregulatoren der Bcl-2 Familie eine wichtige Rolle.



**Abb. 26: Mögliche Signalwege bei der pneumokokkeninduzierten Apoptose in Lungeneithelien.** Über Oberflächenrezeptoren z.B. FADD oder Faktoren der Mitochondrien, z.B. Cytochrom C, wird die Induktor-Caspase 8 aktiviert, die ihrerseits Calpain, Bid und Caspase 6 aktiviert (*Wood DE 1998*). Calpain selbst aktiviert Bid und Bax und fungiert somit als ein Signalverstärker (*Altznaer F 2004*). Bax führt anschließend zur Freisetzung von mehreren proapoptotischen Substanzen (z.B. Cytochrom C, AIF,  $\text{Ca}^{2+}$ , Omi/Htra2) aus dem intermembranösen Mitochondrienraum, welche Caspase 9 aktivieren. Als ein Kontrollprotein fungiert das antiapoptotische Bcl-2. Seine Überexpression schützt Zellen gegen den programmierten Zelltod durch Pneumokokken.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Abraham MC and Shaham S. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biol.* 2004; *14*: 184-193
2. Acehan D, Jiang X, Morgan DG et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase 9 binding, and activation. *Mol Cell.* 2002; *9*: 423-432
3. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003; *17*: 2481-2495
4. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995; *181*: 71-77
5. Ali F, Lee ME, Iannelli F et al. Streptococcus pneumoniae-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fc-gamma receptors correlates with intracellular bacterial load. *J Infect Dis.* 2003; *188*: 1119-1131
6. Allsopp TE, McLuckie J, Kerr LE et al. Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death Differ.* 2000; *7*: 984-993
7. Altnauer F, Conus S, Calvalli A et al. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent Caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *J Biol Chem.* 2004; *279*: 5947-5957
8. Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC et al. The autolytic enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing Pneumolysin. *J Bacteriol.* 2001; *183*: 3108-3116
9. Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF et al. Apoptosis is a Major Pathway Responsible for the Resolution of Type II Pneumocytes in Acute Lung Injury. *Am J Pathol.* 1996; *149*: 845-852

10. Bartlett JG und Mundy LM. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med.* 1995; 333: 1618-1624
11. Bauer T, Ewig S, Marcos MA et al. Streptococcus pneumoniae in Community-Acquired Pneumonia. How important is Drug Resistance? *Med Clin North Am.* 2001; 85(6): 1367-79
12. Bempohl D, Halle A, Freyer D et al. Bacterial programmed cell death of cerebral cells involves dual death pathways. *J Clin Invest.* 2005; 115: 1607-1615.
13. Berry AM, Lock RA, Thomas SM et al. Cloning and nucleotide sequence of the Streptococcus pneumoniae hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant Escherichia coli. *Infect Immun.* 1994; 62: 1101-1108
14. Berry AM and Paton JC. Additive attenuation of virulence of Streptococcus pneumoniae by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun.* 2000; 68: 133-140
15. Boya P, Roques B, Kroemer G et al. Viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level. *EMBO J.* 2001; 20: 4325-4331
16. Boyd. Adenovirus E1B-19K and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins. *Cell.* 1994; 79: 341-351
17. Braun JS, Sublett JE, Freyer D et al. Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Investig.* 2002; 109: 19-27
18. Braun JS, Novak R, Murray PJ et al. Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1300-1309
19. Briles DE, Hollingshead SK, Swiatto E et al. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb Drug Resist.* 1997; 3: 401-408

20. Burlacu A. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J Cell Mol Med.* 2003; 7: 249-257
21. Camara M, Boulnois GJ, Andrew PW et al. A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun.* 1994; 62: 3688-3695
22. Cannon CL, Kowalski MP, Stopak KS et al. *Pseudomonas Aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29: 188-197
23. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis.* 1995; 172: 119-123
24. Chen M, He H, Zhan S et al. Bid is cleaved by Calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Biol Chem.* 2001; 276: 30724-28
25. Chopra I and Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 65: 232-260
26. Clifton DR, Goss RA, Sahni SK et al. NF- $\kappa$ B- dependent inhibition of apoptosis is essential for host cell survival during *Rickettsia rickettsii* infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 4646-4651
27. Cockeran R, Steel HC, Mitchell TJ et al. Pneumolysin potentiates production of prostaglandin E2 and leukotriene B4 by human neutrophils. *Infect Immun.* 2001; b 69: 3494-3496
28. Cory S and Adams JM. The Bcl-2 Family: Regulators of cellular life- and-death switch. *Nature Reviews.* 2002; 2: 647-656
29. Crain MJ, Waltman WD 2<sup>nd</sup>, Turner JS et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1990; 58: 3293- 3299

30. Cregan SP, Fortin A, Mac Laurin JG et al. Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol.* 2002; *158*: 507- 517
31. Cryns V and Yuan J. Proteases to die for. *Gen Devel.* 1998; *12*: 1551-1570
32. Cundell DR, Weiser JN, Shen J et al. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1995 *63*: 757-761
33. Cundell DR, Pearce BJ, Sandros J et al. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect Immun.* 1995 b *63*: 2493-2498
34. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C et al. *Streptococcus pneumoniae* anchors to activated eukaryotic cells by the receptor for platelet activating factor. *Nature.* 1995; c *377*: 435-438
35. Darío GD, Li Q, Dashwood RH et al. Caspase 8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrom c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Res.* 2003; *63*: 1254-1261
36. Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 1999; *144*: 891-899.
37. Desagher S and Martinou J-C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000; *10*: 369-377
38. Esposito MD. The roles of Bid. *Apoptosis.* 2002; *7*: 433-440
39. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature.* 2000; *405*: 85-90
40. Fan T, Lu H, Hu H et al. Inhibition of apoptosis in *Chlamydia*-infected cell: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 1998; *187*: 487-496

41. Feldmann C, Munro NC, Jeffrey PK et al. Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1992; 5: 416-423
42. File TM Jr. Streptococcus pneumoniae and Community-Acquired Pneumonia: A Cause for Concern. *Am J Med.* 2004; 117/Supplement 3A: 39S-50S
43. File TK Jr. Community- acquired pneumonia. *Lancet.* 2003; 362: 1991-2001
44. Fine MJ, Smith MA, Carson CA et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia: a meta-analysis. *JAMA.* 1996; 275: 134-141
45. Fischer SF, Vier J, Kirschnek S et al. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3- only proteins. *J Exp Med.* 2004; 7: 905-916
46. Galmiche A, Rassow J, Doye A et al. The N- terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J.* 2000; 19: 6361-6370
47. Gao LY and Abu Kwaik Y. Apoptosis in macrophag and alveolar epithelial cells during early stages of infection by Legionella pneumophila and its role in cytopathogenicity. *Infect Immun.* 1999; 67: 862-870
48. Garibaldi RA. Epidemiology of community-acquired respiratory tract infections in adults. Incidence, etiology and impact. *Am. J Med.* 1985; 78: 32-37
49. Geiser T, Ishigaki M, van Leer C et al. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287: L448-53
50. Gibellini D, Panaya R, Rumpianesi F. et al. Induction of apoptosis by Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis infection in tissue culture cells. *Zbl Bakteriologie.* 1998; 288: 35-43

51. Gong B, Chen Q, Endlich B et al. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ.* 1999; *10*: 491-502
52. Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; *281*: 1309-1312
53. Green DR and Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr Opin Immunol.* 1995; *7*: 694-703
54. Green DR. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell.* 2000; *102*: 1-4
55. Gross A, Jockel J, Wei MC et al. Enforced dimerization of Bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. 1998; *17*: 3878-3886.
56. Gross A, Mc Donnell JM, Korsmeyer SJ et al. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development.* 1999; *13*: 1899-1907.
57. Guo H, Albrecht S, Bourdeau M et al. Active caspase-6 and caspase-6-cleaved tau in neutrophil threads, neuritic plaques, and neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Am j Pathol.* 2004; *165*: 523-531
58. Hakansson A, Carlstedt I, Davies J et al. Aspects on the interaction of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* with human respiratory tract mucosa. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; *154*: 5187-5191
59. Hakenbeck R, Kaminski K, Konig A et al. Penicillin-binding proteins in beta-lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 1999; *5*: 91-99
60. Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH et al. Identification of pneumococcal surface protein A as lactoferrin-binding protein for *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1999; *67*: 1683-1687

61. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P et al. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory Immunglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol.* 1997; *25*: 1113-1124
62. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 2005; *73*: 4653-4667
63. Heffelfinger JD, Dowell SF, Jorgensen JH et al. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: a report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch Intern Med.* 2000; *160*: 1399-1408
64. Henderson S, Huen D, Rowe M et al. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; *90*: 8479-8483
65. Hengartner MO and Horvitz HR. Activation of *C. elegans* cell death protein CED-9 by an amino-acid substitution in a domain conserved in Bcl-2. *Nature.* 1994a; *369*: 318-320
66. Hengartner MO and Horvitz HR. *C. elegans* cell survival gene *ced-9* encodes a functional homolog of the mammalian protooncogene Bcl-2. *Cell.* 1994b *76*: 665-676
68. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000; *407*: 770-776
69. Hippenstiel S, Schmeck B, Seybold J et al. Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; *283*: L830-L838
70. Hirst RA, Yesilkaya H, Clitheroc E et al. Sensitivities of human monocytes and epithelial cells to pneumolysin are different. *Infect Immun.* 2002; *70*: 1017-1022
71. Jäättelä M and Tschopp J. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nature Immun.* 2003; *4*: 416-423

72. Jäättelä M. Programmed cell death: many ways for cells to die decently. *Ann Med.* 2002; 34: 480-488
73. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC et al. The Alexander Project. 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 229-246
74. Jacobs MR. In vivo veritas: in vitro macrolide resistance in systemic *Streptococcus pneumoniae* infections does result in clinical failure. *Clin Infect Dis.* 2002; 35: 565-569
75. Jacotot E, Ferre KF, El Hamel C et al. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein R and Bcl- 2. *J Exp Med.* 2001;193: 509-519
76. Jedrzejewski MJ. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Funktion. *Microbiology and Molecular Reviews.* 2001; 65: 187-207
77. Kam PCA. Apoptosis: mechanisms and clinical Implications. *Anaesthesia.* 2000; 55: 1081-1093
78. Kauffmann SH and Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 526-534
79. Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG et al. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 1997; 65: 298-304
80. Kelly T, Dillard JP and Yother J. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994; 62: 1813-1819
81. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in Tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257

82. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M et al. Pro-apoptotic cascade activates Bid, which oligomerizes Bak and Bax into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Diff.* 2000; 7: 1166-1173
83. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C et al. Caspase-3-generated of gelsolin: Effector of morphological change in apoptosis. *Science.* 1997; 278: 294-298
84. Kottke TJ, Blajeski AL, Meng XW et al. Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2002; 277: 804-815
85. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature.* 2000; 407: 789-795
86. Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S et al. Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 1994; 371: 346-347
87. Leist M and Jäättelä M. Four death and a funeral: from Caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2: 589-598
88. Li LY, Luo X, Wang X et al. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001; 412: 95-99
89. Li H, Zhu H, Xu CJ et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998; 94: 491-501
90. Lieberman J and Fan Z. Nuclear war: the granzyme A- bomb. *Curr Op Immun.* 2003; 15: 553-559
91. Lockshin R and Williams C. Programmed cell death. II. endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol.* 1965; 11: 803-809
92. Loeffler JM, Ringer R, Hablutzl M et al. The free radical scavenger alpha-phenyl-tert-butyl nitron aggravates hippocampal apoptosis and learning deficits in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis.* 2001; 183: 247-252

93. Lonks JR, Garau J, Gomez L et al. Failure of macrolide antibiotic treatment in patients with bacteremia due to erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis*. 2002; *35*: 556-564
94. Madsen M, Lebenthal Y, Cheng Q et al. A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis*. 2000; *181*: 1330-1336
95. Mandell, et al. *Principles and Practice of Infectious Disease*. Band 2. 5 Churchill Livingstone, 2000
96. Manjo G and Joris I. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An Overview of Cell Death. *Am J Pathol*. 1995, *146*, 3-15
97. Mathiasen IS, Sergeev IN, Bastholm L et al. Calcium and Calpain as key mediators of apoptosis-like death induced by vitamin D compounds in breast cancer cells. *J Biol Chem*. 2002; *277*: 30738-30745
98. Mathiasen IS and Jäättelä M. Triggering caspase-independent cell death to combat cancer. *Trends Molec Med*. 2002; *8*: 212-220
99. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000; *1*: 120-129
100. McDaniel LS, Sheffield JS, Delucchi P et al. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun*. 1991; *59*: 222-228
101. McDaniel LS, Scott G, Keamey JF et al. Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med*. 1984; *160*: 386-397
102. Menaker RJ and Jones NL. Fascination with bacteria-triggered cell death: the significance of Fas-mediated apoptosis during bacterial infection in vivo. *Microb Infect*. 2003; *5*: 1149-1158

103. Merino R, Ganan Y, Macias D et al. Bone morphogenetic proteins regulate interdigital cell death in the avian embryo. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; *887*: 120-132
104. Mitchell TJ. Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol.* 2000; *151*: 413-419
105. Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan PJ et al. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1997; *26*: 62-71
106. Mitsui C, Sakai K, Minomiya T et al. Involvement of TLCK-sensitive serine protease in Colchizin-induced cell death of sympathetic neurons in culture. *J Neurosci Res.* 2001; *66*: 601-611
107. Miyashita T, Nagao K, Krajewski S et al. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase 6 but not caspase 3. *Cell Death Diff.* 1998; *5*: 1034-1041
108. Mogga SJ, Mustafa T, Sviland L et al. Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol.* 2002; *56*: 383-391
109. Müller A and Rudel T. Modification of host cell apoptosis by viral and bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2001; *291*: 197-207
110. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature.* 2000; *403*: 98-103
111. Neumeister B, Faigle M, Lauber K et al. *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. *Microbiology.* 2002; *148*: 3639-3650
112. Niwa M, Hara A, Kanamori Y et al. Comparison of susceptibility to apoptosis induced by rh TNF- $\alpha$  and Cycloheximide between human circulating and exudated neutrophils. *Life Sciences.* 1997, *Vol. 61, No.2*, 205-215

113. Ojcius DM, Souque P, Perfettini JL et al. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia psittaci*. *J Immunol*. 1998; 161: 4220-4226
114. Pallares R, Gudiol F, Linares J et al. Risk factors and response to antibiotic therapy in adults with bacteremic pneumonia caused by penicillin-resistant pneumococci. *N Engl J Med*. 1987; 317: 18-22
115. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ et al. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol*. 1993; 47: 89-115
116. Pinkoski MJ and Green DR. Fas ligand, death gene. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 1174-1181
117. Potthoff A, Ledig S, Martin J et al. Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter*. 2002; 7: 367-377
118. Pritchard DG, Lin B, Willingham TR et al. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 315: 431-437
119. Rajalingam K, Al-Younes H, Muller A et al. Epithelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae* (*Chlamydia pneumoniae*) are resistant to apoptosis. *Infect Immun*. 2001; 69: 7880-7888
120. Rampino N, Yamamoto H, Ivanov Y et al. Somatic frameshift mutations in the *bax* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*. 1997; 275: 967-969
121. Roberts DL, Merrison W, MacFarlane M et al. The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J Cell Biol*. 2001; 153: 221-227
122. Rodriguez J and Lazebnik Y. Caspase 9 and Apaf-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev*. 1999; 13: 3179-3184
123. Rogers HJ et al. *Microbial cell wall and membranes*. London, Chapman & Hall, Ltd. 1980 437-460

124. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN et al. Contribution of novel cholin-binding proteins to adherence, colonization und immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 1997; 25: 819-829
125. Rouaux C, Jokic N, Mbebi C et al. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J.* 2003; 22: 6537-6549
126. Ruchaud S, Korfali N, Villa P et al. Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *EMBO J.* 2002; 21: 1967-1977
127. Sakahira H, Enari M, Nagata S et al. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998; 391: 96-99
128. Sampson JS, O'Connor SP, Stinson AR et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of *psaA*, the *Streptococcus pneumoniae* gene encoding a 37-kilodalton protein homologous to previously reported *Streptococcus* sp. Adhesins. *Infect Immun.* 1994; 62: 319-324
129. Sansonetti PJ, Arondel J, Huerre M et al. Interleukin-8 controls bacterial transepithelial translocation at the cost of epithelial destruction in experimental shigellosis. *Infect Immun.* 1999; 67: 1471-1480
130. Saraste A and Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 528- 537
131. Saunders FK, Mitchell TJ, Walker JA et al. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect Immun.* 1989; 57: 2547-2552
132. Scaffidi C, Schmitz J, Zha J et al. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 Typ I and Typ II cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22532-22538
133. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A et al. Two CD95 (Apo- 1/ Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998; 17: 1675-1687

134. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S et al. Nonspecific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett.* 1999; *442*: 117-121
135. Schuster, Gerlich WH, Schaefer S et al. Induction of apoptosis by the transactivating domains of hepatitis B virus X gene leads to suppression of oncogenic transformation of primary rat embryo fibroblasts. *Oncogene.* 2000; *19*: 1173-1180
136. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ et al. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; *17*: 229-237
137. Slee EA, Arain C, Martin JM et al. Executioner Caspase 3, 6 and 7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem.* 2001; *276*: 7320-7326
138. Soares S, Kristinsson KG, Musser JM et al. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s. *J Infect Dis.* 1993; *168*: 158-163
139. Sorimachi H, Ishura S, Suzuki K et al. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.* 1997; *328*: 721-732
140. Spreer A, Kerstan H, Bottcher T et al. Reduced release of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* in vitro and in vivo after treatment with nonbacteriolytic antibiotics in comparison to ceftriaxon. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; *47*: 2649-2654
141. Stenson-Cox C, Fitz-Gerald U, Samali A et al. In the cut and thrust of apoptosis, serine proteases come of age. *Biochem Pharmacol.* 2003; *66*: 1469-1474
142. Stephan H, Polzar B and Mannherz HG. Sein oder nicht sein? *Naturwiss Rundsch.* 2000; *53*: 273-261
143. Strasser A, O'Conner L, Dixit VM et al. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem.* 2000; *69*: 217-245
144. Stryer Lubert: *Biochemie.* 5 Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, 1991

145. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing-factor. *Nature*. 1999; 397: 441-446
146. Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA et al. Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: Multiple interleukin 1 $\beta$  converting enzym- related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 1996; 93: 8395-8400
147. Tang D, Lahti JM, Grenat J et al. Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated Death Domain-dependent mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999; Vol. 274: Nr. 11: 7245-7252
148. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ et al. Caspase 8 activation and Bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase 3 dependent manner during staurosporine mediated apoptosis. *J Biol Chem*. 2000; 275: 9303-9307
149. Taylor-Robinson D. Chlamydia pneumoniae in vascular tissue. . *Atherosclerosis*. 1998; 140: S21-S24
150. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998; 281: 1312-1216
151. Tiraby JG and Fox MS. Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1973; 70: 3541-3545
152. Trapani JA, Davis J, Sutton VR et al. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 322-329
153. Troy CM and Salvesen GS. Caspases on the brain. *J Neurosci Res*. 2002; 69: 145-150
154. Tuomanen EI. Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine*. 2001; 19: S38-S40
155. Tuomanen EI. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr Opin Microbiol*. 1999; 2: 35-39

156. Vaux LD und Korsmeyer ST. Cell death in Development. *Cell*. 1999; *96*: 245-254
157. Vaux DL, Haecker G, Strasser A et al. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*. 1994; *76*: 777-779
158. Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricians*). Solothurn, Switzerland: Jent und Gassman. 1842
159. Waltman WD, Mc Daniel LS, Gray BM et al. Variation in the molecular weight of PspA (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*. 1990; *8*: 61-69
160. Wang R, Alam G, Zagariya A et al. Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF- $\alpha$  requires angiotensin II generation de novo. *Journal of Cellular Physiology*. 2000; *185*: 253-259
161. Wang J and Lenardo MJ. Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Scie*. 2000; *113*: 753-757
162. Wang KK. Calpain and caspases: can you tell the difference? *Trends Neurosci*. 2000; *23*: 20-26
163. Wang K, Yin XM, Chao DT et al. BID: a novel BH3 domain- only death agonist. *Genes Develop*. 1996; *10*: 2859-2869
164. Whitney CG, Farley M, Hadler J et al. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in United States. *N Engl J Med*. 2000; *343*: 1917-1924
165. Wolf BB. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*. 1999; *94*: 1683-1692
166. Wolf BB and Green DR. Apoptosis: Letting slip the dogs of war. *Curr Biol*. 2002; *12*: R177- R179
167. Wood DE and Newcomb EW. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. 1999; *274*: 8309-8315

168. Wood DE, Thomas A, Devi LA et al. Bax cleavages mediated by calpain during drug induced apoptosis. *Oncogene*. 1998; 17: 1069-1078
169. Wolter KG, Hsu YT, Smith CL et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*. 1997; 139: 1281-1290.
170. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ et al. BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 14559-14563
171. Yaoita H, Ogawa K, Maehora K et al. Apoptosis in relevant clinical situations-contribution to apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2000; 45: 630-637
172. Yin X-M, Wang K, Gross A et al. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature*. 1999; 400: 886-891
173. Yother J and White JM. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol*. 1994; 176: 2976-2985
174. Zamzami N and Kroemer G. Mitochondria in apoptosis. How Pandora's box opens. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2: 67-71
175. Zheng TS, Hunot S, Kuida K et al. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspases activation. *Nat Med*. 2000; 6: 1241-1247
176. Zychlinsky A and Sansonetti P. Perspectives Series: Host/Pathogen Interaction. Apoptosis in Bacterial Pathogenesis. *J Clin Invest*. 1997; 100: 493-496
177. Zysk G, Bejo L, Schneider-Wald BK et al. Induktion of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Exp Immunol*. 2000; 122: 61-66
178. Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH et al. Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2001; 69: 845-852

## 6 Anhang

### 6.1 Publikationen

Originalarbeit:

Schmeck, B., **Gross, R.**, N`Guessan, P., Hocke A. C., Hammerschmidt S., Mitchell T. J., Rosseau S., Suttorp N. and Hippenstiel S.: *Streptococcus pneumoniae-Induced Caspase 6-Dependent Apoptosis in Lung Epithelium*. Infection and Immunity, 2004, Vol. 72, p. 4940-4947

Vortrag:

**Gross, R.**, Schmeck, B., , N`Guessan, P., Hocke A. C., Hammerschmidt S., Mitchell T. J., Rosseau S., Suttorp N. and Hippenstiel S: 2003 „*S. Pneumoniae* induces apoptosis in alveolar epithelial cells via caspase activation“ 14<sup>th</sup> European Students' Conference Charité in Berlin

## **6.2 Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. N. Suttorp, dem Direktor der Klinik für Infektiologie und Herrn PD Dr. med. S. Hippenstiel, dem Leiter des Forschungslabors, die beide die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten. Zu besonderem Dank bin ich Herrn PD Dr. med. B. Schmeck verpflichtet. In der gemeinsamen Arbeit an diesem Projekt habe ich ihn als sehr guten Betreuer kennen und schätzen gelernt. Sein Einsatz für das Gelingen dieser Arbeit ist besonders anzuerkennen. Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern aus dem Labor, die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben.

### **6.3 Curriculum vitae**

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Fassung Arbeit nicht veröffentlicht.

#### **6.4 Erklärung an Eides Statt**

Diese Dissertation mit dem Thema: „*Streptococcus pneumoniae* induziert Apoptose in Lungenepithelzellen“ ist von mir, Ralph Torsten Gross, selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst worden. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Magdeburg, den 10. September 2008

Unterschrift