

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

DISSERTATION

**Molekulare Mechanismen der *Streptococcus pneumoniae*-induzierten
endothelialen Apoptose**

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

**vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

von

Abena Obenewaa Ayim

aus Nkawkaw, Ghana

Datum der Promotion: 22. 06. 2014

Für meine Eltern

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

a. bidest	Aqua bidestillata
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
ASK 1	<i>Apoptosis Signal Regulating Kinase 1</i>
Bad	<i>Bcl-xL/Bcl-2-associated Death Promoter</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell Lymphoma Gene 2</i>
Bid	<i>BH-3 Interacting Domaine Death Agonist</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cfu/ml	<i>Colony forming units pro ml</i>
Ced 3	<i>Caenorhabditis elegans cell death gene</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECBM	<i>Endothel Cell Basal Medium</i>
ECGF	<i>Endothel Cell Growth Factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinases</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
FasL	Fas ligand
FCS	Fetales Kälberserum
H/H –/–	Hanks-HEPES-Puffer ohne Kalzium und Magnesium
H/H +/-	Hanks-HEPES-Puffer mit Kalzium und ohne Magnesium
HBSS	Hanks gepufferte Salzlösung
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
HUVEC	Humane umbilikal-venöse Endothelzellen
ICAD	<i>Inhibitor of CAspase Activated Desoxyribonuclease</i>
JNK	Jun N-terminale Kinase
kD	Kilodalton

LDH	Laktatdehydrogenase
MAP-Kinase	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEKK	<i>Mammalian mitogen activated Kinase Kinase</i>
min	Minuten
MLK	<i>Mixed Lineage Kinase</i>
NAC	N-Acetyl-L-Cysteine
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PI	Propidiumiodid
p38	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
PKA	<i>cAMP dependent Proteinkinase</i>
RAF	<i>Rapidly growing Fibrosarcoma Protein</i>
RFU	<i>Relative Fluorescens Unit</i>
RT	Raumtemperatur
SAPK	Stress aktivierte Proteinkinase
SDS	Natriumdodecylsulfat/Laurylsulfat
St	Staurosporin
T75	Zellkulturflasche mit 75 cm ² Kulturfläche
TAK	<i>Transforming growth factor activated Kinase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
ZVAD-FMK	Benzyloxy-Valin-Alanin-Aspartat-O-Methyl-Fluoromethylketon

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung der Virulenzmerkmale von <i>S. pneumoniae</i> mit ihrer Lokalisation und Funktion	9
Abb. 1.2:	Charakteristische Veränderung einer Zelle im Verlauf der Apoptose	12
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Fas-bedingten Apoptose der Typ-I- und Typ-II-Zelle	14
Abb. 1.4:	Mechanismus der Caspasenaktivierung	166
Abb. 1.5:	Struktureller Vergleich der Mitglieder der Bcl-2-Familie	19
Abb. 1.6:	Die MAPK-Kinase-Signalwege	21
Abb. 3.1 A:	Zeit und Dosis abhängiger Apoptose in mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> infizierten HUVEC	38
Abb. 3.1 B:	Detektion der DNS-Fragmente durch Tunelfärbung	39
Abb. 3.1 C:	Färbung der Zelle mit Annexin V und Propidiumiodid	40
Abb. 3.2 A:	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6x-bedingte endotheliale Apoptose ist Pneumolysin-abhängig	41
Abb. 3.2 B:	<i>S.-pneumoniae</i> -Kapsel führt zu erhöhter LDH-Ausschüttung in HUVEC	41
Abb. 3.2 C:	<i>S. pneumoniae</i> R6x-bedingte endotheliale Apoptose ist zum Teil Wasserstoffperoxid-abhängig	42
Abb. 3.2 D:	D39-bedingte Nekrose ist zum Teil Wasserstoffperoxid-abhängig	43
Abb. 3.3 A:	R6x induziert Caspasen-abhängige Apoptose in HUVEC	44
Abb. 3.3 B:	R6x aktiviert Caspase 3	44
Abb. 3.3 C:	R6X aktiviert Caspase 9	45
Abb. 3.3 D:	R6X aktiviert Caspase 6	45
Abb. 3.4:	R6x induziert sowohl Bcl-2 als auch AIF in HUVEC	46
Abb. 3.5 A–C:	cAMP-Zunahme blockiert sowohl die Pneumokokken-bedingte Aktivierung der Caspasen 6 und 9 als auch die Apoptoseinduktion	47
Abb. 3.6 A-B:	R6x reduziert endotheliale Apoptose in p38- und JNK-abhängiger Aktivierung	49

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... I

ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... i

ABSTRAKT..... 5

1. Einleitung.....7

1.1 *Streptococcus pneumoniae*.....7

1.1.2 Epidemiologie8

1.1.3 Virulenzfaktoren der Pneumokokken8

1.2 Apoptose.....11

1.2.1 Merkmale des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose).....11

1.2.2 Molekulare Grundlagen der Apoptose13

1.2.3 Zelltodrezeptor13

1.2.4 Caspasen-zentrale Mediatoren der Apoptose.....15

1.2.5 Apoptoseinduktion durch direkte Aktivierung der Mitochondrien.....17

1.2.5.1 Bcl-2-Familien18

1.2.5.2 Apoptosis Inducing Factor (AIF).....19

1.3 *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK).....20

1.4 Die Bedeutung von cAMP für die Apoptose23

1.5 Zielsetzung der Arbeit24

2 Materialien und Methoden.....25

2.1 Materialien25

2.1.1 Chemikalien25

2.1.2 Kulturmedium.....266

2.1.3 Puffer und Lösungen.....26

2.1.4 Western Blot27

2.1.5 Bakterienstämme (*S. pneumoniae*).....29

2.1.6 Zubehör30

2.1.7 Spezielle Geräte30

2.1.8 Antikörper für Western Blot.....30

2.2 Methoden31

2.2.1	Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC).....	31
2.2.2	Herstellung der Bakterienkulturen.....	31
2.2.3	Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA	32
2.2.4	Messung der Laktatdehydrogenase.....	32
2.2.5	Fluorimetrische Aktivitätsmessung der HTS- Caspasen 3,6 und 9	33
2.2.6	Immunhistochemische Apoptosebestimmung	33
2.2.7	Annexin-V-Färbung.....	34
2.2.8	Western Blot	35
2.2.9	Statistische Auswertung.....	37
3	Ergebnisse.....	38
3.1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> R6x induziert endotheliale Apoptose in HUVEC ..	38
3.2	Kapsel und Pneumolysineigenschaften der Pneumokokken beeinflussen die Induktion von Apoptose in HUVEC	40
3.3	<i>S. pneumoniae</i> R6x induziert Caspase-6- und Caspase-9-abhängige endotheliale Apoptose	43
3.4	Beim endothelialen Zelltod kommt es zur Reduzierung der antiapoptotischen Bcl-2 und zur zytosolischen AIF-Erhöhung	46
3.5	<i>S. pneumoniae</i> -R6x-induzierter Zelltod ist durch cAMP-Expression blockierbar	47
7		
3.6	<i>S.pneumoniae</i> - R6x-induzierte endotheliale Apoptose beruht auf p38- und JNK Aktivierung.....	48
4	Diskussion und Zusammenfassung.....	51
4.1	Nachweis des programmierten Zelltods nach Infektion umbilikaler Endothelzellen mit Pneumokokken.....	51
4.2	Induktion endothelialer Apoptose durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Bedeutung von Pneumolysin.....	52
4.3	Induktion endothelialer Nekrose durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Bedeutung von der Kapsel.....	53
4.4	Signaltransduktion der Apoptose in <i>S. Pneumoniae</i> infizierten Zellen	54
4.4.1	Bedeutung von Caspasen.....	54

4.4.2	Mitochondriale Proteine: Rolle von Bcl2.....	56
4.4.3	Mitochondriale Proteine: Rolle von AIF	57
4.4.4	Bedeutung von MAPK-Kinase.....	588
4.5	Einfluss von cAMP auf <i>S.-pneumoniae</i> -induzierte Apoptose	58
4.6	Zusammenfassung und Ausblick	59
5	Literaturverzeichnis.....	61
6	Anhang.....	88
6.1	Publikation	88
6.2	Danksagung.....	89
6.3	Curriculum Vitae	90
6.4	Erklärung an Eides Statt	91

Streptococcus pneumoniae ist ein wichtiger aggressiver, pathogener Erreger, der häufig bakterielle Meningitis sowie Pneumonie und Sepsis verursacht. Die Pneumokokken Infektion sowie die Virulenz hängt von der Ausprägung der Kapsel ab. Als Zielscheibe wird das Endothel durch Pneumokokken und seine Virulenzfaktoren während der Pneumokokken Infektion ausgerichtet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Kontrollmechanismen der durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten endothelialen Apoptose zu untersuchen. Dazu wurden primär kultivierte humane Endothelzellen (HUVEC) mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Anschließend wurden verschiedene Merkmale in Bezug auf Apoptose und deren Kontrollmechanismen quantifiziert. Während die unbekapselten Pneumokokken (*R6x*) zeit- und dosisabhängige Apoptose in HUVEC auslösten, führte die Exposition gegenüber bekapselten Stämmen zu Nekrose. Die Deletion des Pneumolysingens in *R6x* führte zu verminderter Apoptose. In apoptotischen Endothelzellen waren vermehrte Caspaseaktivitäten nachweisbar und der Pancaspaseinhibitor zVAD blockierte eine Pneumokokken-induzierte Apoptose. Ebenso führte die Erhöhung von cAMP zur Blockierung von Pneumokokken-induzierter Apoptose. Die Pneumokokken-induzierte Apoptose der Endothelzellen reduzierte das Bcl-2-Protein und induzierte eine AIF-Ausschüttung sowie die Aktivierung der Caspasen 6 und 9. Pneumokokken aktivierten in Endothelzellen die p38-MAPK- und -JNK-Kinase. Die chemische Inhibition der p38 (SB202190) oder JNK (SP600125) reduzierte Pneumokokken-induzierte Apoptose, während inaktive Kontrollsubstanzen ohne Effekt waren. Die Kenntnis der Pneumokokken-bedingte Apoptose der Endothelzellen könnte signifikant zur Klärung der Pathogenität von Pneumokokkenkrankung beitragen.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um genauere Einblicke in das komplexe Geschehen der Apoptose zu erlangen. So können nicht nur neue potenzielle Zielproteine zur Therapie von Erkrankungen gefunden, sondern auch grundlegende biochemische und molekulare Mechanismen von *Streptococcus pneumoniae* in Endothelzellen besser verstanden werden. Darüber hinaus sollten durch In-vivo-Untersuchungen die Ergebnisse der In-vitro-Experimente vertieft werden.

Streptococcus pneumoniae is the major pathogen of community-acquired pneumonia and a common cause of otitis, meningitis and sepsis. During pneumococci infection accompanied with bacterial invasion and hematogeneous spreading, the endothelium is directly targeted by pneumococci and their virulence factors. Therefore, we tested the hypothesis that pneumococci induced endothelial apoptosis. Unencapsulated R6x pneumococci strongly induced apoptosis of human endothelial cells from umbilical vein, whereas an encapsulated mainly led to necrotic cell death. Deletion of the gene coding for pneumolysin reduced pneumococci-induced apoptosis in HUVEC. Furthermore, N-acetyl-L-cysteine, an antioxidant thiol, significantly reduced apoptosis caused by R6x implicating a role of reactive oxygen species in pathogenesis. Apoptotic cells showed increased cleavage and activity of caspases 6 and 9. Programmed cell death could be strongly reduced by pan-caspase inhibitor zVAD. Caspase activation and apoptosis were abolished by cAMP elevation. Moreover, p38 (SB202190) mitogen-activated protein kinase and c-Jun (SP600125) NH₂-terminal kinase were activated in pneumococci-infected cells and inhibitors of both kinases strongly reduced pneumococci-induced caspase activation and apoptosis. In conclusion, kinase- and caspase dependence of pneumococci-induced endothelial apoptosis may implicate a new therapeutical access to pneumococci-related disease.

1 Einleitung

Das Endothel stellt den luminären Anteil der Gefäßwand dar. Es dient es als Monolayer zwischen Blut und Gewebe (Sumpio et al., 2002) und besitzt eine Fläche von mehr als 1000 m². Das Endothel besteht aus ca. 10¹² Einzelzellen und hat ungefähr 0,1 kg Gesamtmasse (Augustin et al., 1994, Jaffe, 1987). Es übt eine vielseitige Funktion aus. Neben seiner Bedeutung für die selektive Permeabilität beteiligt es sich an der Regulation von Gefäßtonus und Blutfluss als auch an der Homöostase von Gerinnung und Fibrinolyse (Goligorsky et al., 2009). Das Endothel wirkt immunmodulatorisch und nimmt an der Regulation von Inflammation und Abwehr teil (Aird, 2003). Bei Entzündungsprozessen, insbesondere der Sepsis, ist diese Funktion gestört. Es kommt zu starken Permeabilitätsveränderungen (Hippenstiel and Suttorp, 2003).

Die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), das identisch ist mit Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), und die Bildung von Endothelin sind die bedeutenderen Mediatoren der endothelialen Regulation des Gefäßtonus. Des Weiteren beeinflusst es die Strömung durch das Gefäßsystem und die Fließfähigkeit, unter anderem durch Hemmung und Aktivierung von Gerinnungsprozessen. Somit hat eine Endotheldysfunktion stets gravierende pathologische Folgen. Obwohl Endothelzellen im Rahmen einer Pneumokokkensepsis Zielzellen sind, ist die Interaktion zwischen beiden Einheiten unzureichend geklärt.

1.1 Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) sind grampositive, ovale bis lanzettförmige Kokken, die meist in Paaren angeordnet sind. Aufgrund dieser morphologischen Anordnung wurden Pneumokokken zunächst als *Diplococcus pneumoniae* in der Literatur beschrieben (Shulman, 2002; Fraenkel und Weichselbaum, 1886). Pneumokokken sind bekapselt oder unbekapselt, unbeweglich und nicht sporulierend. Während der Kultivierung auf Blutagar bilden sie α -hämolytische Kolonien mit grünem Hämolysehof aus (Hahn et al., 2004; Kayser et al., 1997). Das Wachstums- und Temperaturoptimum liegt bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5–10 % und einem pH-Wert von 7,4. Erstmals wurden 1874 kettenförmige Kokken als „Streptokokken“ in der Literatur beschrieben (Billroth, 1874). Viele Streptokokken sind harmlose Kommensalen, jedoch gibt es ebenfalls hoch virulente Krankheitserreger, die sowohl

bei Tieren als auch beim Menschen schnell zum Tode führen können. Zu den humanen Krankheitserregern gehört *Streptococcus pneumoniae*. Eine Klassifizierung von *S. pneumoniae* erfolgte aufgrund der chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide, die zur sogenannten „Dänischen Nomenklatur“ mit bisher 90 Serotypen führte (Black S., 2010; Lund und Henrichsen, 1987; Henrichsen, 1995).

1.1.2 Epidemiologie

Streptococcus pneumoniae ist ein wichtiger aggressiver, pathogener Erreger, der vor allem bei Erwachsenen und Kindern häufig bakterielle Meningitis sowie Pneumonie und Sepsis verursacht (Davachi et al., 2002; Schuchat, 1997; Aronin, 1998). Trotz des therapeutischen Einsatzes von Antibiotika bei dieser Erkrankung nimmt die Mortalitätsrate nicht ab (Durand, 1993).

Von Bedeutung ist, dass in den letzten Jahren eine zunehmende Antibiotikaresistenz bei *S. pneumoniae* beobachtet wird. Beispielsweise haben sich die Resistenzraten gegenüber Penicillin in Nordamerika von unter 0,02 % im Jahre 1987 auf 3 % im Jahre 1994 und über 30 % in manchen Kommunen der USA vervielfacht (Breiman, 1998). In Deutschland aber liegt die Resistenz bei 6,3% (Höffgken G. et al. 2009). Durch diese fulminante Resistenzentwicklung ist davon auszugehen, dass Pneumokokken trotz antibiotischer Therapie in Zukunft langanhaltend im Körper des Patienten überleben werden (Reinert et al., 2005; Mufson und Stanek, 1999). Demzufolge sind von größter Bedeutung die bakteriellen Toxine, die freigesetzt werden (Fiore, 2000). Nach Tomasz führt die Therapie mit Antibiotika zu einer Freisetzung von Zellwandbestandteilen von *S. pneumoniae*. Durch Initiation einer Inflammationskaskade werden einen großen Teil der Schädigung in Pneumokokken-bedingten Erkrankungen verantwortlich gemacht (Tomasz, 1989).

1.1.3 Virulenzfaktoren der Pneumokokken

Das grampositive Bakterium *S. pneumoniae* besitzt eine Vielzahl von Virulenzmerkmalen (vgl. Abb. 1.1), wie das Oberflächenprotein Autolysin sowie intrazelluläre Proteine, wie Wasserstoffperoxid und Pneumolysin (Freyer, 1999; Mitchell, 2000). Die Virulenz hängt von der Ausprägung der Kapsel ab. Bekapselte Stämme sind um das 10^5 virulenter als die unbekapselten Varianten (Watson und

Musher, 1990). Die Virulenzfaktoren Kapseln, Pneumolysin und Wasserstoffperoxid waren Gegenstand dieser Studie, daher werden Sie im Detail beschrieben.

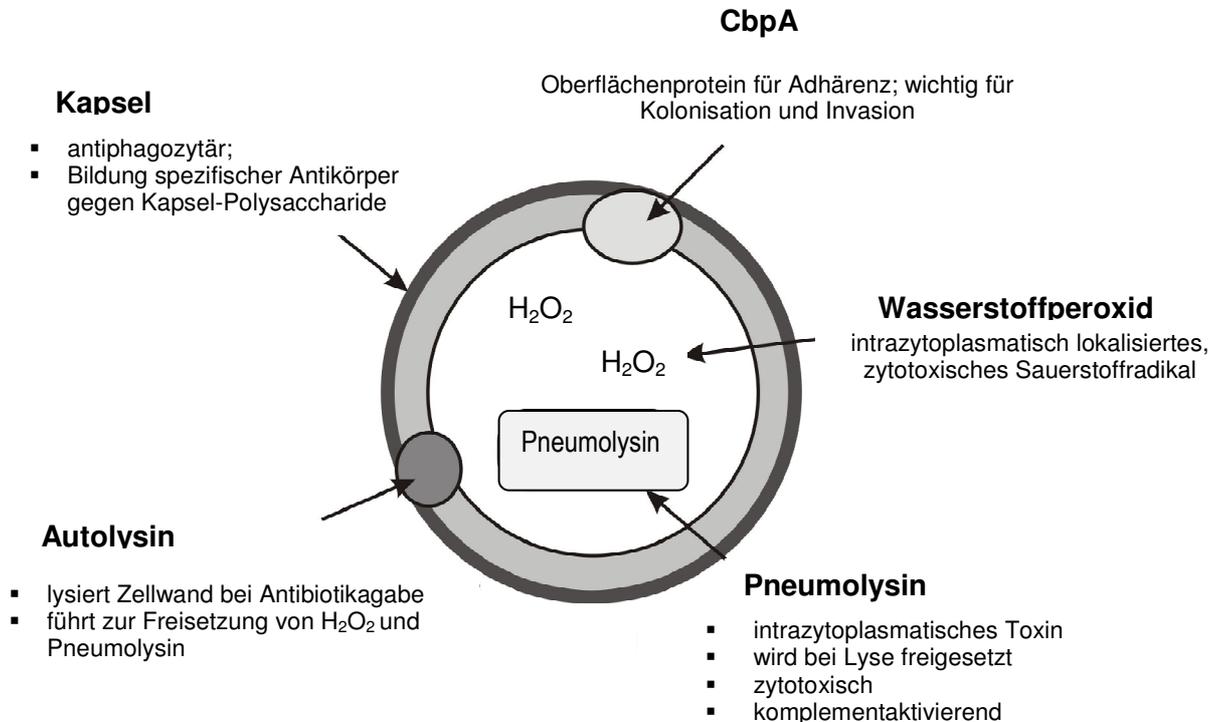


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Virulenzmerkmale von *S. pneumoniae* mit ihrer Lokalisation und Funktion (in Anlehnung an Mitchell, 2000)

Kapsel

Als wichtiger Virulenzfaktor des Pneumokokkus ist die Kapsel bekannt. Avery und Mitarbeiter zeigten, dass die lösliche Substanz, die den Pneumokokkus umgibt, aus Polysacchariden zusammengesetzt ist. Die Kapsel besteht aus repetitiven Oligomeren, die über Phosphodiesterbindungen verbunden sind. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Antigenität werden heute über 90 Serotypen unterschieden. Studien zeigten eine deutliche Assoziation der Kapsel mit der Virulenz der Pneumokokken, wobei nichtbekapselte Varianten eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber Phagozytose hatten (Avery und Dubois, 1931). Die Funktion der Kapsel beruht auf der Verhinderung der Phagozytose. Die Kapsel scheint zwar keine nennenswerte Rolle bei Adhärenz, Invasion oder Induktion der Entzündungsreaktion zu spielen, sie verhindert jedoch eine Oponisierung (Chudwin et al., 1985) und somit eine Aktivierung der Komplementkaskade (de Velasco et al., 1995).

Die Zellwand der Pneumokokken setzt sich aus einem Peptidoglykangerüst zusammen, das aus verknüpften N-Acetylmuraminsäuren und N-Acetylglukosaminen besteht. Die einzelnen Muraminsäureglieder sind über Aminosäuren peptidisch verknüpft (Schlegel, 1992). An diese Peptidoglykanschicht ist Phosphorylcholin gebunden, das mit Teichonsäure verbunden ist. Die Zellwand trägt bei unbekapselten Pneumokokken zur Adhäsion an humane Endothelzellen bei, indem sie eine „prokoagulierende Aktivität“ (PCA) auf humanen Endothelzellen induziert (Geelen et al., 1993).

Phosphorylcholin als Bestandteil der Plasmamembran-assoziierten Lipoteichonsäure (LTA) stellt zum anderen die Bindungsstelle für die sogenannten cholinbindenden Proteine der Pneumokokken dar (Garcia et al., 1994; Briese und Hakenbeck, 1985; Leon und Young, 1971; Gotschlich und Liu, 1967). Ebenso sind in der Zellwand Sialinsäuren zu finden, die auch bei weiteren Meningitisserregern, wie Gruppe-B-Streptokokken (GBS) (Wessels et al. 1989) und den humanpathogenen Neisseria-Spezies eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen. Bei Meningokokken vermitteln sie eine Resistenz gegenüber dem Immunsystem, indem sie den alternativen Weg des Komplementsystems aktivieren und regulieren (Ram et al., 1998).

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

S. pneumoniae fehlt die Wasserstoffperoxid-abbauende Enzymkatalase. Deshalb entsteht eine hohe H₂O₂-Konzentration, die mit der in neutrophilen Granulozyten vergleichbar ist. Diese setzen H₂O₂ als Pathogenitätsfaktor ein (Braun, 2002; Duane, 1993). Hirst et al. beschreiben in einem Modell die pathogenetische Bedeutung des freigesetzten H₂O₂ in alveolären Epithelzellen (Hirst et al., 2000). Möglich ist, dass H₂O₂ in die Wirtszelle diffundiert und über einen oxidativen Schaden den programmierten Zelltod induziert (Cochrane, 1991; Chandra, 2000). Neuere Studien mit Gehirnzellen (Freyer, 1999; Braun, 2002), Leukozyten (Zysk et al., 2000) und Lungenepithelien (Schmeck et al., 2004) demonstrieren, dass Pneumokokken über H₂O₂ den programmierten Zelltod durch verschiedene und spezifische Mechanismen induzieren.

Pneumolysin

Pneumolysin ist im Zytoplasma von *S. pneumoniae* lokalisiert. Dem Toxin, ein thiol-aktiviertes Zytolysin, fehlt eine sekretorische Signalsequenz, sodass Pneumolysin nicht aktiv sezerniert, sondern erst nach der Autolyse freigesetzt wird (Cockeran, 2002). Für die Virulenz ist es wichtig, seine Fähigkeit zur Zellyse und das klassische

Komplementsystem durch die Bindung an den Fc-Teil von IgG zu aktivieren (Mitchell, 2000).

1.2 Apoptose

Bis vor einigen Jahren hat man den Zelltod als ein Ereignis betrachtet, das für den Organismus grundsätzlich negativ ist. Der programmierte Zelltod besitzt jedoch eine wichtige regulatorische Funktion während der Entwicklung und Erhaltung des Organismus und stellt damit einen zentralen Teil des Lebens dar. Die nicht inflammatorische Eliminierung von Zellen durch Apoptose ist ein wichtiger Prozess bei der embryonalen Entwicklung und dient damit auch der Immuntoleranz in adulten Organismen (Golstein et al., 1991; Kroemer et al., 1998).

1.2.1 Merkmale des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose)

Mehrere Millionen überzählige, gealterte oder beschädigte Zellen des menschlichen Körpers sterben täglich durch Apoptose (Kroemer et al., 1998). Störungen bei diesen Prozessen können verschiedene Erkrankungen zur Folge haben. So bedingt eine vermehrte Apoptose in Organen die Entstehung von neurodegenerativen Krankheiten, wie Alzheimer, Parkinson, BSE (*Bovine spongiforme Enzephalopathie*), AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) sowie andere virale und bakterielle Infektionen (Evan et al., 2001; Engidawork et al., 2001; Gougeon, 1997). Eine zu niedrige Apoptoserate führt zu Autoimmunstörungen, Diabetes und Nierenerkrankungen, Systemischer Lupus erythematodes (SLE) (Reed et al., 2002). Um solche Störungen möglichst zu vermeiden, ist der Prozess der Apoptose sehr genau kontrolliert.

Man unterscheidet zwei Arten des Zelltods: die Nekrose und die Apoptose. Zu Beginn der 70er-Jahre wurde eine Form des Zelltods beschrieben, die sich deutlich von der Nekrose unterscheidet (Kerr, 1972). Später wurden beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* die ersten Gene entdeckt, die für die Apoptose verantwortlich sind (Hengartner et al., 2000). Durch Mutationen wurden die Gene gefunden, die für die Induktion der Apoptose während der Entwicklung essenziell sind (Sulston und Horvitz, 1977). Nekrose wird durch die Aktivierung des Komplementsystems, durch Infarkte oder durch bestimmte Chemikalien ausgelöst. Dies führt zur Ausschüttung des Zellinhalts in die Umgebung der Zelle sowie zu inflammatorischen Reaktionen und somit zur Schädigung des umgebenden Gewebes (Kroemer et al., 1998; Golstein et al., 1991; Afanas'ev et al., 1986). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver, regulierter Prozess.

Sie wird daher auch als programmierter, physiologischer oder regulierter Zelltod bezeichnet. Nach Apoptoseinduktion finden morphologische Veränderungen statt: die Zellbestandteile werden in charakteristischer Weise zerkleinert, in sogenannte apoptotische Körperchen verpackt und schließlich durch Zellen des Immunsystems phagozytiert, sodass Entzündungsreaktionen vermieden werden (Leist et al., 2001; Voll et al., 1997). Auch molekulare Änderungen, wie internukleosomale DNA-Fragmentierung (Wyllie et al., 1984) und eine Umverteilung des Phosphatidylserin von der intrazellulären zur extrazellulären Seite der Plasmamembran (Fadok, 1998) können in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Im Verlauf der Apoptose (vgl. Abb. 1.2) werden definierte Signaltransduktionswege aktiviert. Pro- und antiapoptotische Moleküle greifen regulierend in diesen Prozess ein.

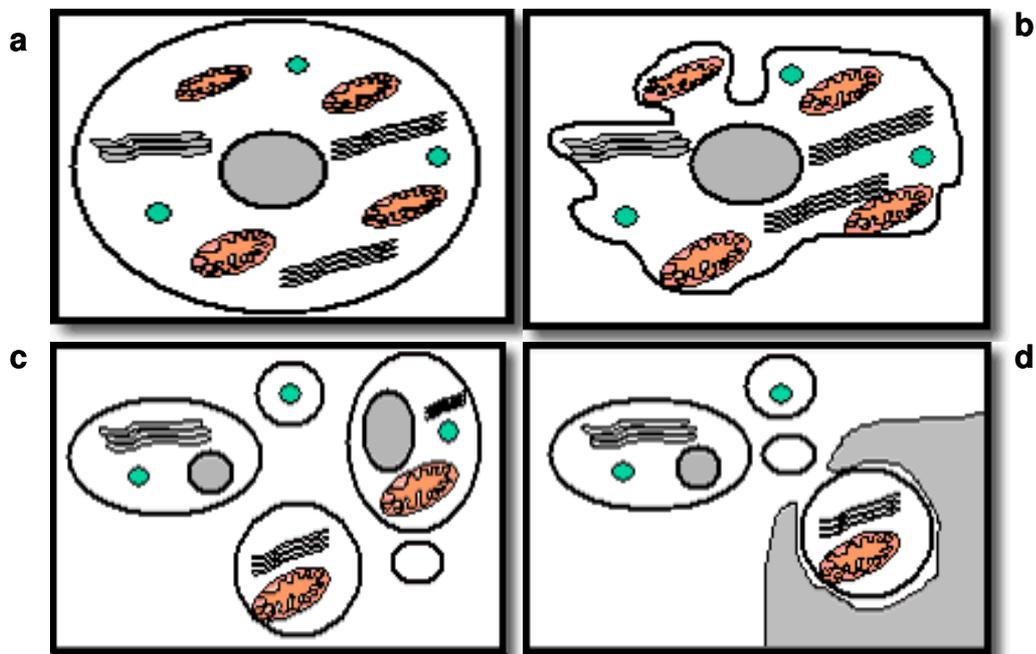


Abb. 1.2: Charakteristische Veränderung einer Zelle im Verlauf der Apoptose

Normale Zelle (a). Zunächst schrumpft die Zelle, das Zytoplasma und Chromatin kondensieren (b). Im weiteren Verlauf wird der Zellkern fragmentiert. Vesikel werden von der Cytoplasmamembran abgeschnürt (c). Der apoptotische Körper wird von Makrophagen phagozytiert und schließlich lysosomal verdaut (d) (Abbildung modifiziert nach Kerr et al., 1994).

1.2.2 Molekulare Grundlagen der Apoptose

Apoptose ist ein genetisch regulierter, aktiver biochemischer Prozess und kann durch das Auftreten proapoptotischer bzw. durch den Verlust antiapoptotischer Signale und die Aktivierung bestimmter Proteasen (Caspasen) ausgelöst bzw. vermittelt werden (Ellis et al., 1991). Diese aktivieren sich gegenseitig und amplifizieren auf diese Weise das proapoptotische Signal. Sie spalten zahlreiche Strukturproteine und Enzyme und bedingen so die charakteristischen morphologischen Veränderungen. Das Programm der Apoptose kann über zwei verschiedene Wege ausgelöst werden: einerseits durch extrazelluläre Liganden, wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) oder Fas Ligand (FasL) bei der exogen rezeptorvermittelten Apoptoseinduktion, oder durch bestimmte endogene Signale, die spezifische mitochondriale Veränderungen hervorrufen und auf diese Weise Caspasen-abhängig oder -unabhängig zum programmierten Zelltod führen.

1.2.3 Zelltodrezeptor

Die Zelltodrezeptoren gehören zur Familie der TNF-Rezeptoren. Im Jahr 1975 beobachtete man nach der Zugabe eines bestimmten, von Makrophagen produzierten Faktors, dem Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α), die Zerstörung bestimmter Tumorzellen (Carswell, 1975). TNF bindet an bestimmte Rezeptoren an der Zelloberfläche und induziert auf diese Weise Apoptose. Diese Rezeptoren sind Zelloberflächenrezeptoren und besitzen zwei bis sechs extrazelluläre cysteinreiche Domänen, über die sie ihre Liganden binden (Smith, 1994). Die übrigen Domänen übermitteln Signale, die zur Proliferation, zum Überleben und zur Differenzierung führen (Locksley et al., 2001). Die Zelltodrezeptoren besitzen weiterhin eine intrazelluläre Domäne (DD, *Death Domaine*), die unerlässlich für die apoptotische Signalübertragung ist (Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993). Die am besten charakterisierten apoptosevermittelnden Rezeptoren, die sogenannten Zelltodrezeptoren, sind der TNF-Rezeptor I (TNFR1/TNFRSF1A/p55/CD120a) und der Fas (TNFRSF6/APO-1/CD95)-Rezeptor (Locksley et al., 2001; Ashkenazi und Dixit, 1998). Das Fas, ein Transmembranprotein der TNF- α -Rezeptor-Subfamilie, ist das erste Mitglied einer Gruppe von „Todesrezeptoren“, die an der Weiterleitung von Todessignalen beteiligt sind (CD95/APO-1) (Daniel et al., 2001). Die Fas/FADD-vermittelte Apoptose (vgl. Abb. 1.3) ist ein dominierender Mechanismus für die Realisierung der Immunantwort. Diese wird durch den Fas/FADD-Liganden (FasL), ein TNF-verwandtes Transmembranprotein, ausgelöst. Er verfügt über eine sogenannte „Todes-Effektor-

Domäne“, wie sie auch in der Prodomäne von Procaspase 8 zu finden ist, und vermittelt die Anbindung der Procaspase an den sogenannten zelltodinduzierenden Signalkomplex (Chinnaiyan, 1995). Seine Bindung löst eine Rezeptortrimerisierung oder Oligomerisierung aus und führt zur Ausbildung des sogenannten Death Inducing Signaling Complex (DISC). Procaspase 8 wird proteolytisch aktiviert, und es entsteht aktive Caspase 8. Diese verlässt den Signalkomplex und aktiviert weitere Caspasen. Das proapoptotische Signal wird weitergeleitet (Ashkenazi 1998), entweder direkt zur Aktivierung der Effektorcaspase 3, oder es wird an der Mitochondrienmembran amplifiziert durch Caspase-8-vermittelte Spaltung des Bcl-2-Homologs Bid (Krammer, 2000; Li, 1998).

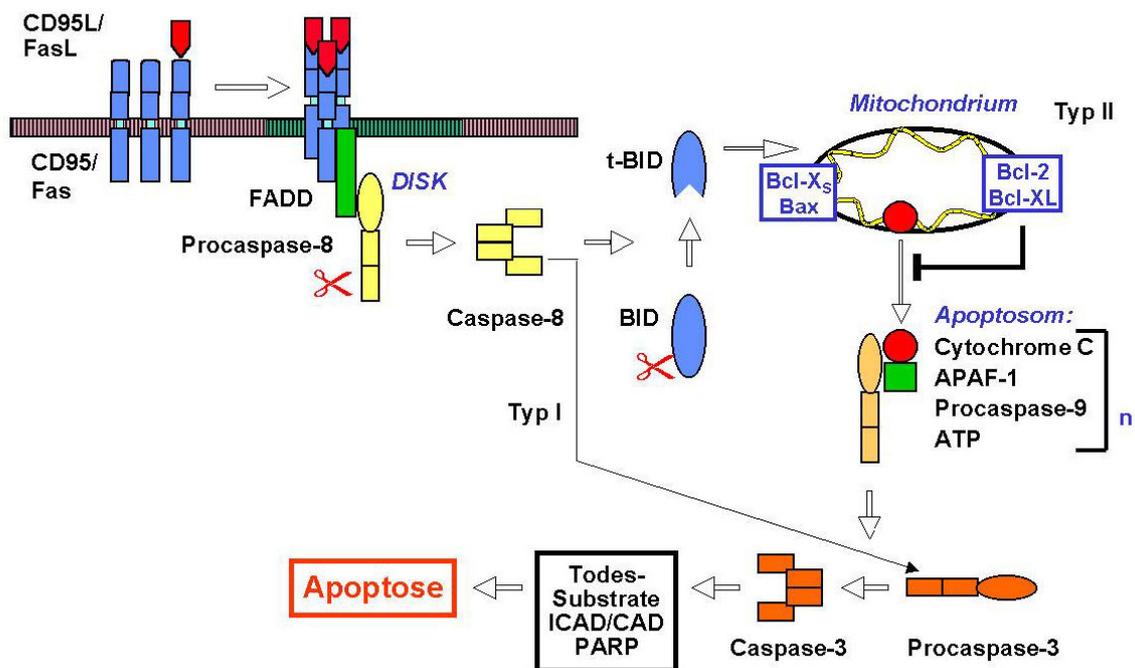


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Fas-bedingten Apoptose der Typ-I- und Typ-II-Zelle

Durch die Anbindung der Liganden trimerisiert der in der Cytoplasmamembran lokalisierte Rezeptor. Dieser rekrutiert Caspase 8 durch die Anlagerung des Adapterproteins FADD (Fas-associated protein with death domain). Über Proteininteraktionen der „Todes-Effektor-Domänen“ (*Death Effector Domains*, DED) wird die Anbindung von Procaspase 8 ermöglicht. Die Aktivierung von Caspase 8 erfolgt schneller in der Typ-I-Zelle, die direkt zur Caspase-3-Aktivierung führt. Die Aktivierung von Caspase 8 in der Typ-II-Zelle führt aber zur Bidspaltung. T-Bid translokalisiert in den Mitochondrien und führt dann zur Cytochrom-C-Ausschüttung aus der Zelle. Die Bindung von Cytochrom C und dATP mit Apaf-1 ermöglicht die Anbindung an der CARD der Procaspase 9. Diese bildet das Apoptosom. Caspase 3 wird schließlich aktiviert und führt anschließend zur Exekution von Apoptose (Daniel et al., 2001).

1.2.4 Caspasen-zentrale Mediatoren der Apoptose

Sowohl der rezeptorvermittelte als auch der mitochondriale Weg der Apoptoseinduktion mündet in die Aktivierung von Caspasen. In der Exekutionsphase werden spezifische Proteasen aktiviert, die lebenswichtige intrazelluläre Proteine abbauen (Porter et al., 1997). Caspasen (Cystein-Aspartat-Proteasen) sind wichtige Signalmoleküle im apoptotischen Prozess, die ihre Proteinsubstrate spezifisch und effizient an der Carboxyseite eines Aspartats schneiden. Die Familie der Caspasen umfasst allein bei Säugetieren mindestens 14 Homologa (Cohen, 1997), 12 davon wurden auch beim Menschen gefunden (Strasser et al., 2000; Nicholson, 1997). Diese werden nach ihrer Funktion in Cytokin-prozessierende Caspasen der Interleukin Converting Enzyme (ICE-Familie (Caspase 1, 4, 5, 11) und apoptotische Caspasen der Ced-3-Familie (*Caenorhabditis elegans* cell death genes) eingeteilt (Strasser et al., 2000; Wang J und Lenardo MJ, 2000). Caspasen werden als Zymogene synthetisiert, die eine N-terminale Prodomäne sowie jeweils eine große und eine kleine Untereinheit enthalten. Für die proteolytischen Prozesse zur Aktivierung der Caspasen (vgl. Abb. 1.4) bedarf es mindestens zweier aufeinanderfolgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander sowie von der Prodomäne zu trennen.

Die proteolytische Prozessierung, die spezifische Degradation zellulärer Komponenten und die Aktivierung der Caspasen stellen entscheidende Schritte im Apoptoseprozess dar (Miller, 1997; Nicholson und Thornberry, 1997; Alnemri et al., 1996). Die Apoptose-regulierenden Caspasen werden in die Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10, die sich durch eine verlängerte Prodomäne auszeichnen, und die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 unterteilt. Für die Aktivierung der Initiatorcaspasen sind die Prodomänen wichtig. Durch die Interaktion der Prodomänen mit Adaptermolekülen entstehen Homodimere, die gegenseitig eine Wechselwirkung eingehen. Die Adapterproteine selbst fungieren als Brücke zwischen Rezeptor und Caspasen (Li et al., 1997). Ihre Substrate sind die Effektorcaspasen, die ausschließlich durch Caspasen aktiviert werden (Hirata, 1998; Fernandes-Alnemri et al., 1996; Muzio et al., 1997). Diese Proteasen bewirken eine gegenseitige Spaltung (Muzio et al., 1998) und verstärken so das apoptotische Signal (Slee et al., 1999).

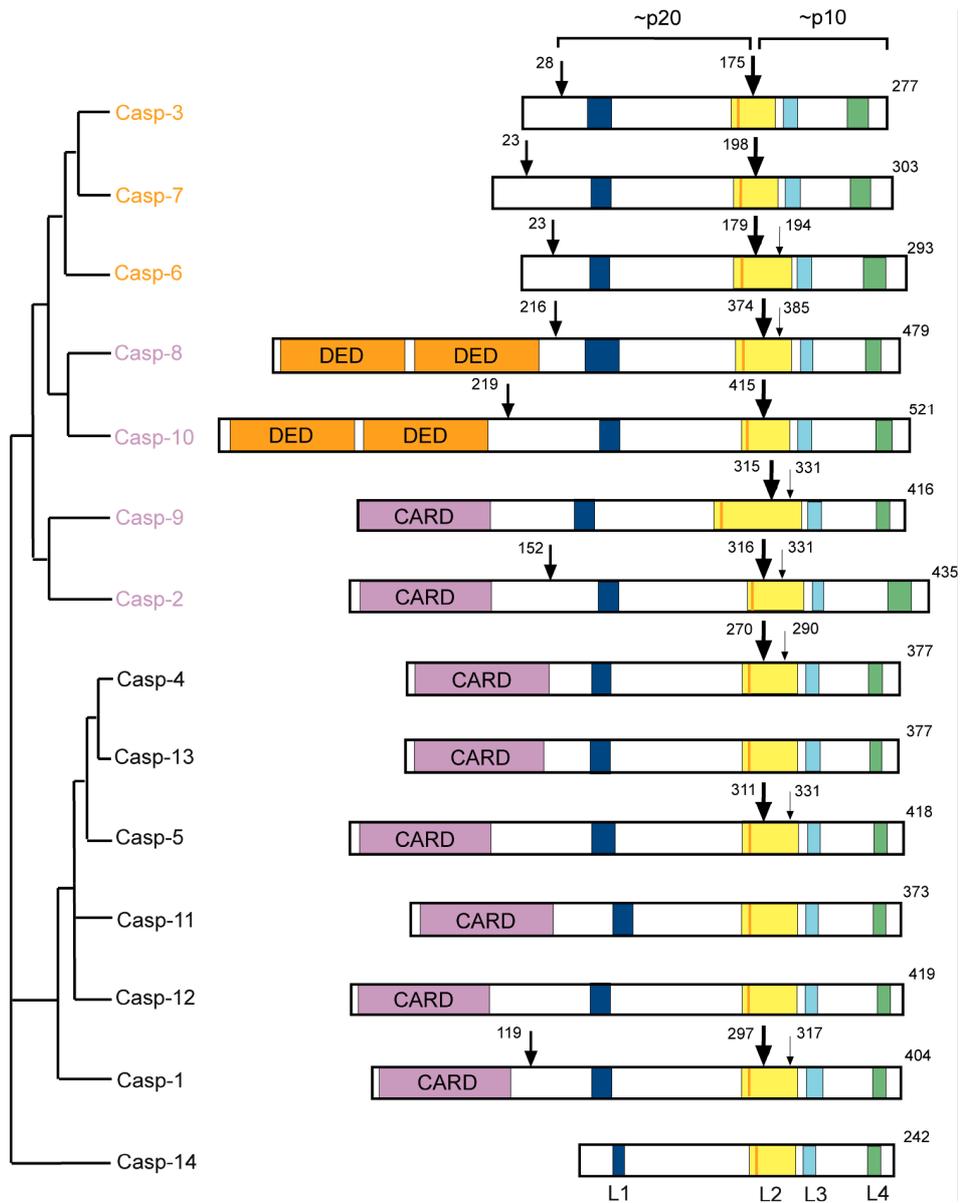


Abb. 1.4: Mechanismus der Caspasenaktivierung

Caspasen lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Gruppen unterteilen. Als Initiatoren dienen die Caspasen 8 und 10, die die rezeptorvermittelte Apoptose transduzieren, und Caspase 9 sowie Caspasen 3, 6 und 7, die die Effektoren darstellen. Diese enthalten kurze Peptid-Prodomen (<30 kDa). Alle anderen besitzen lange Prodomänen (>10 kDa). Bedeutend ist, dass nicht alle Caspasen Apoptose erzeugen, sondern dass einige bei der Prozessierung von Zytokinen und der Vermittlung von Entzündungsprozessen eine Rolle spielen (Abb. 1.4) (aus Shi, 2002).

Caspasen enden als Übermittler der Signalkaskade in der Zerlegung von Zellbestandteilen. Einige dieser Proteine verleihen den Zellen einen Schutz vor dem Zelltod. Das DNA-Reparaturenzym PARP, die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase, wurde als eines der ersten Caspasesubstrate identifiziert (Fraser und Evan, 1996; Chinnaiyan, 1996). PARP ist ein Enzym, das in den DNA-Reparaturmechanismus involviert ist und durch Caspase 3 gespalten wird. Eine Spaltung dieses Enzyms führt zur Inaktivierung und zur Degeneration zellulärer Strukturen (Cohen, G.M 1997). Die Abspaltung des Inhibitors ICAD (Inhibitor of Caspase Activated Desoxyribonuclease) von der Endonuclease CAD durch Caspase 3 hat die internukleosomale DNA-Fragmentierung zur Folge (Enari et al., 1998; Liu, 1997).

1.2.5 Apoptoseinduktion durch direkte Aktivierung der Mitochondrien

Die Mitochondrien sind zentrale Mediatoren des wichtigen Apoptose-Signal-Transduktionswegs. Sie zeigen charakteristische Veränderungen im Verlauf der Aktivierung. Nach diversen Stimuli vollzieht sich am Mitochondrium eine Regulation. Von zentraler Bedeutung für die Aktivierung von Mitochondrien sind die Mitglieder der Bcl-2-Familie. Sie sind in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und in der Lage, die Freisetzung der proapoptotischen Proteine wie Cytochrom C, Smac/Diablo, Endonuclease G und AIF (Apoptosis Inducing Factor) aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol, und somit die Membranpermeabilität zu regulieren (Ravagnan et al., 2002; Tsujimoto und Shimizu, 2000; Nguyen et al., 1993; Krajewski et al., 1993; Tanaka et al., 1993). Mehrere verschiedene Mitglieder der Bcl-2-Familie sind bekannt (Strasser et al., 2000; Adams und Cory, 1998). Sie sind fähig, Kanäle zu bilden und somit die Freisetzung der proapoptotischen Moleküle zu veranlassen oder zu blockieren. Bax, Bad, Bid, Bim sind proapoptotisch. Sie führen zur Aktivierung der Mitochondrien, während Bcl-2 und Bcl-xL antiapoptotisch sind und nahezu jegliche Aktivierung der Mitochondrien verhindern. Die Kanalbildung kann für sie nachgewiesen werden (Minn et al., 1999; Antonsson et al., 1997; Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997; Tanaka et al., 1993). Bax vermag aufgrund seiner porenbildenden Eigenschaft ein Protein zu oligomerisieren und in der Mitochondrienaußenseite eine Pore zu formen, durch die Cytochrom C freigesetzt wird. Interaktionen von Bax mit VDAC (Voltage Dependent Anion Chanel) oder ANT (Adenin Nukleotid Transporter) wurden mit verschiedenen Methoden demonstriert (Desagher, 2000; Eskes, 2000; Martinou und

Green, 2001). Durch einen Anti-VDAC-Antikörper kann die Freisetzung von Cytochrom C bei Bax-induzierter Apoptose gehemmt werden (Shimizu et al., 2001).

1.2.5.1 Bcl-2-Familien

Als erstes Mitglied einer Apoptose-regulierenden Genfamilie wurde Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2) identifiziert (Tsujiimoto, 1985). Außerdem wurden weitere Mitglieder der Bcl-2-Familie bzw. verwandte Proteine aufgrund von Sequenzhomologie oder ihrer Wechselwirkung mit Bcl-2 identifiziert (Chao und Korsmeyer, 1998). Bis heute wurden viele weitere Bcl-2-Homologe beschrieben, von denen einige vor Apoptose schützen, andere sie dagegen auslösen (Strasser, 2000; Adams und Cory, 1998). Die Unterteilung der Bcl-2-Familie erfolgt in antiapoptotische Mitglieder, wie Bcl-2 und Bcl-xL, die die Zelle schützen, sowie proapoptotische Mitglieder, wie Bax und Bak und die große Gruppe der BH3-only Proteine, die für Apoptose sensitivieren.

Antiapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie enthalten 3–4 sogenannte Bcl-2-homologe Domänen (BH1–BH4), die essenziell für die antiapoptotische Funktion sind. Diese Domänen haben keinerlei enzymatische Aktivität, sondern vermitteln Interaktionen mit anderen Proteinen. Das antiapoptotische Bcl-2 ist ein integrales Protein der Mitochondrienmembran und ist in der äußeren Mitochondrienmembran, am endoplasmatischen Retikulum und perinukleär zu finden (Krajewski, 1993). Viele proapoptotische Mitglieder der Familie, z. B. Bid oder Bad, hingegen sind zytosolisch oder nur lose an Membranen assoziiert. Andere, wie z. B. Bcl-Xs und Bax, können erst nach ihrer Aktivierung in den mitochondrialen Membranen lokalisiert werden. Die Fähigkeit zur Bildung von Homo- wie auch Heterodimeren mit anderen Mitgliedern der Familie sind weitere wichtige Eigenschaften der Proteine der Bcl-2-Familie. Einige Mitglieder der Bcl-2-Familie (z. B. Bcl-Xs und Bad) entfalten ihre proapoptotische Wirkung durch kompetitive Dimerisierung mit antiapoptotischen Proteinen. Ist ein Überschuss an Bcl-2 vorhanden, kommt es zur Bildung von Bcl-2-Homodimeren und damit zur Hemmung der Apoptose. Bei einem Überschuss an Bcl-Xs können hingegen bevorzugt Bcl-2/Bcl-Xs-Heterodimere gebildet werden, wodurch die antiapoptotische Aktivität von Bcl-2 unterbunden wird (Brenner C 2000; Gross, 1999). Es wurde gezeigt, dass die BH4-Domäne der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL notwendig und ausreichend für die Inhibierung der VDAC-Aktivität (Voltage Dependet Anion Channel) ist. VDAC-Proteine sind kanalbildende, integrale Membranproteine, die durch ihre Öffnung unter anderem die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien in das

Zytosol ermöglichen (Zamzami N und Kroemer G 2001; Shimizu, 2000). Ein Mechanismus zur Regulation der Aktivität der Bcl-2-Proteine ist die Phosphorylierung der Loop-Region von Bcl-XL und Bcl-2, welche zwischen der BH4- und BH3-Domäne liegt und möglicherweise wichtig für die Stabilität und Funktion der Proteine ist (vgl. Abb. 1.5).

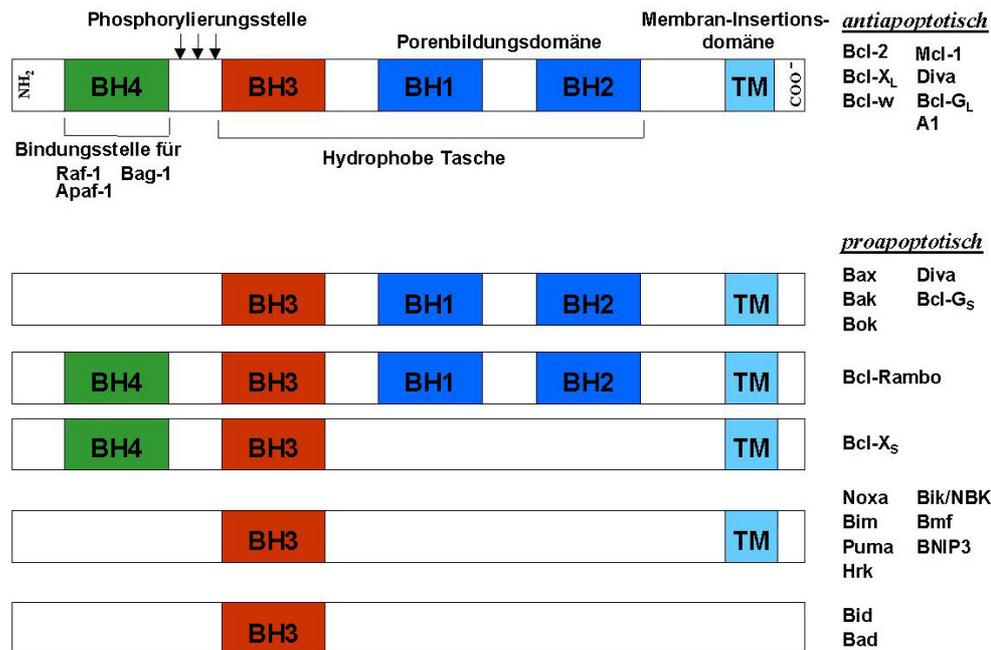


Abb. 1.5: Struktureller Vergleich der Mitglieder der Bcl-2-Familie

Diese umfasst anti- und proapoptotische Proteine. Die proapoptotischen Proteine werden in zwei Subgruppen unterteilt: erstens Proteine, welche die Domäne BH1–3 besitzen (Bax-ähnlich), und zweitens Proteine, die nur über die BH3-Domäne verfügen (BH3-ähnlich). Die antiapoptotischen Proteine besitzen alle vier Domänen. Die meisten Proteine haben außerdem C-terminal eine Transmembrandomäne (TM) (Adams und Cory, 1998; Kroemer, 1997).

1.2.5.2 Apoptosis Inducing Factor (AIF)

AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) ist ein Flavoprotein. Es zeigt Homologie zu Oxidoreduktasen von Vertebraten (*Xenopus laevis*) als auch Nicht-Vertebraten, wie *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*, Pflanzen, Pilzen und Archaeobakterien (Daugas, 2000; Lorenzo, 1999). AIF ist phylogenetisch gesehen ein sehr altes Protein, das während der frühen Embryogenese den Zelltod kontrolliert (Joza, 2001; Lorenzo et al., 1999). Das AIF-Vorläuferprotein wird im Zytoplasma synthetisiert und dann in die Mitochondrien befördert. Apoptosis Inducing Factor AIF befindet sich im Intermembranraum der Mitochondrien und ist an der

Elektronentransferkette beteiligt. AIF bewirkt die Chromatin-Kondensation und DNS-Fragmentierung in 50-kb-Einheiten während der Apoptoseinduktion und transloziert es zum Nukleus, wie in HeLa-Zellen gezeigt wurde (Modjtahedi et al., 2006; Susin et al., 1999). Rekombinantes AIF kann nach Überexpression in einem zellfreien System (Susin et al., 2000 und 1999) sowie in intakten Zellen (Loeffler, 2001; Ferri et al., 2000) den programmierten Zelltod induzieren. Dies führt zu einem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, nuklearer Chromatin-Kondensation und DNS-Fragmentierung (Hail et al., 2006). Durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus kann zytosolisches AIF-Protein eine Freisetzung von AIF aus den Mitochondrien bewirken (Loeffler et al. 2001). Nach Überexpression von Bcl-2 kann AIF-vermittelte Apoptose inhibiert werden (Loeffler et al., 2001; Susin et al., 1999). AIF bewirkt bei der Apoptose eine Caspasen-unabhängige Signaltransduktion, da eine Überexpression von AIF durch Caspaseinhibitoren nicht blockiert wird (Loeffler et al., 2001; Ferri et al., 2000; Susin et al., 1999).

1.3 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK)

Die Voraussetzung zur Entwicklung und Erhaltung eines multizellulären Organismus ist die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen. Die Zellen reagieren auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen mit der Aktivierung stimuluspezifischer zellulärer Programme wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung oder Migration. Die Aktivierung von Zelloberflächenrezeptoren durch extrazelluläre Liganden stellt den ersten Schritt bei der Signalübertragung dar. Der aktivierte Rezeptor stimuliert dann intrazelluläre Signalkaskaden, die letztendlich zur zellulären Antwort führen. Ein bedeutender Mechanismus zur Regulation von Proteinfunktionen und somit zur Signalübertragung ist die Phosphorylierung von Proteinen an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten (Fisher et al., 2001; Miyata et al., 1999). Solche Phosphorylierungen können Substrate sowie die gesamte Signalkaskadenaktivität negativ oder positiv regulieren.

Bei den MAP-Kinase- (Mitogen Activated Protein Kinase) Signalwegen (vgl. Abb. 1.6) handelt es sich um Proteinkaskaden, welche durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden. Der MAP-Kinase-Signalweg besteht aus drei nachfolgend geschalteten Kinasen. Eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) phosphoryliert und aktiviert eine MAPK-Kinase (MAPKK), die wiederum eine MAPK phosphoryliert und somit aktiviert. Sechs verschiedene MAPK-Kinase-Module sind zurzeit bekannt (Chang und Karin, 2001; Saxena und Mustelin, 2000). Die am besten beschriebenen MAP-

Kinasen sind die ERK1 (p44)- und ERK2 (p42)-MAP-Kinasen (Extracellular Signal Regulated Kinase) und die stressaktivierten Kinasen JNK/SAPK (c-Jun N-terminal Kinase) sowie die p38-MAP-Kinase (Steelman et al., 2004; Cano et al., 1995; Seger et al., 1995; Lewis et al., 1998). ERK1 und ERK2 sind durch Wachstumsstimulationen gut charakterisiert. JNK und p38-MAPK werden durch zelluläre und Umweltstressoren, wie DNS-Schaden, Hitzeschock, Ischämie, inflammatorische Zytokine und oxidativen Stress aktiviert (Dent et al., 2003; Johnson und Lapadat, 2002).

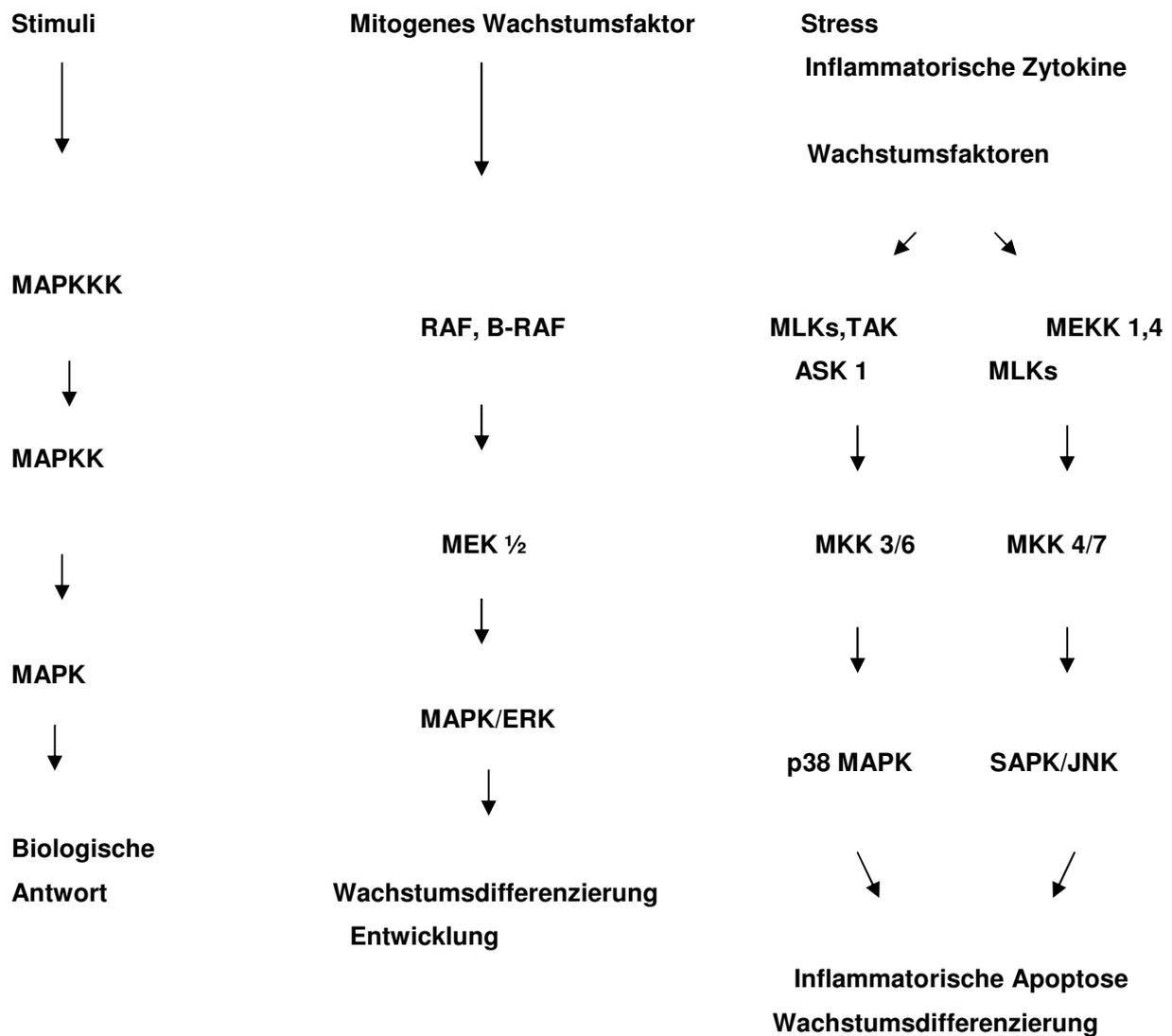


Abb. 1.6: Die MAPK-Kinase-Signalwege

Das Schema eines MAPK-Kinase-Signalweges ist auf der linken Seite demonstriert. Von links nach rechts folgen der ERK-Signalweg, der p38-Signalweg und der JNK-Signalweg (Wada, 2004). Die p38-

MAP-Kinase-Kaskade wird durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren sowie Stress aktiviert. Die MAP-Kinasen der Kaskade werden durch gegenseitige duale Phosphorylierung aktiviert und über Phosphatasen inaktiviert. Die in der Abbildung verwendete Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erläutert.

Eine Stimulation von MAPKKK führt zur Aktivierung der MAPKK [MEK1 und MEK2 (MAPK-/ERK-Kinase 1 und 2)], und zwar durch Phosphorylierung von Serinresten (Derijard et al., 1995; Zheng und Guan, 1994). Diese Kinasen aktivieren nun hochspezifisch die MAPK-Kinasen ERK1 und ERK2 durch Threonin- und Tyrosinphosphorylierung des regulatorisch wichtigen Thr-Glu-Tyr-Motivs (Robinson / Cobb, 1997). Die Aktivierung von ERK1 und ERK2 führt zur Bildung von Homodimeren und auch zur Translokation in den Zellkern, wo diese Kinasen durch Serin-/Threoninphosphorylierung von Transkriptionsfaktoren reguliert werden können (Khokhlatchev et al., 1998; Cobb et al., 1994; Treisman, 1996). Außerhalb des Zellkerns sind diese Kinasen in der Lage, eine Vielzahl von zytosolischen und membrangebundenen Proteinen zu phosphorylieren (Cobb et al., 1991). JNK wird durch die Dualspezifitätkinasen der MKK4/SEK1 (Yan et al., 1994) und MKK7 (Tournier et al., 1997) aktiviert, während p38-MAPK's durch MKK3/6-Homologe aktiviert wird (Moriguchi et al., 1996). Transkriptionsfaktoren wie c-Jun, ATF2 und ELK1 (Marias et al., 1995; Gupta et al., 1995) werden durch JNK-Phosphorylierung und -Aktivierung gesteuert. Da JNK und p38-MAPK in stressbedingten Zellen eine Aktivierung der Apoptose hervorrufen, fokussiert man sich auf die potenzielle Rolle der Kinasen in apoptotischen Signalwegen. In mehreren Studien wurden eine Beziehung zwischen JNK-/p38-MAPK-Signalwegen beobachtet. Eine Überexpression der aktiven Formen der MEKK's (Johnson et al., 1996), der Regulation von MKK4/SEK1 oder MKK6 (Huang et al., 1997) fördert die Apoptose. Darüberhinaus berichteten Xia et al., dass die Aktivierung von JNK und p38-MAPK essentiell waren für die Apoptose in Nervenzellen (Xia et al., 1995). Andererseits wird auch berichtet, dass die JNK-Aktivierung nicht im apoptotischen Prozess impliziert ist. Eine Hemmung des JNK-Signalwegs durch die Expression von MEKK1, SEK1 oder c-Jun-Mutant kann den Fas-bedingten oder TNF-bedingten Zelltod verhindern (Liu et al., 1997; Lenczowski et al., 1997). Neuere Studien beweisen, dass eine Aktivierung der JNK/p38-MAPK nicht mit Apoptose-induzierten Epithelzellenlösungen korreliert (Khwaja et al. 1997).

1.4 Die Bedeutung von cAMP für die Apoptose

Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sehr stabiler sekundärer Botenstoff. Sie wird von Adenylatzyklase aus ATP gebildet. Sie gelten als starker Inhibitoren der Apoptose in verschiedenen Zellen (Vossler, 1997; Hippenstiel, 2002; Stork et al., 2002; Li, 2000). cAMP beeinflusst z. B. die Kontraktion von Endothelzellen nach Thrombin- (Paterson et al., 1994) und Histaminstimulation (Moy et al., 1993) und damit ihre Barrierefunktion (Hippenstiel, 2003; Qiao et al., 2003). Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein sehr stabiler sekundärer Botenstoff.

cAMP wird von den Phosphodiesterasen (PDE) inaktiviert. Sie hydrolysieren die 5'-Ribosephosphatbindung der Nukleotide und schalten so deren Signalaktivität aus (Ückert, 2001). Derzeit gehören der PDE-Superfamilie über 19 Mitglieder an, die nach Regulation, Affinität, Kinetik und Gewebslokalisierung zu 11 Isoenzymgruppen zusammengefasst werden. cAMP-spezifisch wirken PDE 4, PDE 7 und PDE 8 (Soderling, 2000). Frühere Untersuchungen an Endothelzellen zeigen, dass vor allem PDE 3 und PDE 4 cAMP in Endothelzellen abbauen (Suttorp et al., 1996 und 1993). Über den PKA-Signalweg in β -Zellen (Li et al., 2000; Kwon, 2004), thyreoidalen follikulären Zellen (Saavedra et al., 2002), HL-60-Zellen (Choi et al., 2000) und intestinal epithelialen Zellen (Nishihara, 2004) hemmt cAMP die Apoptose. Eine durch cAMP hervorgerufene Apoptose in Rattenleukämiezellen beschreiben Sandal et al. (Sandal et al., 2002). Hippenstiel et al. zeigten in einer Studie, dass die durch Rho Proteine Inhibition bedingte Apoptose in Endothelzelle durch erhöhter cAMP blockiert wurde (Hippenstiel et al., 2002). Somit scheint cAMP wichtig für die Kontrolle Apoptose.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Streptococcus pneumoniae ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie, einer bedeutenden Infektionskrankheit. Obwohl bei Pneumokokkeninfektionen häufig eine Bakteriämie auftritt und die Pneumokokkensepsis eine gefährliche Komplikation darstellt, gibt es kaum Untersuchungen zur Pneumokokken-Endothel-Interaktion. In dieser Doktorarbeit wird die Hypothese geprüft, dass Pneumokokken eine Apoptose in kultivierten Endothelzellen auslösen.

Die zentralen Fragestellungen der Arbeit lauten:

- ❖ Führt die Infektion von HUVEC mit *Streptococcus pneumoniae* zu endothelialer Apoptose?
- ❖ Welche Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* sind dabei von Bedeutung?
- ❖ Welche Signalwege sind an die durch *Streptococcus pneumoniae* induzierte Apoptose beteiligt?
- ❖ Welche Rolle spielt das zyklische Nukleotid cAMP für die Regulation dieses Prozesses?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Für die vorliegende Studie wurden die im Folgenden aufgeführten Chemikalien verwendet:

Chemikalien	Lieferant
Acrylamid/Bisacrylamid 40 %	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphotericin	Boehringer
Antipain	Sigma
BioRad-Reagenz	BioRad
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Serva
Essigsäure 100 %	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Forskolin	Sigma
Glycerin	Merck
Gelatine (aus Schweinehaut)	Sigma
Hepes (N-2-Hydroxyethyl-Piperazin-N'-2-Ethanesulfonsäure)	Roth
Leupeptin	Sigma
MCDB-131 (HUVEC-Medium)	Gibco
β-Mercaptoethanol	Serva
Pepstatin A	Sigma
RP-73401	Roth
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	R- und D-Systems
Staurosporin	Sigma
TNF-α (human)	R und D-Systems
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva
Triton X-100	Boehringer
Trypsin EDTA	Sigma
Tween-20	Sigma

2.1.2 Kulturmedium

In der vorliegenden Studie kam das folgende Kulturmedium mit den aufgeführten Zusätzen zum Einsatz:

- ❖ Endothelzellmedium 500 ml als Zellkulturmedium unter Zugabe von:
- ❖ L-Glutamin (500 µg)
- ❖ Amphotericin B (0,5 µg)
- ❖ EGF (5 ng/ml)
- ❖ FCS (*Fetal Calf Serum*) (10 %) ¹
- ❖ Streptomycin, 7 ml (Stocklösung 1000 µg/ml)
- ❖ Penicillin, 7 ml (Stocklösung 1000 µg/ml)

2.1.3 Puffer und Lösungen

In der vorliegenden Studie kamen die folgenden Puffer und Lösungen zum Einsatz:

Gelatine (Stocklösung)

Gelatine	5,0 g
Aqua bidest	ad 100,0 ml

unter Erhitzen auf 80 ° C lösen,
danach steril filtrieren

HBSS (10X):

KCL	4,0 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
NaCl	80,0 g
Na ₂ HPO ₄	0,9 g
D-Glukose	10,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

H/H -/- :

HBSS (10X)	100,0 ml
HEPES	6,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

¹ *FCS: Erhitzung für eine Dauer von 45 min bei 56 °C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren.

H/H +/-:

HBSS (10X)	100,0 ml
CaCl ₂	0,185 g
HEPES	6,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

H/H +/+:

HBSS (10X)	100,0 ml
CaCl ₂	0,185 g
MgCl ₂	0,100 g
MgSO ₂	0,100 g
HEPES	6,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

PBS-Stammlösung (20X):

Na ₂ HPO ₄	58,5 g
KH ₂ PO ₄	9,8 g
NaCl	320,0 g
Aqua bidest	ad 1000,0 ml

PBS:

PBS-Stammlösung (20X)	50 ml
Aqua bidest	ad 1000,0 ml
pH	7,4

2.1.4 Western Blot

Der Lyse-Puffer zur Proteinextraktion setzte sich wie folgt zusammen:

Tris-HCl, pH 7,4	50,0 mM
EDTA	0,25 mM
PMSF	1,0 mM
Antipain	10,0 µg/ml
Leupeptin	10,0 µg/ml
Pepstatin	10,0 µg/ml
NP-40 (v/v)	1 %

Lösungen und Puffer für Western Blot

Die verwendeten Lösungen und Puffer für Western Blot setzen sich wie folgt zusammen:

Auftragepuffer:

Tridest	3,8 ml
Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	1,0 ml
Glycerol	0,8 ml
SDS (10 %, w/v)	1,6 ml
Bromphenolblau (1 % v/v)	0,4 ml
β-Mercaptoethanol (1 % v/v)	0,4 ml

Sammelgel:

Tris-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	10 %
Acrylamidlösung, 19 : 1	40 %
Bidest	
TEMED	
Ammoniumpersulfat	10 %

Trenngel:

Tris-HCl, pH 8,8	1,5 M
SDS	10 %
Acrylamidlösung, 19 : 1	40 %
Bidest	
TEMED	
Ammoniumpersulfat	10 %

Die prozentuale Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels wurde nach dem molekularen Gewicht des Zielproteins ausgewählt.

Laemmli-Puffer (5X):

Tris-Base	15 g
Glycerin	72 g
SDS	5 g
Aqua bidest	1000 ml

Ponceau-S-Proteinfärbung:

Ponceau S	1 g
Essigsäure	50 ml
Aqua bidest	950 ml

Blot-Puffer:

Stocklösung	80 ml
Methanol	10–20 %
Aqua bidest	720–820 ml

2.1.5 Bakterienstämme (*S. pneumoniae*)

Die benötigten Bakterienstämme

- ❖ R6x: R6x, unbekapseltes Derivat von D39
- ❖ PlnA-: Pneumolysin-negative Mutante von R6x, diese wurde durch das Einbringen des pJDC9:ply Plasmid in den R6x Stamm erzeugt
- ❖ D39: Kapseltyp 2 , besitzt Polysaccharidkapsel

stellte freundlicherweise Herr Prof. Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Greifswald, zur Verfügung. Darüber hinaus kam das folgende Medium zum Einsatz:

Medium:THY (Todd-Hewitt-Bouillion), 0,5 % Hefeextrakt

2.1.6 Zubehör

Zum Einsatz kam darüber hinaus das folgende Zubehör:

Zubehör	Hersteller
Zellkulturflaschen (T25 und T75)	Nunc
Multischalen (mit 96/24/6/4-Vertiefungen)	Nunc
Zentrifugationssäulen	Amersham Biosciences
Hybond-ECL-Membran	Roth
Gel-Blotting Papier	Amersham Biosciences
Columbia Agar mit 5 % Schafsblut	BD

2.1.7 Spezielle Geräte

Folgende spezielle Geräte kamen zum Einsatz:

Spezielle Geräte	Hersteller
ELISA-Photometer	STL
Forschungsmikroskop BX 60	Olympus
Fluorometer Fluoro-Max-2	ISA SPEX
konfokale Mikroskopie	Zeiss
Kühlschränke (4 °C, -20 °C, -80 °C)	Liebherr
Laborwaage	Mettler
Mini-Protein-Gel-System	BioRad
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA®
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
Spektralphotometer Uvicon UV 860	Bio-Tek Kontron Instruments
Schüttelinkubator	Uniequip
Sterilbank Laminair HB 2448	Hereaus
Zellkultur-Inkubator	Hereaus
Zentrifuge 48 RC, Rotanta RPC	Hettich

2.1.8 Antikörper für Western Blot

Die verwendeten Antikörper für Western Blot sind wie folgt definiert:

Moleküle	Spezies	Firma
Bax	Rabbit	Upstate Biotechnology
Bcl-2	Maus	Upstate Biotechnology
Bid	Kaninchen	Santa Cruz
Procaspase 3	Maus	Upstate Biotechnology
Procaspase 8	Maus	Upstate Biotechnology
Procaspase 9	Maus	Upstate Biotechnology
Procaspase 6	Rabbit	Upstate Biotechnology
Anti-Kaninchen-IgG	Kaninchen, anti-human gekoppelt an Cy.5.5 oder IRDye 800	LI-COR Biosciences
Anti-Maus-IgG	Maus, anti-human, gekoppelt an Cy.5.5 oder IRDye 800	LI-COR Biosciences

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Die Geburtshilfeabteilungen der Humboldt-Klinik Reinickendorf (Berlin) haben freundlicherweise die Nabelschnüre in Hank's-HEPES-Puffer mit Magnesium und Calcium für uns aufgehoben. In Anlehnung an Jaffé et al. (1973) erfolgt die Isolation der Endothelzellen. Unter einer *Laminar-Air-Flow*-Sicherheitswerkbank wird zuerst die Nabelschnurvene kanüliert (Braunule R, 18G, Braun Melsungen), mit sterilem HBSS +/- ausgespült und dann mit 0,025 % Typ-II-Kollagenase für 20 Minuten gefüllt und inkubiert. Durch wiederholtes vorsichtiges Reiben und Ausspülen mit M199 werden die Endothelzellen aus der Vene gewonnen. Die gewonnenen Zellen werden für 10 Minuten bei 350 g zentrifugiert und das Pellet in MCDB 131 aufgenommen. Die Primärkultur der isolierten HUVEC werden dann in MCDB 131 mit 10 % inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) gelagert. Nach 4- bis 5-tägiger Kultivierung der Endothelzellen werden sie in Zellkulturplatten mit 6, 24 oder 96 Vertiefungen gesplittet und mit sterilem PBS und 0,5 % Trypsin-EDTA gespült und abgelöst. Diese Zellen werden wieder im Kulturmedium aufgenommen. Alle verwendeten Zellkulturflaschen behandelten wir vorher eine Stunde mit 0,5 %iger Gelatinelösung. Nach Jaffé charakterisierte humane Endothelzellen wachsen zu einem Monolayer, ähnlich einem Kopfsteinpflaster.

2.2.2 Herstellung der Bakterienkulturen

Die Pneumokkenstämme wurden in Einfriermedium bei -80 °C aufbewahrt. Zur Durchführung der Experimente wurden Bakterien auf Columbia Agar Platten (BD Mikrobiologie) mit einer 10 µl Platin-Öse ausgestrichen und über Nacht in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Angewandt wurde der mid-logarithmischen Wachstumsphase. Diese wurde mittels eines Spektralphotometers (600 nm) bei einer Optischen Dichte (OD) zwischen 0,2–0,4 ermittelt. Die Bakterien kamen in 20 ml Pneumokokken Wachstumsmedium und wurden inkubiert. Bei der OD von 0,2-0,4 wurden die Bakterien bei 1800g, 25° und 15 min zentrifugiert, da bei der entsprechenden Dichte von einer linearen Phase des Wachstums der Bakterien ausgegangen werden kann. Das Pellet wurde in der gleichen Menge des jeweiligen Zell-Kulturmediums ohne Antibiotika wie der Überstand gelöst und auf eine OD von 0,1

eingestellt. Dieser entspricht eine Bakterienkonzentration von 10^8 cfu/ml. Dies wurde durch Ausstreichen auf Columbia Agar Platten und Auszählung verifiziert. Weiteren benötigten Konzentrationen wurden durch Verdünnung mit Zellkulturmedium eingestellt.

2.2.3 Quantifizierung der Apoptose mittels ELISA

Es gibt mehrere Methoden, um Apoptose zu detektieren. Die hier verwendete Methode bestimmt die DNA-Fragmentierung (*Endonukleolyse*), den letzten Schritt der Apoptose (Wieder et al., 1998). Mit dem kolorimetrischen Sandwich-ELISA der Firma Roche Mannheim (*Cell-Death-Detektion Elisa plus*®) wird die Apoptose gemessen. Bei der DNA-Degradierung gelangen die DNA-Fragmente in Form von Mono- und Oligonucleosomen aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Dies erfolgt in den frei zugänglichen Inter-Histon-Abschnitten und führt zu histongebundenen Mono- oder Oligonucleosomen mit einer Länge von 180 Basenpaaren. Konfluent gewachsene Zellen eines 96 Well werden nach unterschiedlichen Behandlungen bei 200 g zentrifugiert und für 30 Minuten mit Lyse-Puffer inkubiert. Durch erneutes Zentrifugieren der Zellen werden im Überstand histongebundene Mono- und Oligonucleosome gewonnen. 20 µl der Nucleosomen inkubieren wir in einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte mit 2-murinen monoklonalen Antikörpern. Danach werden biotin-konjugierte Anti-Histon-Antikörper (Klon H11-4) an Streptavidin gebunden und mit Peroxidase-gekoppelten Anti-DNA-Antikörpern (Klon M-CA-33) markiert und detektiert. Durch Zugabe des Enzymsubstrats ABTS [2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazolin-Sulfonat)] wird die Umwandlung bei einer Absorption von 495 nm gemessen. Die Kontrollwerte werden gleich 100 % gesetzt und die gemessenen Werte auf die Kontrollen bezogen.

2.2.4 Messung der Laktatdehydrogenase

Mit einem kalorimetrischen Enzymassay (*Roche*) wird die Aktivität der von nekrotischen Zellen im Überstand freigesetzten Laktatdehydrogenase (LDH) ermittelt. Die Aktivität dieses Enzyms wird nach zwei enzymatischen Schritten gemessen. Diese Messung basiert auf der Katalyse der Oxidation von Laktat zu Pyruvat und der Reduktion von NAD^+ zu NADH/H^+ durch LDH. 100 µl des Zellüberstandes wird mit 100 µl Assay-Lösung in einer Mikrotiterplatte versetzt. Als nächster Schritt werden zwei Wasserstoffatome des NADH/H^+ enzymatisch per Diaphorase auf das gelbe Tetrazoliumsalz INT [2-(4-Jodephenyl)-3-(4-Nitrophenyl)-5-Phenyltetrazolium-Chlorid] übertragen. Das Reaktionsprodukt ist ein rotes Formazansalz, das bei 490 nm bestimmt

wird. Die LDH-Aktivität geben wir im Verhältnis zur Gesamt-LDH der Kontrollzellen (behandelt mit 2 % Triton X-100) an. Die Aktivität der LDH im Überstand ist proportional zur Menge der Zellen.

2.2.5 Fluorometrische Aktivitätsmessung der HTS-Caspasen 3, 6 und 9

Zur Bestimmung der Aktivität von Caspasen werden diese mit Tetrapeptidsubstraten für Caspasen versetzt. Durch die Freisetzung einer fluorophoren (Aminotrifluoromethylcoumarin, AFC bzw. Aminomethylcoumarin, AMC) Gruppe lässt sich der Umsatz der Substrate, die an Position 1 des Tetrapeptids gekoppelt sind, quantifizieren. Caspase-3-, -6- oder -9-Enzyme schneiden spezifisch hinter dem Aspartat-Rest eines DEVD- oder IETD-Substrates in einer besonderen Peptidsequenz (DEVD für Caspase 3, und IETD für die Caspasen 6 und 9), woraus sich die Spezifität ergibt. Um den Ablauf darstellen zu können, werden an das Fluorochrom-7-Amino-4-Trifluoromethylcoumarin die DEVD- und IETD-Substrate (AFC) gekoppelt. Das Fluorochrome AFC wird abgespalten, wenn die gesuchten Caspasen in einer Probe sind. Dadurch ändert sich die Farbe von Blau zu Grün. Mit einem Fluorometer werden sie dann bei einer Exzitation von 400 nm und einer Emission von 505 nm quantifiziert.

Die Endothelzellen haben wir in einer schwarzen 96-Well-Platte mit klarem Boden bis zur Bildung eines gleichmäßigen Monolayers kultiviert. Anschließend behandeln wir die Zellen mit dem gewünschten Stimulus. Nach der Zugabe von 1 M DTT (1:1000) werden die Zellen mit 50 µl des mitgelieferten Assay-Puffers behandelt. Lichtgeschützt werden dann 10 µl des AFC-gekoppelten Substrates zugegeben, danach wird kurz geschwenkt und direkt die Grundaktivität der Proben gemessen. Die Endaktivität der Proben wird nach zweistündiger Inkubation im Zellkulturschrank bei 37 °C gemessen. Die tatsächliche Caspaseaktivität wird mit einer parallelen Pufferkontrolle aus der Differenz der Endaktivität (Wert nach 2 Stunden) und der Grundaktivität (Wert nach 0 Stunden) bestimmt. Die Aktivität wird dann in RFU (*Relative Fluorescence Units*) angegeben.

2.2.6 Immunhistochemische Apoptosebestimmung

Verwendet wird die TUNEL-TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*)-mediated-dUTP (*Deoxyuridin-Triphosphat Nick End Labeling*)- oder auch ISEL (*In Situ End Labeling*)-Technik, um den programmierten Tod einzelner Zellen im intakten Monolayer zu bestimmen. Bei den Endonukleolysen entstehen Oligonukleosomen mit Einzelstrangbrüchen, deren 3'-OH-Endensequenzen unabhängig enzymatisch mit

modifizierten Nukleotiden markiert und detektiert werden. Wachsende Zell-Monolayer werden auf *Chamberslides* fixiert und bleiben zum Trocknen unter dem Abzug stehen. Die Fixierung der Zellen erfolgt für eine Stunde mit Paraformaldehyd 4 % in PBS bei einem pH von 7,4, danach erfolgt eine Permeabilisierung mit Triton X-100 (0,1 %) für 2 Minuten, wonach sie auf Eis gelegt werden. Danach findet eine einstündige Inkubation im Zellkulturschrank statt. Vor der Inkubation findet eine Kopplung der 3'-OH-Enden der Einzelstrangbrüche mit terminaler Deoxynucleotidyltransferase (TdT) an Fluoreszeinkmarkiertes Deoxy-Uridintriphosphat (dUTP) statt. Mit einem Fluoreszenzmikroskop und einem 564-nm-Filter werden die Monolayer begutachtet und fotografiert. Die Zellen werden zudem mit einem an alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Fluorescein-Antikörper (Spezies: *Schaf*) inkubiert. Die Phosphatase setzt das *Fast-Red-Substrat* (*Roche*) um und ermöglicht so eine optimale lichtmikroskopische Darstellung der gefärbten DNA-Fragmente in apoptotischen Zellen.

2.2.7 Annexin-V-Färbung

Die Plasmamembran von Zellen ist asymmetrisch aufgebaut. Ein frühes Zeichen der Apoptose ist der Verlust der Asymmetrie. Phosphatidylserin (PS) ist auf der zytoplasmatischen Innenseite der Membran lokalisiert. Unter normalen Bedingungen tritt es dabei vermehrt in der nach außen gerichteten Membranseite auf. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Der Nachweis von PS an der Zelloberfläche dient daher dem Nachweis von Apoptose. Annexin V ist ein 35–36 kD großes Protein, das PS Ca^{2+} -abhängig binden kann. Annexin V ist an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Somit können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da Annexin V auch an nekrotische Zellen aufgrund der permeabilisierten Membran binden kann, muss gleichzeitig eine Ausschlussfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt werden. Dieser Farbstoff färbt die DNA von apoptotischen Zellen an. Zellen, die sich sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumiodid färben lassen, sind daher apoptotisch oder nekrotisch. Zellen, die sich nur mit Annexin V färben lassen, sind im Prozess der Apoptose begriffen. Mit den Annexin-V-Kits werden frühe Apoptosen von späteren Apoptosen und Nekrosen unterschieden. Die Zellen werden dann fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.2.8 Western Blot

Western Blot ist ein Verfahren, mit dem ein Proteingemisch oder einzelne Fraktionen einer Probe nach ihrem Molekulargewicht durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und von einem Acrylamidgel auf eine feste Polymerschicht (Nitrozellulose) transferiert werden. Mit spezifischen Antikörpern werden die einzelnen Proteine immundetektiert.

Extraktion der löslichen Gesamtproteine

Die extrahierten Proben aus einer 10-cm-Platte werden mit eiskaltem PBS gewaschen und dann mit 50 µl eiskaltem Lyse-Puffer für 10 Minuten lysiert. Mit einem Zellschaber wird das Zellhomogenat abgekratzt. Das gewonnene Lysat aus 5×10^6 Zellen wird in Eppendorf-Reaktionsgefäßen für 3 Minuten bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dann in einem anderen Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. 5 µl werden zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet. Der Rest wird bei -20 °C gelagert.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen erfolgt photometrisch nach Bradford (*BioRad*) durch eine Farbreaktion in einer Lösung, wobei die Proben in Laemmli-Puffer aufgelöst werden. Hierbei wird *Coomassie Brilliant Blue*® an die Proteine gebunden. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm, wenn basische und aromatische Aminosäuren gebunden werden. Nach fünfminütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung mit 200 µl der im Verhältnis 1:5 verdünnten Farbstofflösung in einer Mikrotiterplatte wechselt die Farbe von Grünbraun zu Blau. Mit einem Spektralphotometer wird dann die Absorption bei 595 nm gemessen und über eine zuvor hergestellte Albumin-Standardkurve (1–8 µl einer Stocklösung mit 1 mg/ml Protein) die Proteinkonzentration bestimmt.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wird nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Das Gel wird nach den gesuchten Proteinen zusammengestellt: für Procaspase 3, 6, 9 (32 kDa, 64 kDa, 46 kDa, 54 kDa) 10 % bzw. für Bcl-2, Bax, AIF, ERK-2 (26 kDa, 21 kDa, 23 kDa, 50 kDa, 44 kDa) 12,5 %. Vor SDS-Kontakt wird das Protein mit Gelladepuffer in einem Verhältnis von 1:1 versetzt, und die Proben werden unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die SDS-Gele werden in

BioRad-Minigelkammern gegeben. TEMED und 10 % Ammoniumpersulfat werden kurz vor dem Gießen der Gele zugegeben. Jeweils 60 µg Protein wird nach dem Abkühlen der Probe getrennt in je eine Geltasche aufgetragen. Ebenso dient ein Marker (*Amersham Rainbow*) zur Erkennung der molekularen Massen der detektierten Proteine. Später erfolgt die Elektrophorese in *BioRad*-Minigelkammern im Laemmli-Puffersystem bei 100 V für 2 Stunden.

Protein-Blot

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Blotmatrices wird im *Semi-Dry*-Verfahren durchgeführt. Die getrennten Proteine werden auf eine Membran übertragen, um die Antigene optimal zu detektieren. Dieser Transfer erfolgt, indem negativ geladene Proteine zur Anode wandern. Nach erfolgreicher Elektrophorese wird das Trenngel aus der Elektrophoresenkammer entnommen, dann für 15 Minuten im Blotting-Puffer äquilibriert und luftblasenfrei mithilfe einer puffergetränkten Hybond-Nitrozellulosemembran (*Amersham*) zusammengesetzt. Um die Trenngel-Membranvorrichtung wird ein Sandwich gebildet und in den 2 puffergetränkten Lagen 3M-*Whatman*-Filterpapiere (*Whatman*) je Seite sowie die Blotvorrichtung (*Biorad*) gemäß Herstellerangaben verwendet. Zum Proteintransfer haben wir das Sandwich in die Blotkammer überführt. Die Kammer wird mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V, 4 °C und maximaler Stromstärke für 1 Stunde geblottet. Die Membran wird anschließend mit *Ponceau-S* gefärbt, um den Transfererfolg zu beurteilen. Danach wird sie mit Aqua bidest abgewaschen, bis die Färbung entfernt ist.

Immunblot

Nach dem Proteintransfer wird die Nitrocellulose-Membran mit *Odyssey-Licor-Biosciences*-Blockierungspuffer (*Block-Puffer®*; *Licor Biosciences*, Lincoln, NE, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt und inkubiert. Danach haben wir bei 4 °C über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert.

Die folgenden Schritte werden unter Schwenken durchgeführt: Am nächsten Tag wird nach dreimaligem, jeweils fünfminütigem Waschen mit PBS-Tween, bei Raumtemperatur für 1 Stunde ein dem Detektionsverfahren angepasster sekundärer Antikörper hinzugegeben. Für die *Odyssey-Licor-Biosciences®*-Detektion ist eine entweder an IRDye 800 oder an Cy5.5 gekoppelter sekundärer Antikörper nötig. In Vorversuchungen haben wir die optimale Antikörperverdünnung bestimmt. Sie liegt für

die primären Antikörper zwischen 1: 300 bis 1: 1000 und für die sekundären Antikörper bei 1: 2000.

Detektion mit Odyssey Infrared Imaging System®

Zur Detektion der an den primären Antikörper gebundenen, mit IRDye800 oder Cy.5.5 markierten sekundären Antikörper wird ein spezielles lasergestütztes Detektionssystem (*Odyssey Infrared Imaging System®*) verwendet und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet. Danach werden die Intensität bestimmt sowie die Proteinbande dargestellt.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Analyse wird nach der Anzahl der verschiedenen Gruppen und der unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte als Einweg-ANOVA- (Einwegvarianzanalyse für unverbundene Stichproben) und Newman-Keuls-Test durchgeführt. Zur Analyse der Daten und zum Erstellen der Diagramme wird *Prism 2.0 (Software for Science, San Diego, CA, USA)* benutzt.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Proben werden über den F-Wahrscheinlichkeitstest geprüft. $p < 0,05$ wird als signifikant eingestuft und durch ein Sternchen (*) oder eine Raute (#) angezeigt.

Sollten Fehlerbalken nicht in der Grafik erscheinen, so liegen die Fehler innerhalb der Größe der Symbole.

3 Ergebnisse

3.1 Streptococcus pneumoniae R6x induziert endotheliale Apoptose in HUVEC

Für die Untersuchung des Einflusses von *Streptococcus pneumoniae* auf die Apoptose wurden primäre Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene (HUVEC) verwendet. Die Endothelzellen wuchsen zu einem konfluenten, kontaktinhibierten Monolayer, der dann mit Pneumokokken (unbekapselter Stamm R6x) in einer Konzentration von 10^3 oder 10^6 cfu/ml inkubiert wurde. Weitere Stimuli waren Staurosporin, TNF- α und Cyclohexamid. Zum Nachweis des programmierten Zelltods in HUVEC wurden die Kriterien DNA-Fragmentierung und mikroskopische Morphologie herangezogen, während die Nekrose durch die Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) im Überstand beurteilt wurde. Die Endothelzellen wurden für 2, 4, 8, 12 und 16 Stunden mit unbekapseltem *S. pneumoniae* R6x in unterschiedlichen Konzentrationen infiziert. Nach 16-stündiger Inkubation wurde eine zeit- und konzentrationsabhängige Apoptose in "Cell Death Elisa" beobachtet. Eine signifikante Zunahme war zu den Zeitpunkten 12 und 16 Stunden zu verzeichnen (vgl. Abb. 3.1 A).

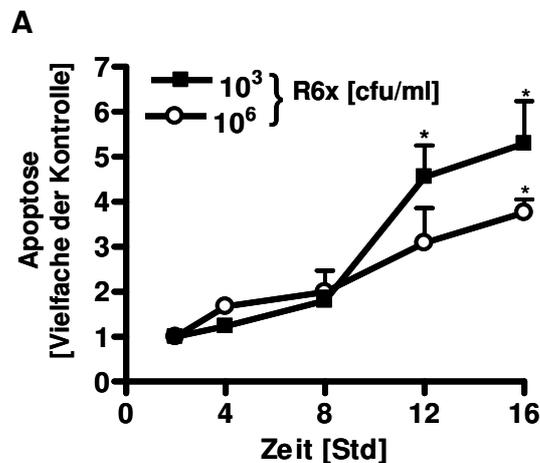


Abb. 3.1 A: Zeit und Dosis abhängiger Apoptose mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten HUVEC

HUVEC wurden mit *Streptococcus pneumoniae* R6x ($10^3/10^6$ cfu/ml) für die angegebenen Zeiten infiziert. Danach wurden die DNA-Fragmente gemessen. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von wenigstens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Werte mit $p < 0,05$, die mit einem Sternchen (*) markiert sind, deuten auf einen signifikanten Unterschied zwischen unstimulierten und stimulierten Proben hin.

Diese Erkenntnisse konnten durch eine Tunelfärbung bestätigt werden. In diesem Versuch glückte die konzentrationsabhängige *S. pneumoniae*-bedingte Apoptose, die von Staurosporin, ein starker Induktor dieses Prozesses (vgl. Abb. 3.1 B).

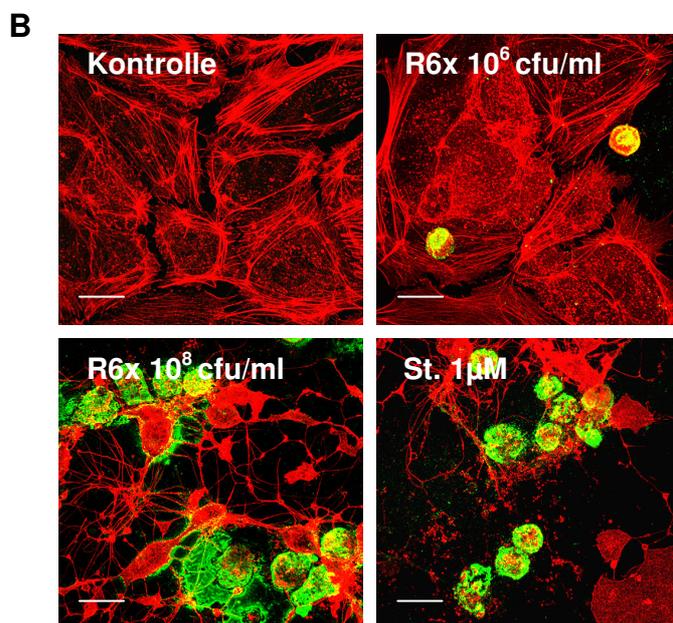


Abb. 3.1 B: Detektion der DNS-Fragmente durch Tunelfärbung

HUVEC wurden mit 10^6 cfu/ml und 10^8 cfu/ml *S. pneumoniae* R6x für 16 Stunden infiziert und mit $1 \mu\text{M}$ Staurosporin inkubiert. Danach wurden DNS-Fragmente durch die Tunelfärbung detektiert und dann durch Konfocal-Laser-Mikroskopie visualisiert. Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden gezeigt.

Bei der Färbung der Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid (Fluoreszenzmikroskopie, vgl. Abb. 3.1 C) wurde eine Steigerung der Annexin-V-Bindung, einem Marker der Apoptose, in den R6x-infizierten endothelialen Zellen deutlich. Hingegen war in mit D39 infizierten Zellen die Propidiumiodidfärbung erhöht. Da die meisten R6x-infizierten Zellen Propidiumiodid-negativ waren, deuten die Daten darauf hin, dass R6x Apoptose bewirkt. D39 rief dagegen Nekrose in HUVEC hervor (vgl. Abb. 3.1 C). Im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen war die innerhalb des Zeitrahmens getestete LDH-Aktivität in R6x-infizierten HUVEC nicht signifikant erhöht. In eine andere Studie wurde festgestellt, dass eine optische Dichte von 0,1 bei 600 nm 1×10^8 cfu/ml entspricht. Für die Bakterienstämme R6x und D39 wurde diese bestätigt.

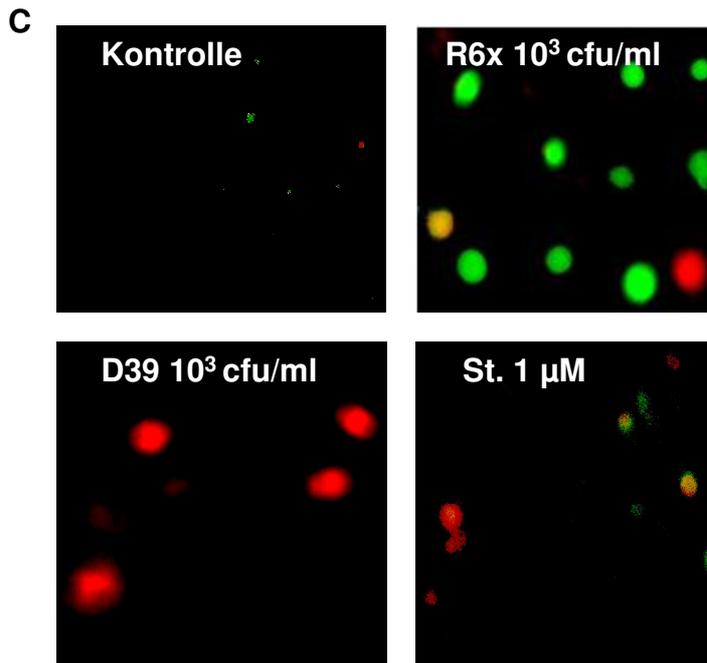


Abb. 3.1 C: Färbung der Zelle mit Annexin V und Propidiumiodid

HUVEC wurden mit *S. pneumoniae* R6x und D39 (10^3 cfu/ml) für 16 Stunden infiziert und mit Staurosporin ($1 \mu\text{M}$) für 8 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Annexin V (grün) und Propidiumiodid (rot) gefärbt und später durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte aus dem HUVEC-Monolayer von drei unabhängigen Experimenten.

3.2 Kapsel und Pneumolysineigenschaften der Pneumokokken beeinflussen die Induktion von Apoptose in HUVEC

Die Bedeutung von Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* in Bezug auf Apoptoseinduktion sollte im Folgenden näher betrachtet werden. So wurden wichtige Pathogenitätsfaktoren, wie die Kapsel, Pneumolysin und Wasserstoffperoxid, in ihrer Fähigkeit, Apoptose in HUVEC hervorzurufen, untersucht. In diversen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Pneumolysin und Wasserstoffperoxid in Endothelzellen zu programmiertem Zelltod führen (Berpohl et al., 2005; Rubins und Janoff 1998). In unserer Studie wurden HUVEC mit dem bekapselten D39, mit seinem unbekapselten Derivat R6x und *R6xΔply*, dem durch Mutation Pneumolysin fehlt, für 16 Stunden infiziert (vgl. Abb. 3.2 A und 3.2 B). Dabei stellte sich heraus, dass R6x in endothelialen Zellen verstärkt Apoptose induzierte, während *R6xΔply*, die Pneumolysin-deletierte Mutante, weniger Apoptose in HUVEC hervorrief.

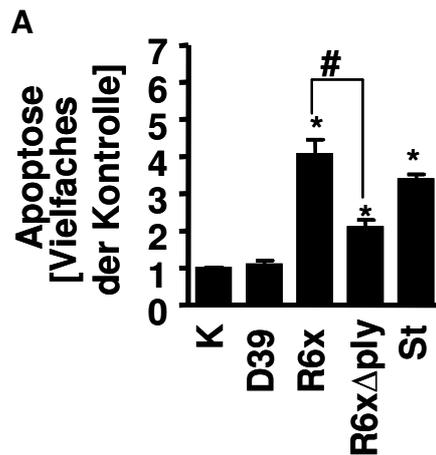


Abb. 3.2 A: *R6x*-bedingte endotheliale Apoptose ist Pneumolysin-abhängig

HUVEC wurden für 16 Stunden mit bekapselten *D39*, unbekapselten *R6x*, Pneumolysin-deletierten Mutanten *R6x Δ ply* (10^6 cfu/ml) und Staurosporin (St, 1 μ M) inkubiert. DNA-Fragmente (gezeigt: Vielfaches der Kontrolle) wurden dann gemessen. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen (K), wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden gezeigt.

Innerhalb des gegebenen Zeitrahmens kam es nicht zur Steigerung der LDH-Ausschüttung von *R6x* und *R6x Δ ply* (vgl. Abb. 3.2 B). Auch fand innerhalb der 16-stündigen Exposition mit *D39* (10^6 cfu/ml) keine Aktivierung der endothelialen DNA-Fragmente statt. Als Zeichen des nekrotischen Zelltodes wurde jedoch ein erhöhter Spiegel der LDH-Ausschüttung beobachtet.

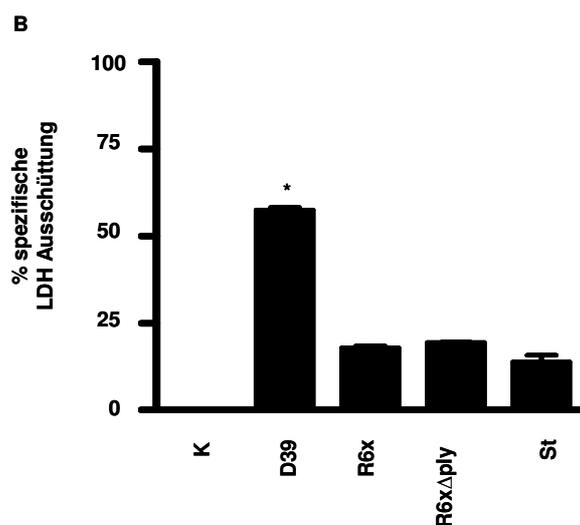


Abb. 3.2 B: *S.-pneumoniae*-Kapsel führt zu erhöhter LDH-Ausschüttung in HUVEC

HUVEC wurden für 16 Stunden bekapselten *D39*, unbekapselten *R6x*, Pneumolysin-deletierten Mutanten *R6xΔply* (10^6 cfu/ml) und Staurosporin (St, 1 μ M) ausgesetzt. LDH-Ausschüttung (gezeigt als %-spezifische) wird präsentiert. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen (K), wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden gezeigt.

Da bekannt ist, dass *S. pneumoniae* H_2O_2 produziert (Hoskins et al., 2001), wurde die Wirkung dieses Pathogenitätsfaktors auf der Apoptoseinduktion untersucht. H_2O_2 kann leicht durch die Membran der Zellen diffundieren und eine oxidative Schädigung auslösen (Siguad et al., 2005; Oda et al., 2001). Deshalb wurde die Rolle von Wasserstoffperoxid in Bezug auf den *R6x*-induzierten programmierten Zelltod ermittelt. Dazu wurden HUVEC mit NAC (*N-Acetyl-L-Cysteine*), einem Antioxidans, vorinkubiert und später mit *R6x* und *D39* stimuliert. Es konnte eine signifikante Reduzierung der Apoptose nach der Exposition mit *R6x* sowie eine deutliche Reduzierung der LDH-Ausschüttung in *D39*-infizierten Zellen ermittelt werden (vgl. Abb. 3.2 C und 3.2. D).

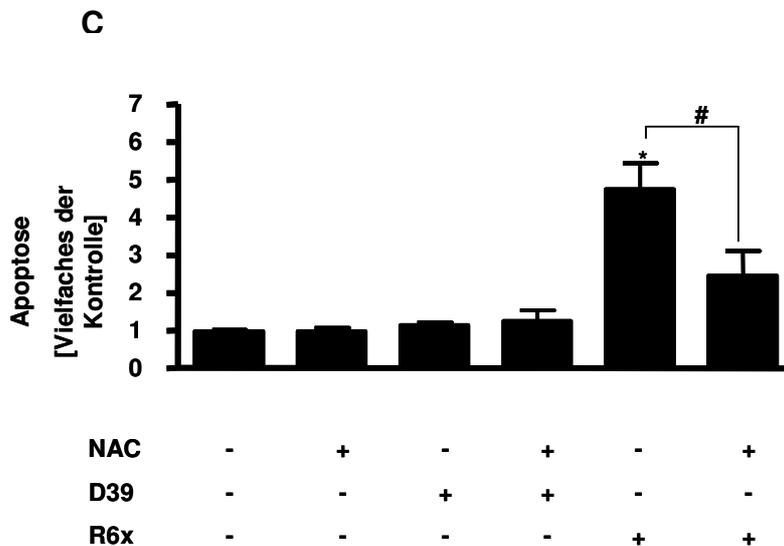


Abb. 3.2 C: *R6x*-bedingte endotheliale Apoptose ist zum Teil Wasserstoffperoxid-abhängig

HUVEC wurden mit NAC (1 μ M) vorinkubiert, dann für 16 Stunden bekapseltem *D39*, unbekapseltem *R6x*, pneumolysin-deletierten Mutanten *R6xΔply*, (10^6 cfu/ml) ausgesetzt. Die DNA-Fragmentierung wird gemessen. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen, wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Ein Wert mit $p < 0,05$, verglichen mit stimulierten Zellen, mit und ohne Inhibitor durch (#). Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden gezeigt.

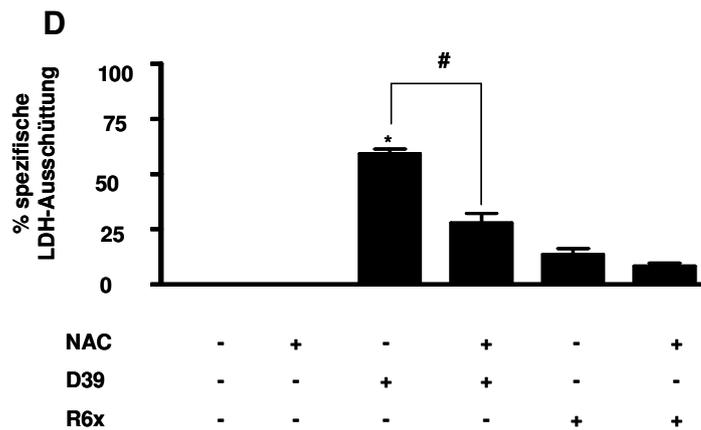


Abb. 3.2 D: D39-bedingte Nekrose ist zum Teil Wasserstoffperoxid-abhängig

HUVEC wurden mit NAC (1 μ M) vorinkubiert, dann für 16 Stunden bekapseltem *D39*, unbekapseltem *R6x* und Pneumolysin-deletierten Mutanten *R6x Δ ply* (10^6 cfu/ml) ausgesetzt. Die LDH-Ausschüttung wurde gemessen. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen, wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Ein Wert mit $p < 0,05$, verglichen mit stimulierten Zellen, mit und ohne Inhibitor durch (#). Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden gezeigt.

3.3 *S. pneumoniae* R6x induziert Caspase-6- und Caspase-9-abhängige endotheliale Apoptose

Der programmierte Zelltod wird durch das Aktivieren hierarchischer Caspasekaskaden zuerst Aktivierung der Aktivatorencaspasen 8 und 9, welche zur Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 6 führen ausgelöst (Desagher und Martinou, 2000). Um den Mechanismen der durch *S. pneumoniae* induzierten Apoptose in HUVEC zu klären, wurden Endothelzellen mit dem Pancaspaseinhibitor zVAD vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit *S. pneumoniae* *R6x* infiziert. Als Positivkontrolle diente der starke Caspaseaktivator Staurosporin (1 μ M). Eine vollständige Rückbildung der Apoptose in vorinkubierten Zellen war zu beobachten (vgl. Abb. 3.3 D).

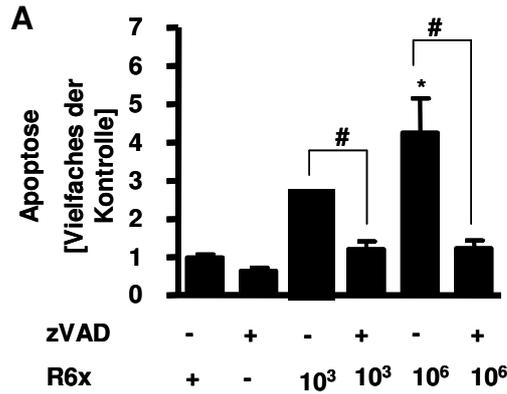


Abb. 3.3 A: R6x induziert Caspasen-abhängige Apoptose in HUVEC

HUVEC wurden mit 50 µg/ml Pancaspaseinhibitor zVAD für 30 Minuten vorinkubiert und dann mit R6x (10³ cfu/ml und 10⁶ cfu/ml) für 16 Stunden stimuliert. Analysiert wurden dann die Apoptose. Ein Wert von p < 0,05, verglichen mit unstimulierten Zellen (K), wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Ein Wert mit p < 0,05, verglichen mit stimulierten Zellen, mit und ohne Inhibitor durch (#). Repräsentative Proben von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen werden dargestellt.

Weitere Untersuchungen in infizierten Zellen zeigten eine starke Aktivierung der Caspasen 6 und 9 (vgl. Abb. 3.3 C und D). Eine Aktivierung der Caspase 3 wurde erst nach 24 Stunden beobachtet (vgl. Abb. 3.3 B). Dies gibt den Hinweis, dass Caspase 3 in der durch Pneumokokken bedingten Apoptose in HUVEC keine Rolle spielt, da dieser Prozess vor dem Ablauf von 16 Stunden sein Optimum erreichte.

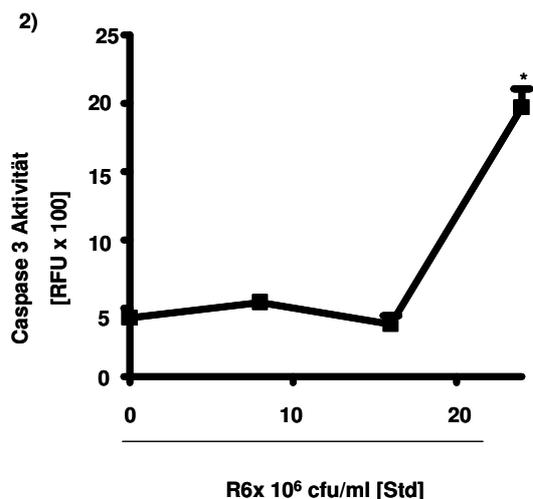
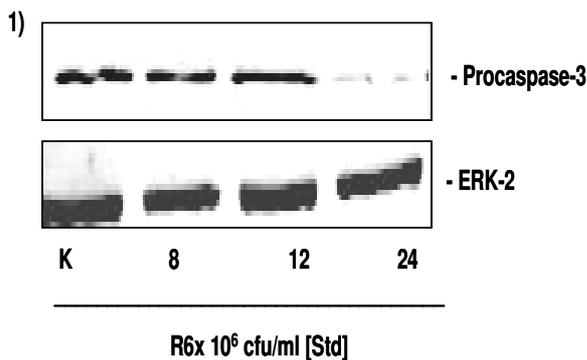


Abb. 3.3 B: R6x aktiviert Caspase 3

HUVEC wurden mit *R6x* 10^6 cfu/ml für 20 Stunden inkubiert. Die Caspase-3-Aktivität wurde mittels Western Blot (1) und Fluorometrie (2) gemessen. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen (K), wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Gezeigten Daten sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

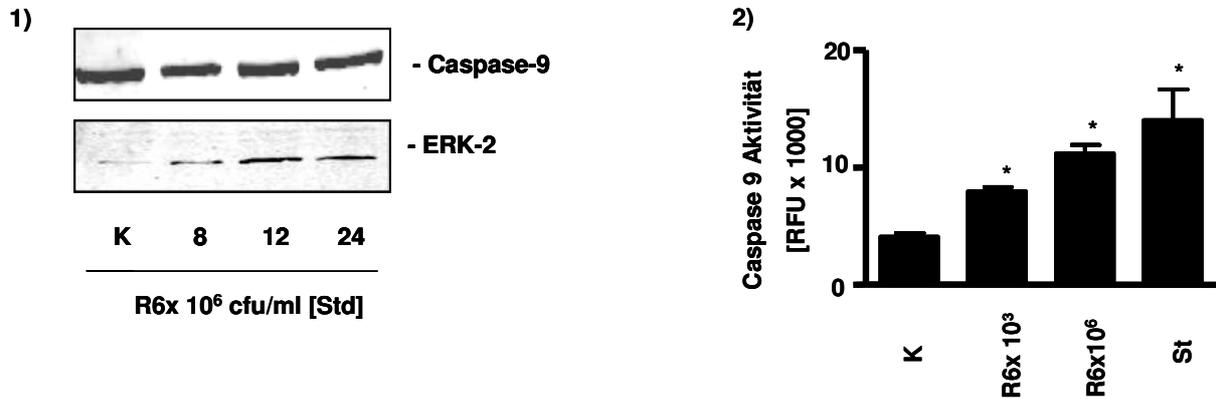


Abb. 3.3 C: R6X aktiviert Caspase 9

HUVEC wurden mit *R6x* (10^3 cfu/ml und 10^6 cfu/ml) für 24 Stunden inkubiert. Die Caspase-9-Aktivität wurde mittels Western Blot (1) und Fluorometrie (2) detektiert. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen, wird dargestellt durch ein Sternchen (*). RFU: *Relative Fluorescence Units*. Die gezeigten Daten sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

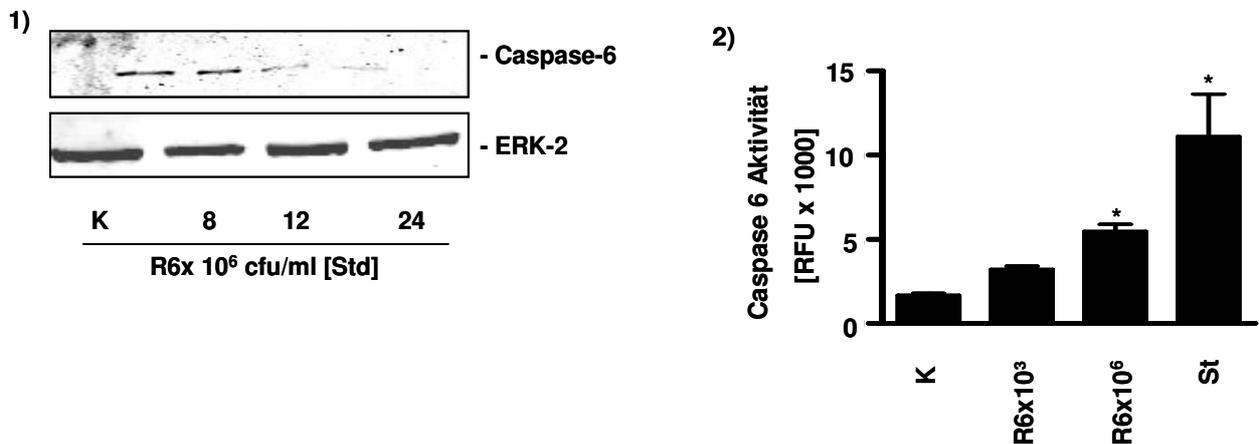


Abb. 3.3 D: R6X aktiviert Caspase 6

HUVEC wurden mit *R6x* (10^3 cfu/ml und 10^6 cfu/ml) für 16 Stunden inkubiert. Die Caspase-6-Aktivität wurde mittels Fluorometrie (2) gemessen und mit Western Blot (1) detektiert. Ein Wert von $p < 0,05$, verglichen mit unstimulierten Zellen, wird dargestellt durch ein Sternchen (*). RFU: *Relative Fluorescence Units*. Die gezeigten Daten sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Beim endothelialen Zelltod kommt es zur Reduzierung der antiapoptotischen Bcl-2 und zur zytosolischen AIF-Erhöhung

Die in Abbildung 3.3 D beobachtete Aktivierung von Caspase 6 und 9 nach der Inkubation der Endothelzellen mit Pneumokokken weist darauf hin, dass mitochondrienabhängige Faktoren in durch Pneumokokken bedingter Apoptose involviert sind (Desagher und Martinou, 2000). Die Proteinexpression des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins, des proapoptotischen Bax-Proteins sowie von AIF, welches eine besondere Rolle bei der Caspasen-unabhängigen Apoptose spielt, wurden analysiert.

Wie Abbildung 3.4 demonstriert, führte eine Infektion der endothelialen Zellen mit *R6x* zu einer Verminderung des Proteingehaltes von Bcl-2. Innerhalb des untersuchten Zeitrahmens konnte gezeigt werden, dass die Bax Expression nicht beeinflusst wurde. Interessanterweise war eine zytosolische Erhöhung von AIF nach 8 Stunden in Pneumokokken-infizierten HUVEC zu verzeichnen.

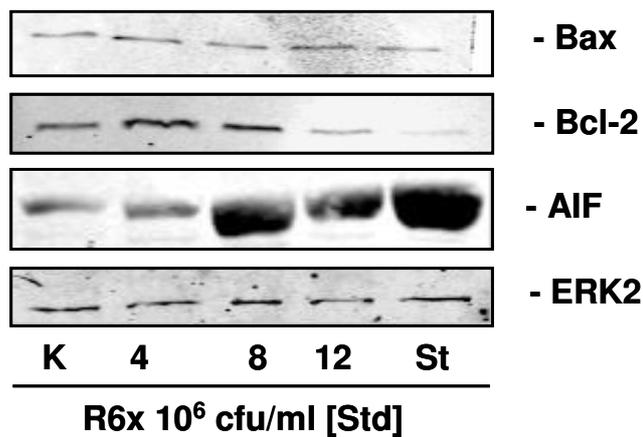
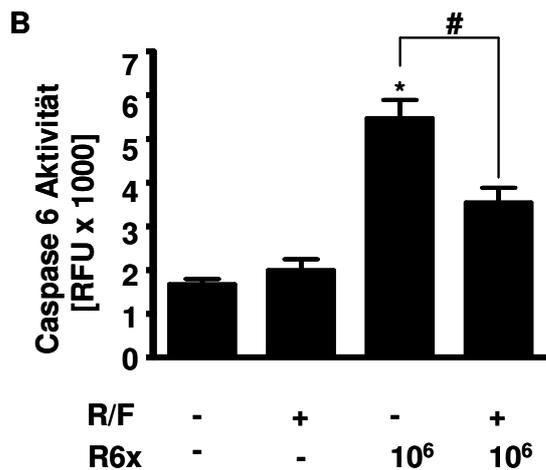
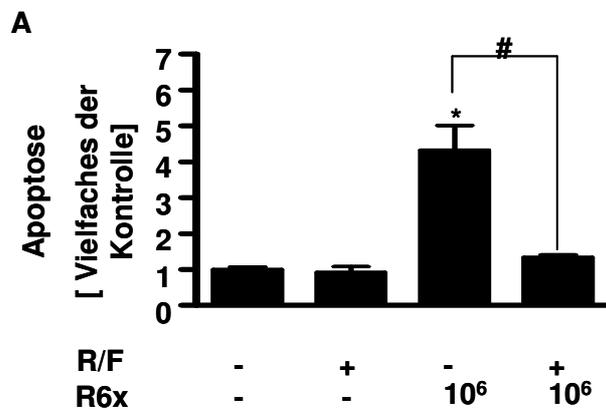


Abb. 3.4: *R6x* induziert sowohl Bcl-2 als auch AIF in HUVEC

HUVEC wurden mit 10^6 cfu/ml *R6x* für 12 Stunden inkubiert. Diese Exposition führte zur Reduzierung der Bcl-2-Spiegel und zur Erhöhung der zytosolischen AIF, aber zu keinem Effekt der Bax-Protein-Spiegel. Bcl-2, Bax, AIF und ERK2 (Loading-Kontrolle) wurden dann mit Western Blot detektiert. Repräsentative Blots aus drei unterschiedlichen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen werden gezeigt.

3.5 *S. pneumoniae*-R6x-induzierter Zelltod ist durch cAMP-Expression blockierbar

Es ist bereits bekannt, dass cAMP mit mitochondrienabhängiger Apoptose interferiert (Hippenstiel et al., 2002). Demzufolge wurde das intrazelluläre cAMP vor Infektion in HUVEC erhöht. Dies geschieht zum einen durch die Aktivierung der Adenylatzyklase (Forskolin 1 μ M) und die Hemmung der PDE 4 (Rp 73401, 1 μ M). Der Anstieg von intrazellulärem cAMP blockierte sowohl die *S. pneumoniae*-induzierte Apoptose (Abb. 3.5) als auch die Aktivierung von Caspase 6 und 9. Innerhalb des untersuchten Zeitraums konnte kein Anstieg der LDH-Aktivität im Zellüberstand festgestellt werden.



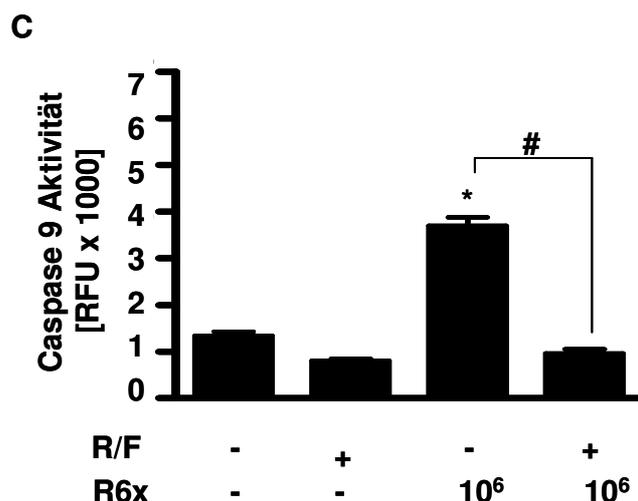


Abb. 3.5 A–C: cAMP-Zunahme blockiert sowohl die Pneumokokken-bedingte Aktivierung der Caspasen 6 und 9 als auch die Apoptoseinduktion

HUVEC wurden mit RP-73401 (1 μ M) und Forskolin (1 μ M) vorinkubiert und nachfolgend für 16 Stunden mit *S. pneumoniae* (10^6 cfu/ml) infiziert. Die Erhöhung von cAMP blockierte sowohl die Apoptose als auch die Caspase 6- und 9-Aktivierung in infizierten humanen Endothelzelle. DNA-Fragmente wurden mit *Cell death ELISA* gemessen und die Aktivität der Caspasen 6 und 9 im Assay bestimmt. $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Ein Wert mit $p < 0,05$ verglichen mit stimulierten Zellen mit und ohne Inhibitor durch (#). RFU: Relative Fluorescence Units. Die gezeigten Daten sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.6 *S.-pneumoniae*-R6x-induzierte endotheliale Apoptose beruht auf p38- und JNK-Aktivierung

Die MAPK-Kaskade wird durch inflammatorische Reaktionen aktiviert und spielt eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und Zelltod (Wada und Penninger, 2004). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass p38-MAPK und -JNK zu der Pneumokokken-induzierten Apoptose in Endothelzellen beisteuern könnten. Humane Endothelzellen wurden mit Pneumokokken infiziert. Nach 30 und 60 Minuten konnte eine starke Phosphorylierung beide Kinase beobachtet werden, welche 2 Stunden später endete (Abb. 3.6). Um zu bestimmen, ob die MAPK-Aktivierung bei der *S. pneumoniae*-induzierten Apoptose eine Rolle spielt, wurden die Endothelzellen mit spezifischen Inhibitoren für p38- MAPK (SB202190) und -JNK (SP 600125) eine Stunde vorinkubiert. Danach wurden sie mit Pneumokokken für 16 Stunden infiziert. Wie Abbildung 3.6 B zeigt, reduzierten sowohl die p38- als auch die JNK-Inhibitoren die

Streptococcus-pneumoniae-induzierte Apoptose. SB202474, eine chemische Kontrolle von SB202190, zeigte keinen Effekt.

Die Pneumokokken-abhängige Aktivierung der Caspasen 6 und 9 wurde durch die Inhibition beider Kinasen reduziert. Dies konnte mit dem Caspasen-Aktivität-Assay bestätigt werden. Die in dieser Studie verwendete Konzentrationen von SB202190 und SP600125 veränderten nicht das Wachstum der Bakterien innerhalb des Zeitrahmens (Daten werden hier nicht gezeigt).

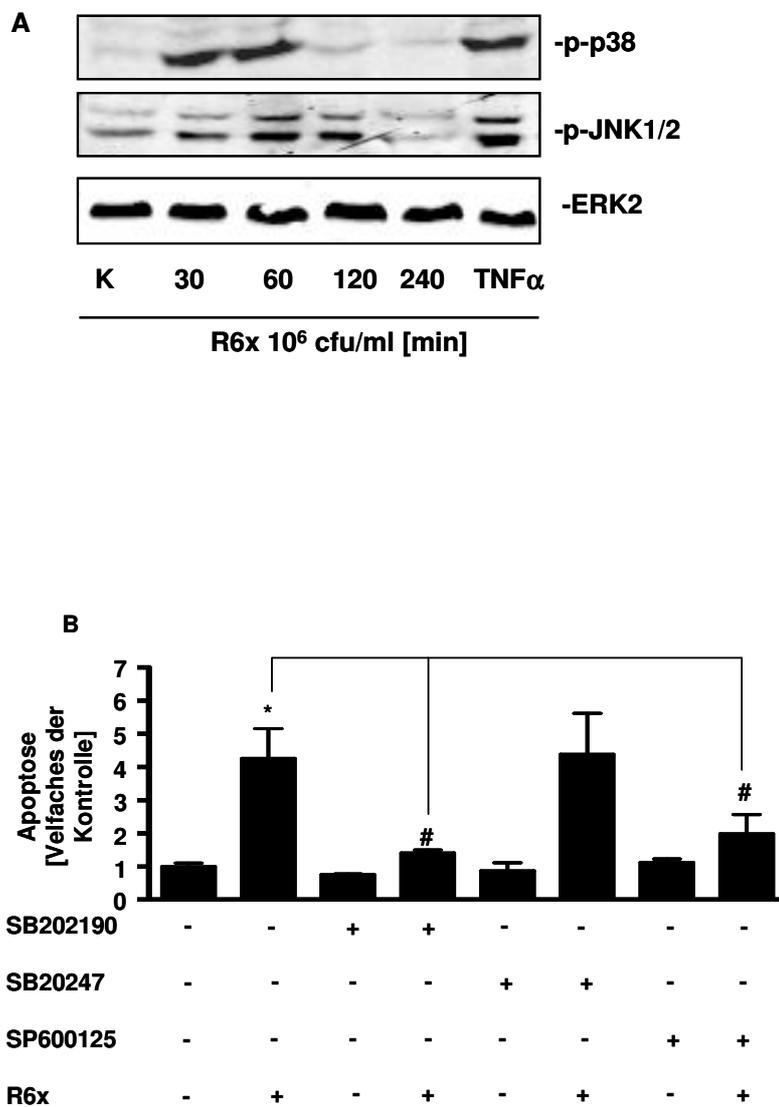


Abb. 3.6A-B : R6x reduziert endotheliale Apoptose in p38- und JNK-abhängiger Aktivierung

HUVEC wurden mit *R6x* (10^6 cfu/ml) für den genannten Zeitraum inkubiert. Phosphorylierte p38-MAPK und -JNK und ERK2 (loading control) wurden mit Western Blot detektiert (A). Abb. B: HUVEC wurde mit p38-MAPK-Inhibitor SB 202190 (10 μ M), inaktiver chemischer Kontrolle SB202474 (10 μ M) und JNK-Inhibitor SP600125 (10 μ M) vorinkubiert. Danach wurden die Zellen für 16 Stunden mit *S. pneumoniae* (10^6 cfu/ml) infiziert. Apoptose wurde dann anschließend gemessen. Ein Wert von $p < 0,05$ verglichen mit unstimulierten Zellen wird dargestellt durch ein Sternchen (*). Ein Wert mit $p < 0,05$, verglichen mit stimulierten Zellen, mit und ohne Inhibitor durch (#). Repräsentative Blots und Daten aus drei verschiedenen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen werden abgebildet.

4 Diskussion und Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass infizierte humane umbilikale Endothelzellen (HUVEC) einen jeweils Pneumokokkenstamm abhängenden, unterschiedlichen Zelltod erleiden können. So induziert unbekapselte *S. pneumoniae* (R6x) einen Zeit- und konzentrationsabhängigen Apoptose wohingegen bekapselte Bakterien (D39) einen nekrotischen Zelltod hervorriefen.

Die beobachtete Apoptose war Pneumolysin abhängig im Gegensatz wurde die Nekrose durch den Pathogenitätsfaktor H_2O_2 induziert. Bei dem pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod spielten die Caspasen 6 und 9 eine entscheidene Rolle. Darüberhinaus waren die mitochondrialen Faktoren Bcl2 und AIF essentiell für die beobachtete Apoptose. Die *S. pneumoniae* induzierte Apoptose wurde auch durch die p38 und JNK MAPK kontrolliert. Die Erhöhung der cAMP Spiegel führte zu Blockade sowohl der Caspasen 6 und 9 Aktivität als auch der Apoptose. Dass Caspasenaktivierung in dem pneumokokkeninduzierten programmierten Zelltod eine Rolle spielt, konnte mittels eines Pancaspaseninhibitors sowie eines spezifischen Caspase-6-Inhibitors, welche beide eine deutliche, aber nicht vollständige Reduktion der Apoptoserate bewirken, gezeigt werden. So konnte eine Spaltung der proapoptotischen Proteine Bid und Bax sowie die Reduktion des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 nachgewiesen werden.

Zusammengefasst erbrachten diese experimentellen Untersuchungen neue Erkenntnisse zum Verständnis der Pneumokokken-Endothel-Interaktion.

4.1 Nachweis des programmierten Zelltods nach Infektion umbilikaler Endothelzellen mit Pneumokokken

Humane umbilikalvenöse Endothelzellen wurden präpariert und für 4 bis 5 Tage kultiviert. Die Huvecs wurden mit nicht bekapselten Pneumokokken (R6X) in eine Konzentration 10^3 oder 10^6 infiziert. Diese Konzentration wurde ausgewählt nach Infektion der Endothelzellen mit unterschiedlichen Dosen der Pneumokokken.

Standardmethoden wie Cell death Elisa (Messung der DNS – Fragmentierung) , Tunnelfärbung , die Annexin V Bindung an apoptotischen Zellen sowie die Caspasenaktivierung wurden alle samt in diese Studie verwendet. Alle diese Methoden lieferten gleiche Ergebnisse in dieser Studie. Somit liegt eine solide Beobachtung vor.

Wir fanden heraus, dass nicht bekapselte *Streptococcus pneumoniae* R6x konzentration- und zeitabhängig programmierten Zelltod in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene induzieren können. Als etablierter Nachweis für den programmierten Zelltod gilt die internukleosomale DNS-Spaltung in Fragmente von 180 Basenpaaren durch DFF 40 (DNA-Fragmentations-Faktor 40) und die CAD (Caspasen-aktivierte DNase) (Wyllie, 1980; Bortner, 1995). Durch weitere Parameter, wie die vermehrte Annexin-V-Bindung an der äußeren Zellmembran und DNS-Strangbrüche im TUNEL-Assay wurden diese Beobachtungen noch unterstützt. Die Bindung von Annexin V an das durch Apoptose bedingte extrazelluläre Phosphatidylserin gilt als etablierte Methode zur Quantifizierung der Apoptose (Fadok und Henson, 1998). Die TUNEL-Methode gehört zu den am meisten verwendeten Apoptose-Assays. Sie kann bei adhärennten Zellen (Endothelzellen) und nicht adhärennten Zellen angewendet werden (Sgonc und Gruber, 1998).

4.2 Induktion endothelialer Apoptose durch *Streptococcus pneumoniae*: Bedeutung von Pneumolysin

Eine wichtige Strategie von Bakterien bei der Pathogenese von Infektionen scheint die Induktion und Modulation von Apoptose zu sein. Dabei benutzen verschiedene Erreger unterschiedliche Wege, um Apoptose auszulösen. Studien an Endothelzellen beweisen, dass Apoptose für die früheren Schritte der Atherosklerose und Myokardialischämie (Nofer et al., 2001; Martinet et al., 2001) verantwortlich ist, und dass Strategien, die die Apoptose limitieren, die vaskuläre und myokardiale Zerstörung reduzieren. Umso wichtiger ist es, die Expression und die regulierenden Signalwege der Apoptose zu identifizieren. In einer anderen Studie führten *Streptococcus pneumoniae* in mikrovaskulären Endothelzellen zu einer Zerstörung der Endothelzellmonolayer, ein Effekt, der für die Zytotoxizität von Pneumolysin kennzeichnend ist (Zysk, 2001). Rubins et al. beschreiben in einer Studie, dass Pneumolysin die Zytotoxizität der Lungenepithelzellen induzierte. Weder Apoptose noch Nekrose wurden jedoch spezifisch untersucht. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Pneumokokken-bedingte Apoptose zum Teil Pneumolysin abhängig war. Diese Daten liegen in der Übereinstimmung mit Ergebnisse von Braun et al., welche zeigten, dass Pneumolysin in neuronale und mikrogliale Zellen die Apoptose induzierte (Braun et al., 2007 und 2002; Sublett et al., 2002). Ein wesentliches Virulenzmerkmal des Pneumokokkentoxins ist die Pneumolysin. Sie ist ein Porenbildner Toxin. Eine wichtige Eigenschaft der

Pneumokokken, der für die Auslösung Pneumolysins und seine Virulenz notwendig ist, ist die Autolysin, der durch Zellwanddegradierung charakterisiert ist. Pneumolysin kommt innerhalb des bakteriellen Zytoplasmas vor. Das Sie nicht über N-terminale Sequenz verfügen, ist die die Zytolyse eins von mehreren Merkmale (Walker et al. 1987). Verändertes Pneumolysin, das durch Mutation in der jeweiligen Domäne entstanden ist, wurde verwendet, um zu untersuchen, welche Eigenschaften von Pneumolysin zur Zytotoxizität führen. Somit stellt Pneumolysin einen wichtigen virulenten Faktor in der Pneumokokken-bedingten Apoptose dar (Paton, 1996).

4.3 Induktion endothelialer Nekrose durch *Streptococcus pneumoniae*: Bedeutung von der Kapsel

Wichtige Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* sind die Kapsel und die Produktion von H₂O₂ (Yoo et al., 2010; Duane, 1993; Tauber, 1991; Rubins et al., 1991). Je nach Vorhandensein und Art der Kapsel wurden verschiedene Muster des apoptotischen und nekrotischen Zelltods gefunden. In dieser Studie führte Infektion von humanen Endothelzellen mit bekapselte *S. pneumoniae* zu einer massiven LDH-Ausschüttung und einer immensen Propidiumiodid-Färbung. Dies weist auf nekrotische Prädominanz hin. Das Vorkommen von Polysaccharidkapseln in *S. pneumoniae* korreliert mit der Virulenz der Bakterien hinsichtlich Meningitis, Sepsis und Mortalität, sowohl in humanen als auch in murinen Modellen (Martens, 2004; Worm et al., 2004; Engelhard, 1997). Hammerschmidt und Kollegen stellten eine Kapselreduktion bei bekapselten Pneumokokken vor dem Bakterien Zell Kontakt fest (Hammerschmidt 2005). Somit ist wahrscheinlich bewiesen, dass Pneumokokken beim Zellkontakt die Kapsel abwirft. Hirst et al., identifizierten den zytotoxischen Effekt von bekapselten Pneumokokken in humane Monozyten, als Zeichen der Nekrose (Hirst et al., 2002).

Ähnlich führten in Makrophagen (Ali et al., 2003) und Epithelzellen (Schmeck et al., 2004) bekapselte Pneumokokken überwiegend zur Nekrose, da möglicherweise bekapselte Pneumokokken Apoptose-induzierende Faktoren maskieren und reduzieren und somit die Nekrose begünstigen. In einem anderen Modell fanden Braun et al. heraus, dass sowohl unbekapselte als auch bekapselte Pneumokokken neuronale Apoptose im Hippokampus induzieren (Braun et al., 2001; Braun et al., 2002). Wegen des starken Zytotoxizitätseffekts der bekapselten Pneumokokken werden in in-vitro-Studien unbekapselte Pneumokokken benutzt (Ring et al., 1998; Novak, 2000; Elm et

al., 2004). Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung der Kapsel für zellmolekulare Vorgänge zu klären.

Streptococcus pneumoniae produzieren auffällig viel Wasserstoffperoxid (H_2O_2), da sie keine Katalase aufweisen (Pericone et al., 2000). Diese bewirken eine oxidative Schädigung von Wirtszellen. Braun et al., zeigten in mehreren Studien, dass nicht nur Pneumolysin sondern auch H_2O_2 sich als Apoptosetrigger in vitro erweisen.

Um feststellen zu können, ob H_2O_2 für die Zytotoxizität in der Endothelzelle eine Rolle spielt, wurde eine Pneumokokkenmutante verwendet, der auch neben Pneumolysin auch das Enzym zur Bildung von H_2O_2 fehlt. Dazu wurden HUVEC NAC zugegeben. Es konnte eine signifikante Reduzierung der Apoptose und eine deutliche Reduzierung der LDH-Ausschüttung ermittelt werden. In eine frühere Arbeit von Pfister wurde nach Behandlung mit einem Antioxidans eine signifikante Reduzierung des zerebralen Blutflusses in einem Rattenmodell festgestellt (Pfister et al., 1992).

4.4 Signaltransduktion der Apoptose in *S. Pneumoniae* infizierten Zellen

4.4.1 Bedeutung von Caspasen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass *Streptococcus pneumoniae* unter Beteiligung von Caspasen zu endothelialer Apoptose führt. In der *Streptococcus-pneumoniae*-bedingten Apoptose wurden die Initiatorprocaspase 9 und die Effektorprocaspasen 3 und 6 im *Western Blot* und im Caspasen-Aktivitäts-Assay untersucht. Beide Verfahren gelten hinsichtlich der Untersuchung der Caspasen in der Apoptose als zuverlässig und wurden schon erfolgreich in mehreren Studien eingesetzt (Qa'Dan et al., 2002; Linsemann et al., 2001; Blanco-Colia et al., 2002; Li et al., 2002). In dieser Studie lösten Pneumokokken eine Caspase 3, 6 und 9 abhängigen induzierten Zelltod in HUVEC aus, wobei die regulatorischen Caspasen 6 und 9 aktiviert wurden. Tauber et al. (1991) beschreiben in einer experimentellen Untersuchung die pathophysiologischen Unterschiede der Meningitis, die durch drei verschiedene *Streptococcus-pneumoniae*-Stämme verursacht werden. Untersuchungen an Tiermodellen zeigen, dass die Apoptose von Neuronen ein entscheidender Schädigungsmechanismus bei der Pneumokokkenmeningitis ist (Zysk et al., 1996). Um die Funktion der Endothelbarriere zu erhalten, sind vitale Endothelzellen wichtig. Sie steuern signifikant inflammatorische Reaktionen, wie Mediatorenausschüttung und Fibrinolyse (Hippenstiel und Suttorp, 2003). Störungen der Endothelbarrierefunktion und der Ödemformation durch den programmierten Zelltod können zum Verlust von Organfunktionen führen und dadurch

nachteilig für den Wirt sein. Die Aktivierung der Caspase 8 blieb aus, während eine deutliche Aktivierung der Caspasen 3, 6 und 9 in beiden Messverfahren zu verzeichnen war. Die Untersuchung des *Streptococcus-pneumoniae*-bedingten programmierten Zelltods in HUVEC zeigte, dass die Apoptoseinduktion von Caspase 6 und 9 durch eine Aktivierung begleitet wird. In zahlreichen Tierversuchen wurde die Bedeutung einzelner Signalkaskaden für die Apoptose untersucht. Gezeigt wurde, dass eine Überexpression von Caspasen, Apoptose induzierte (Miura et al., 1993), während selektive Caspaseinhibitoren Apoptose verhinderten (Bump et al., 1995). Van Mehring et al. fanden in einem Mausmodell über Pneumokokkenmeningitis und Sepsis heraus, dass eine Erhöhung der Caspaseexpression einschließlich der Caspase 6 (von Mering et al., 2005) stattfindet. Die Caspase 6 spielt eine essenzielle Rolle bei der Apoptose der primären neuronalen Zellen und Endothelzellen (Neuzil et al., 2001). Andere Studien zeigen, dass eine Infektion von Epithelzellen mit *Pseudomonas aeruginosa* (Cannon et al., 2003) und *Helicobacter pylori* (Potthoff et al., 2002) ebenfalls zu einer Caspase-6-Aktivierung führt. Zur näheren Charakterisierung des endothelialen Zelltodes durch *S. pneumoniae* wurde überprüft, ob und zu welchem Zeitpunkt Caspasen aktiviert werden. Dazu wurden Endothelzellen mit Pneumokokken infiziert. Eine Procaspase-3-Spaltung wie auch eine Caspase-3-Aktivität wurden erst 24 Stunden später beobachtet, wohingegen massive Apoptose schon nach 12 bis 16 Stunden stattfand. Im Gegensatz dazu wurde bei Staurosporin, einem bekannten starken Apoptoseinduktor, induzierte Caspase-3-Aktivität bereits 12 Stunden nach der Infektion beobachtet. Es ist nicht bekannt, ob dabei eventuell eine Kreuzreaktion zwischen exekutierenden Caspasen zu einer Caspase-6-abhängigen Aktivität der Caspase 3 führt (Allsopp et al., 2000). Dies zeigt, dass Caspase 3 in dem benutzten experimentellen Modell nicht signifikant zu Pneumokokken-bedingter Apoptose beizutragen scheint bzw. dafür wichtig ist.

Um die physiologische Wirkung der Caspaseaktivität von Pneumokokken-induzierter endothelialer Apoptose zu evaluieren, wurde der Pancaspaseinhibitor zVAD benutzt und ein Blockierungsversuch mit diesem Breitspektrum-Caspase-Inhibitor durchgeführt. Die Vorinkubation der Endothelzellen mit zVAD zeigte, dass der Pneumokokken-induzierte Zelltod reduziert werden konnte. In anderen Studien wurde herausgefunden, dass der Pancaspaseinhibitor zVAD den programmierten Zelltod in Pneumokokken-infizierten humanen Lungenepithelzellen blockiert (Schmeck et al., 2004), und dass eine Blockierung der hippocampalen Apoptose bei experimenteller Pneumokokkenmeningitis stattfindet (Braun et al., 1999). In den letzten Jahren gibt es auch Evidenzen für

Apoptose ohne eine Aktivierung von Caspasen (Donovan et al., 2004; Leist und Jäätelä, 2001). So zeigen Pneumokokken-infizierte, apoptotische neuronale Zellen keine Caspaseaktivität. Auch kann der Zelltod nicht durch die Caspaseinhibitoren blockiert werden (Braun et al. 2001).

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass nach *Streptococcus-pneumoniae*-induziertem, programmiertem Zelltod sowohl die Caspasen 3 und 6 als auch 9 aktiviert werden. Eine Aktivierung der Caspase 8 wurde nicht beobachtet.

4.4.2 Mitochondriale Proteine: Rolle von Bcl2

Da die Initiatorcaspase 9 unter der Kontrolle von Bcl-2-Familie-Proteinen steht, welche eine Cytochrom C-Ausschüttung aus der Intermembranspalte hervorrufen, wurde die Expression von Bcl-2 und Bax in HUVEC sowie die Inkubation mit Pneumokokken in dieser Studie untersucht. In der äußeren Mitochondrienmembran regeln Mitglieder der Bcl-2-Familie als Torwächter die Ausschüttung von proapoptotischen Molekülen. Zytosolisches Cytochrom C aktiviert Apaf-1, der Caspase 9 oligomerisiert, was zur Aktivierung der Caspasen 3 und 6 führt (Garcia-Saez et al., 2010; Martinou und Green, 2001). Bcl-2 gehört zu den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, die den programmierten Zelltod auf mitochondrialer Ebene regulieren. Sie verhindern den Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials sowie die dort damit assoziierte Freisetzung von proapoptotischen Molekülen aus dem mitochondrialen Intermembranraum ins Zytosol, wo sie dann zur Aktivierung der Caspasenkaskade beitragen (Labeledzka et al., 2006; Kluck et al., 1997; Hengartner und Horvitz, 1994).

Die Exposition von Endothelzellen mit Pneumokokken reduzierte das antiapoptotische Bcl-2, während Bax innerhalb des analysierten Zeitraums von 4 bis 24 Stunden konstant blieb. Somit überwiegen proapoptotische Faktoren, die wahrscheinlich einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials hervorrufen (Desagher und Martinou, 2001). Da eine Bcl-2-Überexpression in Alveolarepithelzellen eine Resistenz gegenüber *Streptococcus-pneumoniae*-induziertem programmiertem Zelltod zeigte, vermutet man eine wichtige Rolle des Bcl-2-Proteins bei der Pneumokokken-abhängigen Apoptose. Ähnlich erhöhte Mykobakterien in humanen Makrophagen die Expression von Bcl-2, um das Überleben der Wirtszellen zu verlängern (Mogga et al., 2002).

4.4.3 Mitochondriale Proteine: Rolle von AIF

Neue Studien belegen eine Existenz von Caspasen-unabhängigen apoptotischen Kaskaden beim Pneumokokken-induzierten Zelltod (Braun, 2001; Novak et al., 2001). Es stellt sich die Frage, ob dabei AIF freigesetzt wird.

Apoptose-induzierende Faktoren wurden vor kurzem in charakterisierten, proapoptotischen mitochondrialen Proteinen entdeckt (Susin et al., 2000). Die pathologische Rolle dieser Proteine wurde in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (Joseph et al., 2000) sowie glatten Muskelzellapoptosen (Granville et al., 2001), Leukämie (Yasugi et al., 2000) und HIV gesehen (Ferri et al., 2000). AIF könnte ein ergänzender kooperativer Signalweg sein, der mit Caspasen zu nuklearer Apoptose führt. In verschiedenen Arbeiten konnte AIF identifiziert werden, die bei Pneumokokken-behandelten Endothelzellen durch Kondensation des Chromatins gekennzeichneten Kernpolymorphologie zu beobachten ist (Leist und Jäättelä, 2001; Daugas, 2000). Durch welche Mechanismen AIF zu nuklearen Veränderungen führt, ist unklar. Es ist aber bekannt, dass AIF mit Endonuklease G interagiert, die Caspasen-unabhängig DNS degradieren kann (Hansen und Nagley, 2003).

Die AIF-Ausschüttung aus endotheliale Zytosol, die Caspasen-abhängige Apoptose induziert, konnte bestimmt werden (Braun et al., 2001). Die Exposition von Endothelzellen mit Pneumokokken demonstriert die zytosolische AIF-Spiegel-Erhöhung. Da der programmierte Zelltod durch den Pancaspaseinhibitor zVAD inhibiert wurde, ist ein zusätzliches Glied zwischen AIF und Caspase zu erwägen. Mehrere Studien zeigen, dass eine Ausschüttung von AIF aus den Mitochondrien durch aktivierte Caspasen und das Caspase-aktivierte Protein t-Bid ausgelöst werden kann (Lassus et al., 2002; Zamzami et al., 2000; Robertson et al., 2002). In HeLa- und Jurkat-Zelllinien, die mit Staurosporin oder Actinomycin D vorbehandelt wurden, wird die mitochondrielle Ausschüttung von AIF durch Caspaseinhibitoren unterdrückt. Deshalb wird zwischen Caspasen-unabhängigen und Caspasen-abhängigen Mechanismen der mitochondriellen AIF-Ausschüttung unterschieden. Der Mechanismus der AIF-Ausschüttung aus der mitochondriellen Intermembranspalte ist noch unzureichend aufgeklärt.

4.4.4 Bedeutung von MAPK-Kinase

Da ein funktionelles Glied zwischen dem JNK/p38-MAPK- und dem Caspasesignalweg besteht (Muhlenbeck et al., 1998; Jou und Biemann, 1997; Juo et al., 1997; Cardone et al., 1997; Cahill et al., 1997), wurde der Effekt der Inhibitoren auf JNK- und p38-MAPK-Aktivierung und Apoptose getestet. In dieser Studie wurde gezeigt, dass Pneumokokken eine Phosphorylierung von p38-MAPK und -JNK in humanen Endothelzellen induzieren. Eine Hemmung beider Kinasen reduzierte signifikant die *Streptococcus-pneumoniae*-bedingte Caspaseaktivität wie auch die Apoptose der humanen Endothelzellen. Eine Phosphorylierung von p38-MAPK wurde auch bei *Streptococcus-pneumoniae*-infizierten Lungenepithelzellen (Schmeck et al., 2004) und Makrophagen beobachtet (Monier et al., 2004). Die Phosphorylierung von JNK durch eine Pneumokokkeninfektion wurde bisher nicht beschrieben. Wie in dieser Studie beschrieben auch Aleman et al., dass *Mykobakterium tuberculosis* eine p38-MAPK-abhängige Apoptose in polymorphnuklearen Neutrophilen induziert (Aleman et al., 2004). Außerdem führte eine *Staphylococcus-aureus*-Infektion zur JNK-abhängigen Apoptose in Endothelzellen (Esen et al., 2001). Im Gegensatz dazu berichteten Liberto et al. über eine Verhinderung des Endothelzelltodes durch eine Aktivierung von p38-MAPK und -JNK nach der Exposition mit *Bartonella quintana* (Liberto et al., 2004). Mögliche antiapoptotische Mechanismen der p38-MAPK-Inhibition konnten durch Hochregulation von antiapoptotischen Bcl-2 im Herzen von transgenischen Mäusen gezeigt werden (Kaiser et al., 2004). Indessen verminderte sich die *Helicobacter-pylori*-induzierte Apoptose durch die Hemmung von p38-MAPK, ohne in den Bcl-2-Spiegel einzugreifen. Diese Studie zeigt, dass p38-MAPK und -JNK eine wichtige Rolle bei dem Pneumokokken-induzierten programmierten Zelltod spielen.

4.5 Einfluss von cAMP auf *S.-pneumoniae*-induzierte Apoptose

Als wirkungsstarke Inhibitoren der Apoptose gelten zyklische Nukleotide (Li et al., 2000). Suttorp et al. fanden heraus, dass eine cAMP-Erhöhung die H₂O₂ bedingte Störung der Permeabilität blockierte (Suttorp et al., 1993). Diese Beobachtungen waren Anlass dafür, die Rolle von cAMP bei der Apoptose und deren Regulation in Endothelzellen mit inhibierten *Streptococci pneumoniae* in HUVEC am Beispiel der Caspase 6 und 9 zu untersuchen. Die intrazelluläre cAMP-Erhöhung wurde in dieser Studie über eine Blockade der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase PDE 4 durch RP-73401 und mit einer Aktivierung der Adenylatzyklase durch Forskolin, einem Diterpen

aus *Coleus forskohlii*, erzielt. Die endotheliale Apoptose und die vorausgegangene Caspase 6- und -9-Aktivierung nach *R6x*-Exposition konnten durch den erhöhten cAMP-Spiegel signifikant reduziert werden. In einer Studie mit Neuroblastomazellen hemmte eine cAMP-Erhöhung die Caspase-3-Aktivierung (Affaitati et al., 2003). In Hepatozyten hingegen führte cAMP sowohl zur Hemmung der Caspase 3 als auch der Caspase 9 (Webster et al., 2002). In einer anderen Studie zeigten Nishihara et al., dass ein erhöhtes cAMP eine CREB (cAMP-Responsive Element-Bindung)-Protein-abhängige Zunahme der Expression des antiapoptotischen Proteins IAP-2 (Inhibitor of Apoptosis) und eine Aktivierung von ERK1/2- und p38-MAP-Kinasen hervorruft. Dies inhibiert die Apoptose in Kolonkarzinomzellen (Nishihara et al., 2004). Diese Theorie könnte für die hier beobachtete cAMP-bedingte Blockade der durch den *S.pneumoniae* hervorgerufenen Apoptose relevant sein. Die Bedeutung der cAMP-bedingten PAK-Phosphorylierung für die Apoptose bleibt zu untersuchen.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Kontrollmechanismen der durch *Streptococcus pneumoniae* induzierten endothelialen Apoptose zu untersuchen. Dazu wurden primär kultivierte humane Endothelzellen (HUVEC) mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert. Anschließend wurden verschiedene Merkmale in Bezug auf Apoptose und deren Kontrollmechanismen quantifiziert. Während die unbekapselten Pneumokokken (*R6x*) zeit- und dosisabhängige Apoptose in HUVEC auslösten, führte die Exposition gegenüber bekapselten Stämmen zu Nekrose. Die Deletion des Pneumolysingens in *R6x* führte zu verminderter Apoptose. In apoptotischen Endothelzellen waren vermehrte Caspaseaktivitäten nachweisbar und der Pancaspaseinhibitor zVAD blockierte eine Pneumokokken-induzierte Apoptose. Ebenso führte die Erhöhung von cAMP zur Blockierung von Pneumokokken-induzierter Apoptose. Die Pneumokokken-induzierte Apoptose der Endothelzellen reduzierte das Bcl-2-Protein und induzierte eine AIF-Ausschüttung sowie die Aktivierung der Caspasen 6 und 9. Pneumokokken aktivierten in Endothelzellen die p38-MAPK- und -JNK-Kinase. Die chemische Inhibition der p38 (SB202190) oder JNK (SP600125) reduzierte Pneumokokken-induzierte Apoptose, während inaktive Kontrollsubstanzen ohne Effekt waren. Die Kenntnis der Pneumokokken-bedingte Apoptose der Endothelzellen könnte signifikant zur Klärung der Pathogenität von Pneumokokkenerkrankung beitragen.

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um genauere Einblicke in das komplexe Geschehen der Apoptose zu erlangen. So können nicht nur neue potenzielle Zielproteine zur Therapie von Erkrankungen gefunden, sondern auch grundlegende biochemische und molekulare Mechanismen von *Streptococcus pneumoniae* in Endothelzellen besser verstanden werden. Darüber hinaus sollten durch In-vivo-Untersuchungen die Ergebnisse der In-vitro-Experimente vertieft werden.

5 Literaturverzeichnis

Adams, J. M.; Cory, S. (1998): The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322–1326.

Afanas'ev V.N.; Korol B.A.; Mantsygin Yu A.; Nelipovich P.A.; Pechatnikov V.A.; Umansky S.R. (1986): Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett* 194:347-50.

Affaitati A.; Cardone L.; de Cristofaro T.; Carlucci A.; Ginsberg M.D.; Varrone S.; Gottesman M.E.; Avvedimento E.V.; Feliciello A. (2003): Essential role of A-kinase anchor protein 121 for cAMP signaling to mitochondria. *J Biol Chem.* 278(6): 4286-94.

Aleman, M. S. P.; de la Barrera, S. S.; Musella, R. M.; Saab, M. A.; Baldini, M.; Abbate E.; Sasiain, M. C. (2004): Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculose patients. *Infect Immun* 72: 5150–5158.

Ali, F.; Lee, M. E.; Iannelli, F.; Pozzi, G.; Mitchell, T. J.; Read, R. C.; Dockrell, D. H. (2003): Streptococcus pneumoniae-associated human macrophage apoptosis after bacterial internalization via complement and Fcγ receptors correlates with intracellular bacterial load. *J Infect Dis* 188: 1119–1131.

Alnemri, E. S.; Livingston, D. J.; Nicholson, D. W.; Salvesen, G.; Thornberry, N. A.; Wong, W. W.; Yuan, J. (1996): Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87: 171.

Allsopp, T. E.; McLuckie, J.; Kerr, L. E.; Macleoda, M.; Sharkey, J.; Kelly, J. S. (2000): Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis. *Cell Death Differ* 7: 984–993.

An W. W.; Wang M. W.; Tashiro S.; Onodera S.; Ikejima T. (2004): Norcantharidin induces human melanoma A375-S2 cell apoptosis through mitochondrial and caspase pathways. *J Korean Med Sci.* 19(4):560-6.

Antonsson, B.; Conti, F.; Ciavatta, A.; Montessuit, S.; Lewis, S.; Martinou, I.; Bernasconi, L.; Bernard, A.; Mermod, J.-J.; Mazzei, G.; Maundrell, L.; Gambale, F.; Sadoul, R.; Martinou, J.-C. (1997): Inhibition of Bax Channel-forming Activity by Bcl-2. *Science* 277: 370–372.

Aronin, S. I.; Peduzzi, P.; Quagliarello, V. J. (1998): Community-acquired bacterial meningitis: risk stratification for adverse clinical outcome and effect of antibiotic timing, *Ann Intern Med* 129 [11]: 862–869.

Ashkenazi, A.; Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305–1308.

Augustin H.G.; Kozian D.H.; Johnson R.C. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16(12): 901-6.

Avery, O.; Dubois, R. (1931): The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcal infection in mice. *J.Exp.Med.* 54:73-89.

Berpohl, D.; Halle, A.; Freyer, D.; Dagand, E.; Braun, J. S.; Bechmann, I.; Schröder, N. W.; Weber, J. R. (2005): Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. *J Clin Invest.* 115(6):1607-15.

Black, S.; Rappuoli, R. (2010): A crisis of public confidence in vaccines. *Sci Transl Med.* 2(61):61mr1. PubMed PMID: 21148125.

Blagosklonny, M. V.; Giannakakou, P.; el Deiry, W. S.; Kingston, D. G.; Higgs, P. I.; Neckers, L.; Fojo, T. (1997): Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death. *Cancer Res* 57: 130.

Blanco-Colio, L. M.; Villa A.; Ortego, M.; Hernández-Presa, M. A.; Pascual, A.; Plaza J. J.; Egido, J. (2002): 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 161(1):17-26.

Bortner, C. D. O. N.; Cidlowski, J. A. (1995): The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5 (1): 21–26.

Bratton, S.; MacFarlane, M.; Cain, K.; Cohen, G. (2000): Protein Complexes Activate Distinct Caspase Cascades in Death Receptor and Stress-Induced Apoptosis. *Experimental Cell Research* 256: 27–33.

Braun, J. S.; Hoffmann, O.; Schickhaus, M.; Freyer, D.; Dagand, E.; Bermpohl, D.; Mitchell, T. J.; Bechmann, I.; Weber J. R. (2007): Pneumolysin causes neuronal cell death through mitochondrial damage. *Infect Immun.* 2007 Sep;75(9):4245-54.

Braun ,J. S.; Novak, R.; Murray, P. J.; Eischen, C. M.; Susin, S. A.; Kroemer, G.; Halle, A.; Weber, J. R.; Tuomanen El.; Cleveland, J. L. (2001): Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis.* 184(10):1300-9.

Braun, J. S. S. J. E.; Freyer, D.; Mitchell, T. J.; Cleveland, J. L.; Tuomanen, E. I.; Weber, J. R. (2002): Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest* 109 [1]: 19–27.

Breiman, R. F. (1998): Prevention of pneumococcal disease – a new romance begins. *Clin. Infect Dis* 26 [5]: 1124–1126.

Brenner, C.; Kroemer, G. (2000): Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators. *Science* 289(5482):1150-1.

Briese, T. and Hakenbeck, R. (1985): Interaction of the pneumococcal amidase with lipoteichoic acid and choline. *J.Biochem.* 146:417-427.

Bump, N. J.; Hackett, M.; Hugunin M, Seshagiri, S.; Brady, K.; Chen, P.; Ferez, C.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Li, P. et al. (1995): Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269(5232):1885-8.

Cande C.; Cohen, I.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Larochette, N.; Zamzami, N.; Kroemer, G. (2002): Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84: 215.

Cannon, C.L.; Kowalski, M. P.; Stopak K. S.; Pier, G. B. (2003): *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 Aug;29(2):188-97.

Cano, E.; Mahadevan, L. C. (1995): Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20: 117–122.

Cardone, M. H.; Salvesen, G.S.; Widmann, C.; Johnson, G.; Frisch, S. M. (1997): The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell.* 90(2):315-23.

Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3666–3670.

Chandra, J. S. A.; Orrenius, S. (2000): Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29 [3–4]: 323–333.

Chang, L.; Karin, M. (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410(6824):37-40.

Chappell, D.; Jacob, M.; et al.: Expedition Glykokalyx. Anästhesist 2008, Vol. 57: 959-969; Springer Medizin Verlag.

Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. (1998): BCL-2 family: regulators of cell death, Annu Rev Immunol 16: 395–419.

Chinnaiyan, A. M.; O'Rourke, K.; Tewari, M.; Dixit, V. M. (1995): FADD, a novel death domaincontaining protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell 81: 505–512.

Choi, R. C.; Siow, N. L.; Zhu, S. Q.; Tsim, K. W. (2000): The cAMP-dependent protein kinase mediates the expression of AChE in chick myotubes. Neuroreport 11(4):801-6.

Chudwin, D. S., Artrip, S. G., Korenblit, A., Schiffman, G., Rao, S. (1985): Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of Streptococcus pneumoniae. Infect.Immun. 50:213-217.

Cobb, M. H.; Xu, S.; Hepler, J. E.; Hutchison, M.; Frost, J.; Robbins, D. J. (1994): Regulation of the MAP kinase cascade. Cell Mol Biol Res. 40(3):253-6.

Cobb, M. H.; Hepler, J. E.; Cheng, M.; Robbins, D. (1994): The mitogen-activated protein kinases, ERK1 and ERK2. Semin Cancer Biol. 5(4):261-8.

Cobb, M. H.; Boulton, T. G.; Robbins, D. J. (1991): Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. Cell Regul. 2(12):965-78.

Cochrane, C. G. (1991): Cellular injury by oxidants. Am J Med 91 [3C]: 23S–30S.

Cockeran, R. A. R.; Feldman, C. (2002): The role of pneumolysin in the pathogenesis of Streptococcus pneumoniae infection. Curr Opin Infect Dis 15 [3]: 235–239.

Cohen, G. M. (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J 326: 1–16.

Daniel P. T.; Wieder, T.; Sturm, I.; Schulze-Osthoff, K. (2001): The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15: 1022.

Daugas, E. N. D.; Ravagnan, L.; Loeffler, M.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Kroemer, G. (2000): Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett* 476 [3]: 118–123.

Davachi, F.; Bregu, H.; Lito, G. (2002): Recurrent *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *J Trop Pediatr* 48: 249-251 (2002).

Delettre, C.; Yuste, V.; Moubarak, J. R. S.; Bras, M.; Robert, N.; Susin, S. A. (2006): AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J Biol Chem* 281 (10): 6413–6427.

Dent, P.; Yacoub, A.; Fisher, P. B.; Hagan, M. P.; Grant, S. (2003): MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 22(37):5885-96.

Dérijard, B.; Raingeaud, J.; Barrett, T.; Wu, I. H.; Han, J.; Ulevitch, R. J.; Davis, R. J. (1995): Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267(5198):682-5.

Desagher, S.; Martinou, J. C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10(9):369-77.

DFP-Allgemeinmedizin: Blutgerinnung. Paul Knöbl; *Ärztemagazin* Ausgabe 41/2006.

Donovan, M.; Cotter, T. G. (2004): Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1644(2-3):133-47.

Duane, P. G.; Rubins, J. B.; Weisel, H. R.; Janoff, E. N. (1993): Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 61 [10]: 4392–4397.

Durand, R.; Davis, R. J.; Marymont, R.; Reyes, D.; Nelson, K. A. (1993): Attitudes and organ donor referral behavior of hospital staff. *Transplant Proc.* 25(6):2991-4.

Durand, M. L.; Calderwood, S. B.; Weber, D. J.; Miller, S. I.; Southwick, F. S.; Caviness, V. S. Jr.; Swartz, M. N. (1993): Acute bacterial meningitis in adults. A review of 493 episodes. *N. Engl J Med* 328 [1]: 21–28.

Ekert, P.; Silke, J.; Vaux, D. L. (1999): Caspase Inhibitors. *Cell Death and Differentiation*, 6: 1081–1086.

Ellis, R. E.; Yuan, J. Y.; Horvitz, H. R. (1991): Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 7: 663–698.

Enari, M.; Sakahira, H.; Yokoyama, H.; Okawa, K.; Iwamatsu, A.; Nagata, S. (1998). A caspase activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.

Engelhard, D.; Pomeranz, S.; Gallily, R.; Strauss, N.; Tuomanen, E. (1997): Serotype-related differences in inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in experimental meningitis. *J Infect Dis* 175: 979–982.

Engidawork, E.; Gulesserian, T.; Seidl, R.; Cairns, N.; Lubec, G. (2001): Expression of apoptosis related proteins in brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 303(2):79-82.

Esen, M.; Schreiner, B.; Jendrossek, V.; Lang, F.; Fassbender, K.; Grassme, H.; Gulbins, E. (2001): Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* 6: 431–439.

Eskes, R.; Desagher, S.; Antonsson, B.; Martinou, J. C. (2000): Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20: 929–935.

Evan, G. I.; Vousden, K. H. (2001): Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411(6835):342-8.

Fadok, V. A.; Henson, P. M. (1998): Apoptosis: getting rid of the bodies. *Curr Biol* 8 (19): R693–695.

Fiore, A. E.; Moroney, J. F.; Farley, M. M.; Harrison, L. H.; Patterson, J. E.; Jorgensen, J. H.; Cetron, M.; Kolczak, M. S.; Breiman, R. F.; Schuchat, A. (2000): Clinical outcomes of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* in the era of antibiotic resistance. *Clin Infect Dis* 30 [1]: 71–77.

Fisher, M.; Liu, B.; Glennon, P. E.; Southgate, K. M.; Sale, E. M.; Sale, G.J.; Lewis, M. J.; Groves, P. H. (2001): Downregulation of the ERK 1 and 2 mitogen activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits proliferation of porcine vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 156(2):289-95.

Fisher D. E. (2001): Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North America* 15(5):931-56, ix.

Fraser, A.; Evan, G. (1996): A license to kill. *Cell* 85: 781.

Fränkel, A. (1886A): Die Mikrokokken der Pneumoniae. *Zeitschrift für klinische Medizin*, Berlin, 10:426-449. *Zeitschrift für klinische Medizin*, Berlin, 11:437-458.

Fränkel, A. (1886B): Bakteriologische Mitteilungen. *Zeitschrift für klinische Medizin*, 10:401-461.

Freyer, D.; Manz, R.; Ziegenhorn, A.; Weih, M.; Angstwurm, K.; Docke, W. D.; Meisel, A.; Schumann, R. R.; Schonfelder, G.; Dirnagl, U.; Weber, J. R. (1999): Cerebral

endothelial cells release TNF-alpha after stimulation with cell walls of *Streptococcus pneumoniae* and regulate inducible nitric oxide synthase and ICAM-1 expression via autocrine loops. *J Immunol* 163 [8]: 4308–4314.

García-Sáez, A. J.; Fuertes, G.; Suckale, J.; Salgado, J. (2010): Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl-2 proteins. *Adv Exp Med Biol.* 677:91-105.

Garcia, S.; Dadaglio, G.; Gougeon, M. L. (1997): Limits of the human-PBL-SCID mice model: severe restriction of the V beta T-cell repertoire of engrafted human T cells. *Blood* 89(1):329-36.

Garcia, J. L.; Diaz, E.; Romero, A.; Garcia, P. (1994): Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J.Bacteriol.* 176:4066-4072.

Geelen, S. B. C.; Tuomanen, E. (1993): The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 61: 1538–1543.

Gold, R. (1999): Epidemiology of bacterial meningitis. *Infect Dis Clin North Am* 13 (3): 516–525.

Goligorsky M.S.; Patschan D., Kuo M.C. (2009) Weibel-Palade bodies-sentinels of acute stress. *Nat Rev Nephrol* 5(7): 423-6.

Golstein, P.; Ojcius, D. M.; Young, J. D. (1991): Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121: 29–65.

Gotschlich, E. C.; Liu, T. Y. (1967): Structural and immunological studies on the pneumococcal C polysaccharid. *J.Biol.Chem.* 242:463-470.

Granville, D. J.; Cassidy, B. A.; Ruehlmann, D. O.; Choy, J. C.; Brenner, C.; Kroemer, G.; van Breemen, C.; Margaron, P. Hunt, D. W.; McManus, B. M. (2001): Mitochondrial

release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol.* 159(1):305-11.

Green, D. R. (1998): Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695–698.

Green, D. R.; Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309–1312.

Gross, A.; McDonnell, J. M.; Korsmeyer, S. J. (1999): BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13: 1899.

Gross, A. (2001): BCL-2 proteins: regulators of the mitochondrial apoptotic program. *IUBMB. Life* 52: 231.

Gupta, S.; Campbell, D.; Dérijard, B.; Davis, R. J. (1995): Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science* 267(5196):389-93.

Gutiérrez, F. M.; Masiá, J. C.; Rodríguez, C.; Mirete, B.; Soldán, S.; Padilla, I.; Hernández, F.; De Ory, G.; Royo, A. M. Hidalgo (2005): Epidemiology of community-acquired pneumonia in adult patients at the dawn of the 21st century: a prospective study on the Mediterranean coast of Spain *Clinical Microbiology and Infection*. Issue 10 (Vol. 11, October): 788.

Hail, N. Jr.; Carter, B. Z.; Konopleva, M. and Andreeff, M. (2006): Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11: 889-904.

Hahn, H.; Falke, D.; Ullmann, U.; Kaufmann, S.H.E. (2004): *Medizinische Mikrobiologie* (5. Aufl.) Springer Verlag, Berlin.

Hammerschmidt, S.; Wolff, S.; Hocke, A. et al. (2005): Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun.* 73: 4653-4667.

Hansen, T. M.; Nagley, P. (2003): AIF: a multifunctional cog in the life and death machine. *Sci STKE* 193: E31.

Hegde, R.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Fernandes-Alnemri, T.; Alnemri, E. S. (1998): Blk, a BH3- containing Maus protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* 273: 7783–7786.

Hengartner, M. O.; Horvitz, H. R. (1994): *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* 76: 665–676.

Hippenstiel, S.; Suttorp, N.; (2003): Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost.* 89(1):18-24.

Hippenstiel, S.; Schmeck, B.; N'Guessan, P. D.; Seybold, J.; Krüll, M.; Preissner, K.; Eichel-Streiber, C. V.; Suttorp, N. (2002): Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283(4):L830-8.

Hippenstiel, S.; Witzenrath, M.; Schmeck, B.; Hocke, A.; Krisp, M.; Krüll, M.; Seybold, J.; Seeger, W.; Rascher, W.; Schütte, H.; Suttorp, N. (2002): Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res.* 91(7):618-25.

Hippenstiel, S.; Soeth, S.; Kellas, B. Fuhrmann, O.; Seybold, J.; Krull, M.; Eichel-Streiber, C.; Goebeler, M.; Ludwig, S.; Suttorp, N. (2000): Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Infect Immun* 72: 5150–5158.

Hirata, H.; Takahashi, A.; Kobayashi, S.; Yonehara, S.; Sawai, H.; Okazaki, T.; Yamamoto, K.; Sasada, M. (1998): Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187: 587–600.

Hirst, R. A. S. K. S.; Rutman, A.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; O'Callaghan, C. (2000): Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect Immun* 68 [3]: 1557–1562.

Höffken, G.; Lorenz, J.; Kern, W.; Welte, T.; Bauer, T.; Dalhoff, K.; Dietrich, E.; Ewig, S.; Gastmeier, P.; Grabein, B.; Halle, E.; Kolditz, M.; Marre, R.; Sitter, H.; Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie; Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin; Deutschen Gesellschaft für Infektiologie und vom Kompetenznetzwerk CAPNETZ. (2009): Epidemiology, diagnosis, antimicrobial therapy and management of community-acquired pneumonia and lower respiratory tract infections in adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network CAPNETZ Germany]. *Pneumologie* 63(10):e1-68.

Huang, S.; Jiang, Y.; Li, Z.; Nishida, E.; Mathias, P.; Lin, S.; Ulevitch, R. J.; Nemerow, G. R.; Han, J. (1997): Apoptosis signaling pathway in T cells is composed of ICE/Ced-3 family proteases and MAP kinase kinase 6b. *Immunity* 6(6):739-49.

Itoh, T.; Deng, X.; Carr, B.; May, W. S. (1997): Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem* 272: 11671–11673.

Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G.; Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest.* 52(11):2745-56.

Johnson, G. L.; Lapadat, R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298(5600):1911-2.

Joza, N. S. S. A.; Dugas, E.; Stanford, W. L.; Cho, S. K.; Li, C. Y.; Sasaki, T.; Elia, A. J.; Cheng, H. Y.; Ravagnan, L.; Ferri, K. F.; Zamzami, N.; Wakeham, A.; Hakem, R.; Yoshida, H.; Kong, Y. Y.; Mak, T. W.; Zuniga-Pflucker, J. C.; Kroemer, G.; Penninger, J. M. (2001): Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410 [6828]: 549–554.

Juo, P.; Kuo, C. J.; Reynolds, S. E.; Konz, R. F.; Raingeaud, J.; Davis, R. J.; Biemann, H. P.; Blenis, J. (1997): Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases. *Mol Cell Biol.* 17(1):24-35.

Kadioglu, A.; Taylor, S.; Iannelli, F.; Pozzi, G.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W. (2002): Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun* 70: 2886–2890.

Kaiser, R. A.; Bueno, O. F.; Lips, D. J.; Doevendans, P. A.; Jones, F.; Kimball, T. F.; Molkentin, J. D. (2004): Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. *J Biol Chem* 279: 15524–15530.

Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J.; und Lindemann, J. (1997): *Medizinische Mikrobiologie - Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie und Parasitologie*. 9. Auflage, Thieme Verlag, Deutschland.

Kerr, J. F.; Winterford, C. M.; Harmon, B. V. (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-26.

Kerr, J. F. W. A. H.; Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 [4]: 239–257.

Khokhlatchev, A. V.; Canagarajah, B.; Wilsbacher, J.; Robinson, M.; Atkinson, M.; Goldsmith, E.; Cobb, M. H. (1998): Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605–615.

Khwaja, A.; Downward, J. (1997): Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J Cell Biol.* 139(4):1017-23.

Kluck, R. M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. (1997): The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275: 1132–1136.

Krajewski, S.; Tanaka, S.; Takayama, S.; Schibler, M. J.; Fenton, W.; Reed, J. C. (1993): Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* 53: 4701–4714.

Krammer, P. H. (2000): CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789.

Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. (1998): The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619–642.

Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S. A. (1997): Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 18: 44–51.

Kwon, G. P. K.; Marshall, C. A.; Schaffer, J. E.; McDaniel, M. L. (2004): cAMP Dose-dependently prevents palmitate-induced apoptosis by both protein kinase A- and cAMP-guanine nucleotide exchange factor-dependent pathways in beta-cells. *J Biol Chem* 279 (10): 8938–8945.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Labeledzka, K.; Grzanka, A.; Izdebska, M. (2006): Mitochondria and cell death. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 60:439-46.

Lassus, P.; Opitz-Araya, X.; Lazebnik, Y. (2002): Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297: 1352–1354.

Leist, M.; Jäättelä, M. (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 [8]: 589–598.

Lenczowski, J. M.; Dominguez, L.; Eder, A. M.; King, L. B.; Zacharchuk, C. M.; Ashwell, J. D. (1997): Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 17(1):170-81.

Leon, M. A.; Young, N. M. (1971): Specificity for phosphorylcholine of six murine myeloma proteins reactive with *Pneumococcus C* polysaccharide and β -lipoprotein. *Biochemistry* 10:1424-1429.

Lewis, T. S.; Shapiro, P. S.; Ahn, N. G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 74:49-139.

Li, J.; Li, P. F.; Dietz, R.; von Harsdorf, R. (2002): Intracellular superoxide induces apoptosis in VSMCs: role of mitochondrial membrane potential, cytochrome C and caspases. *Apoptosis.* 2002 Dec;7(6):511-7.

Li, M.; Wang, X.; Meintzer, M. K.; Laessig, T.; Birnbaum, M. J.; Heidenreich, K. A. (2000): Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β . *Mol Cell Biol.* 20(24):9356-63.

Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479–489.

Li, H.; Zhu, H.; Xu, C. J.; Yuan, J. (1998): Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491–501.

Linseman, D. A.; Laessig, T.; Meintzer, M. K.; McClure, M.; Barth, H.; Aktories, K.; Heidenreich, K. A. (2001): An essential role for Rac/Cdc42 GTPases in cerebellar granule neuron survival. *J Biol Chem.* 276(42):39123-31.

Liberto, M.; Matera, G.; Lamberti, A.; Barreca, G.; Focà, D.; Quirino, A.; Soria, M.; Focà, A. (2004): Bartonella quintana-induced apoptosis inhibition of human endothelial cells is

associated with p38 and SAPK/JNK modulation and with stimulation of mitosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50: 159–166.

Liu, B.; Carle, K. W.; Whisler, R. L. (1997): Reductions in the activation of ERK and JNK are associated with decreased IL-2 production in T cells from elderly humans stimulated by the TCR/CD3 complex and costimulatory signals. *Cell Immunol.* 182(2):79-88.

Locksley, R. M.; Killeen, N.; Lenardo, M. J. (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104: 487–501.

Loeffler, M. D. E.; Susin, S. A.; Zamzami, N.; Metivier, D.; Nieminen, A. L.; Brothers, G.; Penninger, J. M.; Kroemer, G. (2001): Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 15 [3]: 758–767.

Loeffler, M; Kroemer, G. (2000): The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256: 19–26.

Lorenzo, H. K.; Susin, S. A.; Penninger, J.; Kroemer, G. (1999): Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6: 516–524.

Lund, E.; Henrichsen, J. (1987): Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Bergan, T., Norris, J.R. (eds.). *Methods in Microbiology*. Vol.12, New York, Academic Press, 241-261.

Martinou, J. C.; Green, D. R. (2001): Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 63–67.

Martens, P. Worm, S. W.; Lundgren, B.; Konradsen, H. B.; Benfield, T. (2004): Serotype-specific mortality from invasive *Streptococcus pneumoniae* disease revisited. *BMC Infect Dis* 4: 21.

Martinet, W.; Kockx, M. M. (2001): Apoptosis in atherosclerosis: focus on oxidized lipids

and inflammation. *Curr Opin Lipidol.* 2001 Oct;12(5):535-41.

Miksits, K.; Großgebauer, K.; Hahn, H. (1992): Bakterien, Allgemeine Bakteriologie. In: Miksits, Klaus (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Allgemeine u. Spezielle Bakteriologie. Springer Verlag, Berlin 1992, S. 99–102.

Miller, D. K. (1997): The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 9: 35.

Minn, A. J.; Kettlun, C. S.; Liang, H.; Kelekar, A.; Vander Heiden, M. G.; Chang, B. S.; Fesik, S. W.; Fill, M.; Thompson, C. B. (1999): Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO Journal* 18(3):632-43.

Minn, A. V. P.; Schendel, S. L.; Liang, H.; Muchmore, S. W.; Fesik, S. W.; Fill, M.; Thompson, C. B. (1997): Bclx(L) Forms an Ion Channel in Synthetic Lipid Membranes. *Nature* 385: 353–357.

Mitchell, T. J. (2000): Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* 151 [6]: 413–419.

Miura, M.; Zhu, H.; Rotello, R.; Hartweg, E. A.; Yuan, J. (1993): Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell.* 75(4):653-60.

Miyata, Y.; Adachi, S.; Mizuno, H.; Nishida, E. (1999): A strategy to make constitutively active MAP kinase by fusing with constitutively active MAP kinase kinase. *Biochim Biophys Acta.* 1451(2-3):334-42.

Modjtahedi, N.; Giordanetto, F.; Madeo, F. and Kroemer, G. (2006): Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* 16: 264-72.

Mogga, S. J.; Mustafa, T.; Sviland, L.; Nilsen, R. (2002): Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scand J Immunol* 56: 383–391.

Monier, R. M.; Orman, K. L.; Meals, E. A.; English, B. K. (2002): Differential effects of p38- and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase inhibitors on inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor production in murine macrophages stimulated with *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 185: 921–926.

Moriguchi, T.; Kuroyanagi, N.; Yamaguchi, K.; Gotoh, Y.; Irie, K.; Kano, T.; Shirakabe, K.; Muro, Y.; Shibuya, H.; Matsumoto, K.; Nishida, E.; Hagiwara, M. (1996): A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J Biol Chem*. 271(23):13675-9.

Moy, A. B.; Shasby, S. S.; Scott, B. D.; Shasby, D. M. (1993): The effect of histamine and cyclic adenosine monophosphate on myosin light chain phosphorylation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clin Invest*. 92(3):1198-206.

Mufson, M. A.; Stanek, R. J. (1999): Bacteremic pneumococcal pneumonia in one American City: a 20-year longitudinal study, 1978-1997. *Am J Med*. 1999 Jul 26; 107(1A):34S-43S.

Mühlenbeck, F.; Haas, E.; Schwenzler, R.; Schubert, G.; Grell, M.; Smith, C.; Scheurich, P.; Wajant, H. (1998): TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem*. 273(49):33091-8.

Muzio, M.; Stockwell, B. R.; Stennicke, H. R.; Salvesen, G. S.; Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-30.

Neuzil, J.; Schröder, A.; von Hundelshausen, P.; Zerneck, A.; Weber, T.; Gellert, N.; Weber, C. (2001): Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage. *Biochemistry* 40: 4686–4692.

Nguyen, M.; Millar, D. G.; Yong, V. W.; Korsmeyer, S. J.; Shore, G. C. (1993): Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J Biol Chem.* 268(34):25265-8.

Nicholson, D. W.; Thornberry, N. A. (1997): Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 299–306.

Nishihara, H. H. M.; Hwang, M.; Kizaka-Kondoh, S.; Eckmann, L.; Insel, P. A. (2004): Cyclic AMP promotes CREB-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *J Biol Chem* 279, 25, 26176-26183.

Nofer, J. R.; Junker, R.; Pulawski, E.; Fobker, M.; Levkau, B.; von Eckardstein, A.; Seedorf, U.; Assmann, G.; Walter, M. (2001): High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb Haemost.* 85(4):730-5.

Novak, R.; Charpentier, E.; Braun, J. S.; Tuomanen, E. (2000): Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell* 5: 49–57.

Oda, D.; Nguyen, M. P.; Royack, G. A.; Tong, D. C. (2001): H₂O₂ oxidative damage in cultured oral epithelial cells: the effect of short-term vitamin C exposure. *Anticancer Res.* 21(4A):2719-24.

Patterson, C. E.; Garcia, J. G. (1994): Regulation of thrombin-induced endothelial cell activation by bacterial toxins. *Blood Coagul Fibrinolysis* 5(1):63-72.

Paton, J. C. T. (1996): The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol* 4 [3]: 103–106.

Pericone, C. D.; Overweg, K.; Hermans, P. W. M.; and Weiser, J. N. (2000). Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* 68, 3990-3997.

Pfister, H. W.; Koedel, U, Lorenzl, S.; Tomasz, A.(1992): Antioxidants attenuate microvascular changes in the early phase of experimental pneumococcal meningitis in rats. *Stroke.* 23(12):1798-804.

Porter, A. G.; Ng, P.; Jänicke, R. U. (1997): Death substrates come alive. *Bioessays* 19(6):501-7.

Potthoff, A.; Ledig, S.; Martin, J.; Jandl, O.; Cornberg, M.; Obst, B.; Beil, W.; Manns, M. P.; Wagner, S. (2002): Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis. *Helicobacter* 7: 367–377.

Qa'Dan, M.; Ramsey, M.; Daniel, J.; Spyres, L. M.; Safiejko-Mroczka, B., Ortiz-Leduc, W.; Ballard, J. D. (2002): *Clostridium difficile* toxin B activates dual caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in intoxicated cells. *Cell Microbiol.* 4(7):425-34.

Qiao. J.; Huang, F.; Lum, H. (2003): PKA inhibits RhoA activation: a protection mechanism against endothelial barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(6):L972-80.

Ram, S.; Sharma, A. K.; Simpson, S. D.; Gulati, S.; McQuillen, D. P.; Pangburn, M. K.; Rice, P. A. (1998): A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialyated *Neisseria gonorrhoeae*. *J.Exp.Med.* 187:743-752.

Ravagnan, L. R. T.; Kroemer, G. (2002): Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 192 [2]: 131–137.

Reed, J. C. (2002): Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov.* 1(2):111-21.

Reinert, R. R., Reinert, S., Van der Linden, M., Cil, M. Y., Allahamm, A., Appelbaum, P. (2005): Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2903-2913.

Robinson, M. J.; Cheng, M.; Khokhlatchev, A.; Ebert, D.; Ahn, N.; Guan, K. L.; Stein, B.; Goldsmith, E.; Cobb, M. H. (1996): Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem.* 271(47):29734-9.

Robertson, J. D.; Enoksson, M.; Suomela, M.; Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. (2002): Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277: 29803–29809.

Rubins, J. B.; Janoff, E. N. (1998): Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med.* 131(1):21-7.

Saavedra, A. P.; Tsygankova, O. M.; Prendergast, G. V.; Dworet, J. H.; Cheng, G.; Meinkoth, J. L. (2002): Role of cAMP, PKA and Rap1A in thyroid follicular cell survival. *Oncogene* 21(5):778-88.

Sandal, T. S. C.; Kleivdal, H.; Hedin, L.; Doskeland, S. O. (2002): A novel, extraneuronal role for cyclin-dependent protein kinase 5 (CDK5): modulation of cAMP-induced apoptosis in rat leukemia cells. *J Biol Chem* 277 (23): 20783–20793.

Saxena, M.; Mustelin, T. (2000): Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* 12: 387–396.

Saxena, M.; Williams, S.; Tasken, K.; Mustelin, T. (1999): Crosstalk between cAMPdependent kinase and MAP kinase through a protein tyrosine phosphatase. *Nat Cell Biol* 1: 305–311.

- Schlegel, H.G. (1992): Allgemeine Mikrobiologie. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag.
- Schmeck, B.; Gross, R.; N'Guessan P. D.; Hocke, A. C.; Hammerschmidt, S.; Mitchell, T. J.; Rosseau, S.; Suttorp, N.; Hippenstiel S. (2004): Streptococcus pneumoniae-induced caspase 6-dependent apoptosis in lung epithelium. Infect Immun 72: 4940–4947.
- Schuchat, A.; Robinson, K.; Wenger, J. D.; Harrison, L. H.; Farley, M.; Reingold, A. L.; Lefkowitz, L.; Perkins, B. A. (1997): Bacterial meningitis in the United States in 1995. Active Surveillance Team. N Engl J Med 337 [14]: 970–976.
- Shulman, S. T. (2002): The history of the pneumococcus. Pediatr Ann 31: 225-226.
- Seeger, R.; Krebs, E. (1995): The MAPK signaling cascade. FASEB Journal 9(9):726-35.
- Sgonc, R.; Gruber, J. (1998): Apoptosis detection: an overview. Exp Gerontol 33 [6]: 525–533.
- Shimizu, S. Y. M.; Shinohara, Y.; Yoneda, Y.; Tsujimoto, Y. (2001): Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. J Cell Biol 152: 237.
- Sigaud, S.; Evelson, P.; González-Flecha, B. (2005): H₂O₂-induced proliferation of primary alveolar epithelial cells is mediated by MAP kinases. Antioxid Redox Signal. 7(1-2):6-13.
- Slee, E. A.; Harte, M. T.; Kluck, R. M.; Wolf, B. B.; Casiano, C. A.; Newmeyer, D. D.; Wang, H. G.; Reed, J. C.; Nicholson, D. W.; Alnemri, E. S.; Green, D. R.; Martin, S. J. (1999): Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a Caspase 9-dependent manner. J Cell Biol 144: 281–292.
- Smith, C. A.; Farrah, T.; Goodwin, R. G. (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 76: 959–962.

Soderling, S. H.; Beavo, J. A. (2000): Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Current opinion cell Biol* 12: 174–179.

Steelman, L. S.; Pohnert, S. C.; Shelton, J. G.; Franklin, R. A.; Bertrand, F. E. and McCubrey, J. A. (2004) Jak/Stat, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18: 189-218.

Stork, P. J.; Schmitt, J. M. (2002): Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 12(6):258-66.

Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V. M. (2000): Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69: 217–245.

Sumpio B.E.; Riley J.T.; Dardik A. (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34(12): 1508-12.

Susin, S. A.; Larochette, N.; Geuskens, M.; Kroemer, G. (2000): Purification of mitochondria for apoptosis assays. *Methods Enzymol.* 322:205-8.

Susin, S. A.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Samejima, K.; Zamzami, N.; Loeffler, M.; Costantini, P.; Ferri, K. F.; Irinopoulou, T.; Prévost, M. C.; Brothers, G.; Mak, T. W.; Penninger, J.; Earnshaw, W. C.; Kroemer, G. (2000): Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 192(4):571-80.

Susin, S. A. L. H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; Larochette, N.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Siderovski, D. P.; Penninger, J. M.; Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397 [6718]: 441–446.

Suttorp, N.; Ehreiser, P.; Hippenstiel, S.; Fuhrmann, M.; Krüll, M.; Tenor, H.; Schudt, C. (1996): Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung.* 174(3):181-94.

Suttorp, N.; Weber, U.; Welsch, T.; Schudt, C. (1993): Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J clin Invest* 91: 1421–1428.

Tanaka, S.; Saito, K. und Reed, J. C. (1993): Structure-function analysis of the Bcl-2 oncoprotein. Addition of a heterologous transmembrane domain to portions of the Bcl-2 beta protein restores function as a regulator of cell survival. *J Biol Chem* 268: 10920-10926.

Tartaglia, L. A.; Ayres, T. M.; Wong, G. H.; Goeddel, D. V. (1993): A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 74(5):845-53.

Täuber, M. G., Burroughs, M.; Niemöller, U. M.; Kuster, H.; Borschberg, U.; Tuomanen, E. (1991): Differences of pathophysiology in experimental meningitis caused by three strains of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 163: 806–811.

Tomasz, A.; Saukkonen, K. (1989): The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci. *Pediatr Infect Dis J* 8 [12]: 902–903.

Tournier, C.; Whitmarsh, A. J.; Cavanagh, J.; Barrett, T.; Davis, R. J; (1997): Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(14):7337-42.

Treisman, R. (1996): Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol*. 8(2):205-15.

Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. (2000): Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett*. 466(1):6-10.

Tsujimoto, Y.; Cossman, J.; Jaffe, E.; Croce, C. M. (1985): Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228: 1440–1443.

Ückert, S.; Küthe, A.; Stief, C. G.; Jonas, U. (2001): Phosphodiesterase isoenzymes as pharmacological targets in the treatment of male erectile dysfunction. *World J Urol* 19: 14–22.

Voll, R. E.; Herrmann, M.; Roth, E. A.; Stach, C.; Kalden, J. R.; Girkontaite, I. (1997): Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 390: 350–351.

Vossler, M. R.; Yao, H.; York, R. D.; Pan, M. G.; Rim, C. S.; Stork, P. J. (1997): cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell* 89: 73–82.

Wada, T.; Penninger, J. M. (2004): Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838–2849.

Walker, J. A.; Allen, R. L.; Falmagne, P. Johnson, M. K.; Boulnois, G. J. (1987): Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 55:1184–9.

Wang, J. and Lenardo, M. J. (2000): Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies. *J Cell Science* 113: 753-757.

Watson, D. A.; Musher, D. M. (1990): Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect.Immun.* 58:3135-3138.

Webster, C. R.; Usechak, P.; Anwer, M. S. (2002): cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(3): G727–G738.

Weichselbaum, A. (1886): Über die Ätiologie der acuten Lungen- und Rippenfellentzündungen. *Wiener Medizinische Jahrbücher, (Alte Folge)*; 82: 483-554.

Wessels, M. R.; Rubens, C. E.; Benedi, V. J.; Kasper, D. L. (1989): Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:8983-8987.

Wieder, T.; Orfanos, C.E.; Geilen, C. C, (1998): Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. *J Biol Chem.* 273(18):11025-31.

Wyllie, A. H.; Morris, R. G.; Smith, A. L. and Dunlop, D. (1984): Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142, 67-77.

www.capnetz.de

Xia, Z.; Dickens, M.; Raingeaud, J.; Davis, R. J.; Greenberg, M. E. (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270(5240):1326-31.

Yan, M.; Dai, T., Deak, J. C, Kyriakis, J. M.; Zon, L.I.; Woodgett, J. R.; Templeton, D. J. (1994): Activation of stress-activated protein kinase by MEKK1 phosphorylation of its activator SEK1. *Nature* 372(6508):798-800.

Yasugi, E.; Kumagai, T.; Nishikawa, Y.; Okuma, E.; Saeki, K.; Oshima, M.; Susin, S. A. Kroemer, G.; You, A. (2000): Involvement of apoptosis-inducing factor during dolichyl monophosphate-induced apoptosis in U937 cells. *FEBS Lett.* 480(2-3):197-200.

Yoo, I. H.; Shin, H.S.; Kim, Y. J.; Kim, H. B.; Jin, S.; Ha, U.H. (2010): Role of pneumococcal pneumolysin in the induction of an inflammatory response in human epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 60(1):28-35.

Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001): Mitochondria in apoptosis. How Pandora's box opens. *Nature Rev Mol Cell Biol.* 2: 67-71.

Zamzami, N.; El Hamel, C.; Maise, C.; Brenner, C.; Munoz-Pinedo, A. S.; Belzacq, P. (2000): Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 19: 6342–6350.

Zheng, C. F.; Guan, K. L. (1994): Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J Biol Chem.* 269(31):19947-52.

Zysk, G.; Brück, W.; Gerber, J.; Brück, Y.; Prange, H. W.; Nau, R. (1996): Anti-inflammatory treatment influences neuronal apoptotic cell death in the dentate gyrus in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55(6):722-8.

Zysk, G.; Bejo, L.; Schneider-Wald, B. K.; Nau, R.; Heinz, H. (2000): Induction of necrosis and apoptosis of neutrophil granulocytes by *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Exp Immunol* 122: 61–66.

Zysk, G.; Schneider-Wald, B. K.; Hwang, J. H.; Bejo, L.; Kim, K. S.; Mitchell, T. J.; Hakenbeck, R.; Heinz, H. P. (2001): Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 69: 845–852.

6 Anhang

6.1 Publikation

Originalarbeit

N'Guessan, P. D.; Schmeck; B.; **Ayim, A.**; Hocke, A. C.; Brell, B.; Hammerschmidt, S.; Rosseau, S.; Suttorp, N.; Hippenstiel, S. (2005): Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. Thromb Haemost. 2005 Aug;94(2):295-303.

6.2 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp bedanke ich mich für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Philippe Dje N´Guessan danke ich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung.

Außerdem gilt mein Dank den Mitgliedern des Labors der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie für das sehr angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren sei Frau Kerstin Möhr, Frau Sylwia Schapke, Dr. Stefan Hippenstiel, dem Leiter des Forschungslabors sehr gedankt für die große Unterstützung vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Mein ganz großer Dank ist an meine Familie gerichtet, die stets Anteilnahme nicht nur während der Doktorarbeit hatten, sondern auch während meines gesamten Studiums und manchmal für die nötige Aufheiterung sorgten.

6.3 Curriculum Vitae

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

6.4 Erklärung an Eides Statt

„Ich, Abena Ayim, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Molekulare Mechanismen der Streptococcus pneumoniae-induzierten endothelialen Apoptose selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Abena Ayim hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

N'Guessan, P. D.; Schmeck; B.; **Ayim, A.**; Hocke, A. C.; Brell, B.; Hammerschmidt, S.;

Rosseau, S.; Suttorp, N.; Hippenstiel, S. (2005): Streptococcus pneumoniae R6x induced p38 MAPK and JNK-mediated caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. Thromb Haemost. 2005 Aug;94(2):295-303.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin