

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

DISSERTATION

KLF4-abhängige IL-10 Sekretion in humanen  
Lungenepithelzellen durch *Streptococcus pneumoniae*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Steinicke

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. St. Hippenstiel  
2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals  
3. Prof. Dr. rer. nat. S. Hammerschmidt

Datum der Promotion: 18.11.2011

# 1. Inhaltsverzeichnis

<b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
1.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
1.2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
2.1 PNEUMONIE	1
2.1.1 <i>Pneumokokkenpneumonie</i>	2
2.2 PNEUMOKOKKEN	3
2.2.1 <i>Virulenzfaktoren</i>	3
2.3 DAS IMMUNSYSTEM	4
2.3.1 <i>Das angeborene und erworbene Immunsystem</i>	4
2.3.2 <i>Muster erkennende Rezeptoren</i>	5
2.3.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)	6
2.3.3.2 Erkennung der Pneumokokken durch TLR	6
2.3.2.3 weitere DNA-erkennende Rezeptoren	8
2.3.3 <i>Toll-like-Rezeptoren Signalweg</i>	8
2.3.3.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen	9
2.3.3.2 Src Proteintyrosinkinasen	10
2.3.3.3 Aktivierung von NF- $\kappa$ B	11
2.3.4 <i>Krüppel-like Faktor Familie</i>	12
2.3.4.1 Der Transkriptionsfaktor Krüppel-like Faktor 4	13
2.3.5 <i>Zytokine und Chemokine</i>	14
2.3.5.1 Interleukin-10	14
2.3.5.2 Regulation der Interleukin-10 Expression	16
<b>3. HERLEITUNG DER AUFGABENSTELLUNG</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
4.1 MATERIAL	18
4.1.1 <i>verwendete Zelllinien</i>	18
4.1.1.1 Humane Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B)	18
4.1.1.2 Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (HEK293)	18
4.1.1.3 Small Airway Epithelial Cells (SAEC)	18
4.1.2 <i>Mauslungenproben aus einem in vivo Mauspneumoniemodell</i>	18
4.1.3 <i>Kulturmedien, Kryokonservierungsmedien und Adhäsionsflüssigkeiten</i>	19
4.1.4 <i>Pneumokokkenstämme R6x, R6x<math>\Delta</math>ply und PN36</i>	20
4.1.5 <i>Medien für die Bakterienkultur</i>	21
4.1.7 <i>Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien</i>	21
4.1.8 <i>Stimulantien, Inhibitoren und Enzyme</i>	21

4.1.9 <i>small interfering RNA (siRNA) Sequenzen</i>	22
4.1.10 <i>Primer</i>	22
4.1.11 <i>Primäre und sekundäre Antikörper und rekombinante Proteine für den Western Blot</i>	23
4.1.12 <i>Puffer, Lösungen und Gele</i>	23
4.1.13 <i>Geräte</i>	26
4.2 <b>METHODEN</b>	27
4.2.1 <i>Zellbiologische Methoden</i>	27
4.2.1.1 <i>Kultivierung und Passagierung von BEAS-2B-Zellen</i>	27
4.2.1.2 <i>Kultivierung und Passagierung von HEK293-Zellen</i>	28
4.2.1.3 <i>Kultivierung und Passagierung von SAE-Zellen</i>	28
4.2.1.4 <i>Kryokonservierung und Auftauen von Zellen</i>	28
4.2.1.5 <i>Zellstimulation und der Einsatz von Stimulantien, Inhibitoren und Kontrollen</i>	29
4.2.1.6 <i>Aufbereitung der Mauslungenproben aus dem <i>in vivo</i> Mauspneumoniemodell</i>	29
4.2.2 <i>Mikrobiologische Methoden</i>	29
4.2.2.1 <i>Bakterienkultur</i>	29
4.2.2.2 <i>Zellstimulation mit den Pneumokokkenstämmen R6x und R6xΔply</i>	30
4.2.2.3 <i>Aufreinigung von bakterieller DNA aus <i>S.p.</i> R6x und humaner DNA aus BEAS-2B-Zellen</i>	30
4.2.3 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	31
4.2.3.1 <i>Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</i>	31
4.2.3.2 <i>Transfektion von small interfering RNA (siRNA)</i>	32
4.2.3.3 <i>Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)</i>	33
4.2.4 <i>Biochemische Methoden</i>	34
4.2.4.1 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	34
4.2.4.2 <i>Laktatdehydrogenase (LDH) -Assay</i>	35
4.2.4.3 <i>Western Blot</i>	35
4.2.5 <i>Statistik</i>	36
<b>5. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
5.1 <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT TLR9-ABHÄNGIG DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR KLF4 IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN	37
5.1.1 <i>S. pneumoniae induziert zeit- und dosisabhängig die KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen</i>	37
5.1.2 <i>S. pneumoniae induziert die KLF4 Expression in einem in vivo Mauspneumoniemodell</i>	39
5.1.3 <i>Die S. pneumoniae-induzierte KLF4 Expression ist MyD88-abhängig</i>	39
5.1.4 <i>Die KLF4 Induktion in humanen Bronchialepithelzellen ist TLR2- und TLR4-unabhängig</i>	40
5.1.5 <i>Der TLR9 Ligand CpG-DNA und aufgereinigte R6x DNA induzieren die KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen</i>	44
5.1.6 <i>Die S. pneumoniae-induzierte KLF4 Expression ist p38 MAPK, ERK, JNK und NF-κB unabhängig</i>	45
5.1.7 <i>Der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 führt zu einer dosisabhängigen Inhibition der S. pneumoniae-induzierten KLF4 Expression</i>	47
5.2 <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT TLR9-ABHÄNGIG DIE INTERLEUKIN-10 SEKRETION IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN	48

5.2.1 <i>S. pneumoniae</i> induziert die IL-10 Expression in humanen Epithelzellen	48
5.2.2 <i>S. pneumoniae</i> induziert die IL-10 Sekretion in einem in vivo Mauspneumoniemodell	50
5.2.3 Der TLR9 Ligand CpG-DNA induziert die IL-10 Sekretion in humanen Bronchialepithelzellen	51
5.2.4 Aufgereinigte bakterielle R6x DNA induziert die IL-10 Sekretion	52
5.2.5 Die <i>S. pneumoniae</i> -induzierte IL-10 Sekretion ist MyD88-abhängig	53
5.2.6 Der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 blockiert die <i>S. pneumoniae</i> -induzierte IL-10 Sekretion	54
5.3 DIE INTERAKTION VON KLF4 AM IL-10 PROMOTER	56
5.3.1 Der Transkriptionsfaktor KLF4 wird an den il-10 Promoter rekrutiert	56
5.3.2 Der Transkriptionsfaktor KLF4 ist essentiell für die Sekretion von IL-10 in <i>S. pneumoniae</i> -infizierten humanen Bronchialepithelzellen	57
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>59</b>
6.1 <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT TLR9-ABHÄNGIG DEN TRANSKRIPTIONSFAKTOR KLF4 IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN	59
6.1.1 <i>S. pneumoniae</i> und KLF4 Expression	60
6.1.2 Toll-like Rezeptor-vermittelte KLF4 Expression	60
6.1.3 MAPK- und NF- $\kappa$ B-unabhängige KLF4 Expression	63
6.1.4 Src Tyrosinkinase-vermittelte KLF4 Expression	63
6.2 <i>S. PNEUMONIAE</i> INDUZIERT TLR9-ABHÄNGIG DIE INTERLEUKIN-10 SEKRETION IN HUMANEN BRONCHIALEPITHELZELLEN	65
6.2.1 <i>S. pneumoniae</i> und IL-10 Expression	65
6.2.2 Toll-like Rezeptor-vermittelte IL-10 Expression	66
6.2.3 Src Tyrosinkinase-vermittelte IL-10 Sekretion	68
6.3 DIE INTERAKTION VON KLF4 AM IL-10 PROMOTER	69
6.4 AUSBLICK	70
<b>7. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>74</b>
<b>9. ANHANG</b>	<b>88</b>
9.1 VERÖFFENTLICHUNGEN	88
9.1.1 Originalarbeiten	88
9.1.2 Kongressbeiträge	88
9.2 DANKSAGUNG	89
9.3 LEBENS LAUF	90
9.4 EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	91

## 1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden	7
Abbildung 2: Src-PTK und die Interaktion am TLR9	11
Abbildung 3: KLF4 in der Literatur	13
Abbildung 4: IL-10 in der Literatur	16
Abbildung 5A-D: <i>S.p.</i> induziert zeit- und dosisabhängig die Induktion von KLF4 in BEAS-2B- und SAE-Zellen	38
Abbildung 6: Nachweis der KLF4 Induktion in Pneumokokken-infizierten Mauslungen	39
Abbildung 7A und B: MyD88 siRNA blockiert die Induktion von KLF4 durch <i>S.p.</i> auf Proteinebene	40
Abbildung 8: MALP2 induziert keine KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen	41
Abbildung 9A-C: Die <i>S.p.</i> -induzierte KLF4 Expression ist nicht abhängig vom TLR4	43
Abbildung 10A und B: ODN M362 induziert zeitabhängig und R6x DNA dosisabhängig die KLF4 Expression	44
Abbildung 11: Der TLR9 Inhibitor TTAGGG inhibiert dosisabhängig die R6x-induzierte KLF4 Expression	45
Abbildung 12A und B: Die <i>S.p.</i> -induzierte KLF4 Expression ist unabhängig von den MAPK p38, ERK, JNK und dem Transkriptionsparameter NF- $\kappa$ B	47
Abbildung 13: PP2 inhibiert die <i>S.p.</i> -induzierte KLF4 Expression	48
Abbildung 14: <i>S.p.</i> induziert zeitabhängig eine IL-10 Expression in BEAS-2B-Zellen	49
Abbildung 15A und B: <i>S.p.</i> induziert eine dosisabhängige IL-10 Sekretion in SAE- und HEK293-Zellen	50
Abbildung 16: Nachweis der IL-10 Induktion in <i>S.p.</i> infizierten Mauslungen	51
Abbildung 17A und B: CpG-DNA (ODN M362) induziert dosisabhängig die IL-10 Sekretion	52
Abbildung 18: bakterielle DNA induziert die IL-10 Sekretion	53
Abbildung 19A und B: MyD88 siRNA blockiert die <i>S.p.</i> -induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen	54
Abbildung 20A-C: PP2 inhibiert die <i>S.p.</i> -induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen	55
Abbildung 21: Bindung von KLF4 an den <i>il-10</i> Promoter in <i>S.p.</i> -infizierten BEAS-2B-Zellen	56
Abbildung 22: KLF4 siRNA inhibiert die <i>S.p.</i> -induzierte KLF4 Expression in HEK293-Zellen	57
Abbildung 23: KLF4 siRNA blockiert die <i>S.p.</i> -induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen	58
Abbildung 24: Graphische Darstellung der KLF4-abhängigen IL-10 Sekretion in humanen Lungenepithelzellen durch <i>S.p.</i>	73

## 1.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Temperatureinheit Grad Celsius
μ	Mikro
a. bidest	Zweifach destilliertes Wasser
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
BEAS-2B-Zellen	Humane Bronchialepithelzelllinie
CpG	Cytidin-Guanosin- Dinukleotide
ELISA	<i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
HEK293-Zellen	Humane embryonale Nierenepithelzelllinie
IFN $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IL	Interleukin
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KLF	Krüppel-like Faktor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B
NLR	Nod-like-Rezeptoren
OD	optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Ply	Pneumolysin
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
RLR	<i>RIG-1-like-receptor</i>
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SABM	<i>small airway cell basal medium</i>
SAEC	<i>small Airway Epithelial Cells</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Src PTK	Src Proteintyrosinkinase
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
ZBP1	Z-DNA bindende Protein

## 2. Einleitung

### 2.1 Pneumonie

Der Sammelbegriff Pneumonie bezeichnet Erkrankungen, die mit der Entzündung des Lungenparenchyms einhergehen (Braunwald 2005). Als größte Oberfläche des menschlichen Körpers steht das tracheobronchiale und pulmonale Epithel in ständigem Kontakt mit der äußeren Umwelt und ist im besonderen Maße potentiell schädlichen biologischen, als auch physikalischen Agenzien ausgesetzt (Martin und Frevert, 2005). Die Pneumonie infektiöser Genese ist dabei die häufigste registrierte Infektionskrankheit in Industrienationen und nach koronarer Herzkrankheit und Apoplex die weltweit dritthäufigste Todesursache (Lopez und Mathers, 2006). Die Einteilung der Pneumonien erfolgt u.a. in ambulant erworbene Pneumonien [engl.: *community acquired pneumonia* (CAP)] und nosokomial erworbene Pneumonien [engl.: *hospital acquired pneumonia* (HAP)]. Dabei sind mehr als 90 % der ambulant erworbenen Pneumonien bakterieller Genese (Welte et al., 2006). Die Letalität der stationär behandelten Patienten mit CAP liegt bei 13-14%, bei ambulant behandelten Patienten dagegen bei <1% (Hoffken et al., 2009). Weitaus höhere Letalitätsraten von 33-71 % finden sich bei nosokomialen Pneumonien (Lopez und Mathers, 2006). Das Erregerspektrum der ambulant erworbenen Pneumonie weist erhebliche Variationen auf, die auf geographische Unterschiede sowie auf Unterschiede in der Risikostruktur verschiedener Patientenpopulationen zurückzuführen sind (Hoffken et al., 2005). Im Rahmen des Kompetenznetzwerkes „ambulant erworbene Pneumonie“ (CAPNETZ-Studie) wurden multizentrisch seit 2001 die klinischen und mikrobiologischen Daten von über 8000 CAP-Patienten erfasst, um hieraus die Epidemiologie sowie neue Handlungsempfehlungen und Therapieleitlinien der CAP ableiten zu können (Hoffken et al., 2009). Insgesamt wird die Gesamthäufigkeit der CAP in Deutschland auf 400.000 bis 600.000 pro Jahr geschätzt (Welte und Kohnlein, 2009). Aus den aktuellen Daten des CAPNETZ zeigt sich, dass in der Bundesrepublik Deutschland *Streptococcus pneumoniae* mit einem Anteil von ca. 40 % den häufigsten Erreger bei der ambulant erworbenen Pneumonie im Erwachsenenalter darstellt (Hoffken et al., 2009; Welte et al., 2006) .

### 2.1.1 Pneumokokkenpneumonie

*S. pneumoniae* (*S.p.*) ist der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Die Pneumokokkenpneumonie weist zwei Inzidenzgifel auf. So sind Erwachsene über 65 Jahre und Kleinkinder besonders gefährdet (O'Brien et al., 2009; Zimmerman, 2005). Schwere Verlaufsformen werden darüberhinaus signifikant häufiger bei Rauchern, Alkoholikern, immunsupprimierten und splenektomierten Patienten sowie bei Patienten mit Sichelzellanämie und humoralen Immundefekten beobachtet (de Roux et al., 2006; Overturf, 2000).

Die intermittierende nasopharyngeale Besiedlung von *S.p.* stellt zumeist den Ausgangspunkt einer Infektion des unteren Atemwegstraktes bzw. einer Pneumokokkenpneumonie dar (Kadioglu et al., 2008). Bei 5-10 % der gesunden adulten Bevölkerung und 20-40 % der Kleinkinder konnte eine nasopharyngeale Kolonisation mit *S.p.* gesichert werden, wobei u.a. Abwehrmechanismen des Respirationstraktes und eine intakte Epithelbarriere eine Erkrankung verhindern (Overturf, 2000). Die Minderung der natürlichen Resistenz, allergische Obstruktion oder Epithelschäden durch Zigarettenrauch oder virale Koinfektionen werden als prädisponierende Faktoren für eine Ausbreitung von *S.p.* aus den Nasopharynx in den unteren Respirationstrakt angesehen (Buttery und Moxon, 2002; de Roux et al., 2006). Eine Kombination aus Virulenzfaktoren und der Eigenschaft frühe Komponenten des Immunsystems des Wirtes zu unterwandern, ermöglicht es dem Erreger, sich in Regionen des unteren Respirationstraktes auszubreiten (Kadioglu et al., 2008). Die klassische Präsentation der Pneumokokkenpneumonie besteht aus der relativ unspezifischen und variablen Symptomkonstellation Fieber, Dyspnoe, Husten, purulenter Sputumproduktion und Brustschmerz sowie einem stark beeinträchtigten Allgemeinbefinden. Insbesondere bei älteren Patienten kann die Klinik durch oligosymptomatische Verläufe und extrapulmonale Symptome, wie Somnolenz und Konfusion verschleiert werden (Zimmerman, 2005). Die Diagnosestellung erfolgt anhand des klinischen Gesamtbildes, Blut- und Sputumkulturen sowie einer Thoraxröntgenaufnahme (Buttery und Moxon, 2002; File, 2003). Für das Therapiemanagement der ambulant erworbenen Pneumonie erfolgt eine Einschätzung des Patienten u.a. für das Risiko krankheitsbedingter Komplikationen, der sozialen Situation und individueller Risikofaktoren für Erregerspektren und -resistenzen. Zahlreiche Scoring-Systeme wie der CURB-Index oder der CRB-65-Score versuchen Risiko- und Prognosefaktoren zu erfassen, um daraus eine objektive Handlungsempfehlung für die Therapie abzuleiten (Ananda-Rajah et al., 2008). Im Rahmen der CAPNETZ-Studie zeigte sich, dass der inflammatorische Biomarker Procalcitonin frühzeitig mit dem Schweregrad bakterieller Pneumonien korreliert. Darüberhinaus sind kardiovaskuläre

Biomarker wie Pro-Adrenomedullin Prädiktoren für die Kurz- und Langzeitmortalität der CAP (Kruger et al., 2010). Bei der Therapiewahl ist die jeweilige Resistenzsituation zu beachten. Während in Süd- und Osteuropa bis zu 50 % der Pneumokokken eine Penicillinresistenz aufweisen, spielt die Penicillinresistenz in Deutschland noch eine untergeordnete Rolle. Dahingegen hat die Makrolidresistenz von *S.p.* im vergangenen Jahrzehnt in Deutschland auf 15,7 % in 2001 überdurchschnittlich zugenommen (File, 2003; Hoffken et al., 2005). Leitliniengerecht erfolgt die Therapie bei stationär aufgenommenen Patienten für 7-10 Tage parenteral nach Antibiotogramm und für Patienten ohne weitere Risikofaktoren in der Gabe von Aminopenicillinen, Makroliden oder Tetracyclinen (Hoffken et al., 2005). Eine Impfprophylaxe gegen *S.p.* ist fester Bestandteil im Impfkalender der „Ständigen Impfkommision“ des Robert-Koch-Instituts. Eine Impfung wird insbesondere Risikopatienten sowie generell Personen unter 2 Jahren und über 65 Jahren empfohlen (Robert-Koch-Institut, 2010). Im Erwachsenenalter erfolgt die Vakzinierung mit einem 23-valenten Polysaccharidimpfstoff, beim Kleinkind unter 2 Jahren mit einem 7-valenten Konjugatimpfstoff (O'Brien und Santosham, 2004; Overturf, 2000).

## **2.2 Pneumokokken**

Pneumokokken sind ca. 1 µm große, fakultativ anaerobe, gram-positive, oval bis lanzettförmige Diplokokken. Die Einteilung erfolgt aufgrund der verschiedenen Kapselantigene in ca. 90 immunologisch verschiedene Serotypen (Hausdorff et al., 2005). Die umgebende Polysaccharidkapsel wirkt antiphagozytär und ist zugleich wichtigster Pathogenitätsfaktor *in vivo* (Hof und Dörris, 2009; Jedrzejak, 2001). Das von Pneumokokken exprimierte Pneumolysin reduziert das Hämoglobin in Blutagarplatten zu einer graugrünen biliverdinähnlichen Verbindung ( $\alpha$ -Hämolyse). *S.p.* wurde als Hauptursache der Pneumonie von Klein 1884 erstmals beschrieben. Darüberhinaus sind Pneumokokken vor allem im Kindesalter Erreger der Otitis media, Meningitis und Sinusitis (Buttery und Moxon, 2002; O'Brien et al., 2009).

### **2.2.1 Virulenzfaktoren**

Das Zusammenwirken einer Vielzahl von Virulenzfaktoren ermöglicht es *S.p.*, sich effizient der angeborenen Immunantwort zu entziehen. *S.p.* wird dabei von einer ca. 200-400 nm dicken Polysaccharidkapsel umgeben, die ein wesentlicher Bestandteil der Virulenz und Pathogenität des Erregers *in vivo* ist (Hof und Dörris, 2009). Unbekapselte Pneumokokken werden *in vivo* als avirulent angesehen (Hof und Dörris, 2009). Nur vereinzelt wurden unbekapselte Pneumokokken bei oberflächlichen Infektionen der Konjunktiven beobachtet (Martin und Frevert, 2005). Die

Polysaccharidkapsel besitzt starke antiphagozytäre Eigenschaften und schützt vor der Opsonierung durch Antikörper und Komplement (Kadioglu et al., 2008; Skov Sorensen et al., 1988). Zellwandkomponenten wie Peptidoglykan, Teichon- und Lipoteichonsäuren stellen hochkonservierte molekulare Muster dar, die von Rezeptoren des Immunsystems erkannt werden (Jedrzejewski, 2001). Ein weiterer entscheidender Virulenzfaktor von *S.p.* ist das Pneumolysin (Jounblat et al., 2003). Das 52 kDa große, lösliche Protein liegt im Zytoplasma der Bakterien vor und wird nach Zellwanddegradation durch bakterieneigenes Autolysin freigesetzt (Hirst, 2004) und in Lungenepithelzellen vom TLR4 detektiert (Schmeck et al., 2006a). Konzentrationsabhängig bewirkt das Exotoxin z.B. eine Inhibition der ziliären Aktivität an bronchialen Epithelzellen, eine Zytolyse der Wirtszellen durch Zellmembranporenbildung sowie CD4+ T-Zell Aktivierung und Chemotaxis (Hirst, 2004; Kadioglu et al., 2004). Auch *in vivo* scheint Pneumolysin eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie durch direkte Schädigung der pulmonalen mikrovaskulären Barrierefunktion im Lungenparenchym zu spielen (Witzenrath et al., 2006).

## **2.3 Das Immunsystem**

Das Immunsystem stellt die evolutionäre Antwort auf die permanente Bedrohung durch infektiöse Agenzien wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten dar. Bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen muss das Immunsystem eine Vielzahl von körperfremden Antigenen erkennen und eliminieren können.

Grundsätzlich kann die immunologische Abwehr infektiöser Erreger beim Menschen in zwei Kategorien unterteilt werden; der unspezifischen bzw. angeborenen und der adaptiven bzw. erworbenen Immunität. Eine verzögerte oder inadäquate Wirtsantwort kann in einer systemischen und lebensbedrohlichen Ausbreitung von Infektionserregern münden (Hof und Dörris, 2009; Murphy et al., 2009). Darüberhinaus limitiert eine feine Regulation zwischen Proinflammation und Antiinflammation überschießende Immunreaktionen und chronisch-entzündliche Erkrankungen (Mege et al., 2006).

### **2.3.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem**

Das phylogentisch ältere, angeborene Immunsystem stellt die erste, schnell verfügbare, jedoch relativ unspezifische Verteidigungslinie zum Schutz des Wirtes gegen eindringende Erreger dar (Murphy et al., 2009). Der Erkennungsprozess der eindringenden Pathogene erfolgt über eine

begrenzte Anzahl von keimbahnkodierten Rezeptoren, welche z.B. auf Gewebsmakrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie Endothel- und Epithelzellen exprimiert werden und hochkonservierte molekulare Muster detektieren (Murphy et al., 2009). Die anschließend zügig einsetzende Reaktion des angeborenen Immunsystems auf die eindringenden Pathogene umfasst u.a. Zytokinsekretion, Komplementaktivierung und Phagozytose sowie die Sekretion von antimikrobiellen Peptiden (Janeway und Medzhitov, 2002; Tosi, 2005). Durch die Fähigkeit zur Phagozytose, der Antigenpräsentation und der nachfolgenden Stimulierung einer spezifischen Antwort von T-Lymphozyten stellen Makrophagen und Dendritische Zellen ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem dar. Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem ist das adaptive Immunsystem hochspezifisch für das infektiöse Agens (Hof und Dörris, 2009). Der Erkennungsprozess führt zur Differenzierung von immunologischen Effektorzellen, die über zellvermittelte Immunität (T-Zellen) und die Bildung Antigen-spezifischer Antikörper durch B-Zellen hochspezifisch zur Elimination des infektiösen Agens beitragen. Darüberhinaus kommt es zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei erneutem Kontakt mit dem gleichen infektiösen Agens eine deutliche beschleunigte Rekrutierung spezifischer Effektorzellen erlaubt und gleichzeitig die Basis für die Ausbildung einer lebenslangen Immunität darstellt (Janeway und Medzhitov, 2002). Zusammengefasst ermöglicht das fein regulierte Zusammenspiel zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dem Wirt effizient auf die Bedrohung durch infektiöse Agenzien zu reagieren (Martin und Frevert, 2005; Murphy et al., 2009). Im Folgenden soll in dieser Arbeit auf wesentliche Komponenten der angeborenen Immunität näher eingegangen werden.

### **2.3.2 Muster erkennende Rezeptoren**

Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene über eine begrenzte Anzahl von keimbahnkodierten mustererkennenden Rezeptoren [engl.: *pattern-recognition receptors*, (PRRs)] (Kumagai et al., 2008). Diese Rezeptoren werden von zahlreichen Immun-, Endothel- und Epithelzellen als transmembranöse Toll-ähnliche Rezeptoren [Toll-like-Rezeptoren (TLRs)] und zytosolische Rezeptoren wie Nod-ähnliche Rezeptoren [Nod-like-Rezeptoren (NLRs)] oder Rig-1-ähnliche Rezeptoren [Rig-1-like-Rezeptoren (RLRs)] exprimiert. Diese erkennen hochkonservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster [engl.: *pathogen-associated molecular patterns*, (PAMPs)], die charakteristisch für ein breites Spektrum an Mikroorganismen sind. Bei den PAMPs handelt es sich um eine typische Anordnung von Zuckermolekülen und Peptiden sowie Zellwandbestandteile und bakterielle oder virale Nukleinsäuren (Janeway und Medzhitov,

2002). Der Erkennungsprozess mündet unter Mitwirkung einer Vielzahl von *second-messenger* Proteinen und intrazellulären Signalkaskaden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die Expression von zahlreichen Entzündungsmediatoren wie z.B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren regulieren (Murphy et al., 2009). Da der Detektierung von Pneumokokken-DNA im Rahmen dieser Arbeit eine besondere Bedeutung zukommen soll, wird im Folgenden ein besonderes Augenmerk auf DNA-erkennende Rezeptoren (Kapitel 2.3.2.1 und 2.3.2.2) gelegt, bevor auf beteiligte Signalmoleküle eingegangen wird.

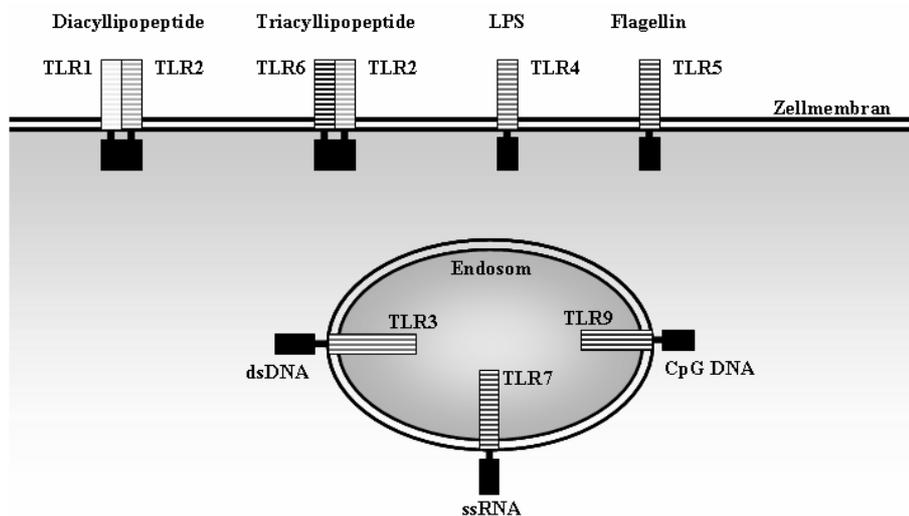
### **2.3.2.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)**

Eine bedeutende Rolle bei der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern stellen die membranständigen und evolutionär hochkonservierten Toll-like Rezeptoren dar. Die Namensgebung ist auf die Erstbeschreibung des Proteins „Toll“ in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zurückzuführen (Anderson et al., 1985). Aktuell konnten 13 murine und 10 humane TLRs identifiziert werden (Kumagai et al., 2008). Die Expression erfolgt auf zahlreichen Immunzellen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen sowie Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen (Kawai und Akira, 2009; Kumagai et al., 2008; Kumar et al., 2009). In kultivierten humanen Lungenepithelzellen konnte die mRNA aller zehn humaner TLR nachgewiesen werden (Greene und McElvaney, 2005). Die TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, und TLR6 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in intrazellulären Kompartimenten der Zelle, wie Endosomen gefunden werden (Kawai und Akira, 2009). TLR können in vier Untergruppen eingeteilt werden: TLR1, TLR2 und TLR6 detektieren Zellwandbestandteile gram-positiver Bakterien wie Lipide und Kohlenhydrate. TLR2 spielt dabei eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von Peptidoglykan, Lipoteichonsäure und Lipoproteinen und bildet ein Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 (Kumagai et al., 2008; Takeuchi et al., 2002). Lipopolysaccharid (LPS), eine Zellwandkomponente gram-negativer Bakterien ist Ligand für den TLR4, wohingegen der TLR5 bakterielles Flagellin erkennt. Die in zytoplasmatischen Membrankompartimente lokalisierten TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 sind Rezeptoren für bakterielle und virale Nukleinsäuren (Akira et al., 2006). Der Ligand für den TLR10 wurde bislang noch nicht identifiziert (Guan et al., 2010).

### **2.3.3.2 Erkennung der Pneumokokken durch TLR**

In der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie scheinen TLR eine wichtige Rolle bei der Detektierung und nachfolgenden Initiierung einer Immuntantwort zu spielen. Aktuelle Studien

implizieren, dass vier der zehn humanen TLRs eine zentrale Rolle bei der Detektion von Pneumokokken und der nachfolgenden Zellaktivierung spielen. So aktiviert die Lipoteichonsäure der Pneumokokkenzellwand den TLR2 (Schröder et al., 2003), während das Pneumokokkentoxin Pneumolysin vom TLR4 detektiert wird (Dessing et al., 2009; Dogan et al., 2010; Schmeck et al., 2006a). Der TLR2 bildet zusammen mit dem TLR1 einen Heterodimerkomplex, der diacetylierte Lipopeptide erkennt (Takeuchi et al., 2002) und nach der Infektion mit *S.p.* zu einer synergistisch verstärkten Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-abhängigen Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt (Schmeck et al., 2006a). Darüberhinaus scheint auch der TLR9 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie zu spielen (Albiger et al., 2007). Der TLR9 wird in der Membran von intrazellulären Kompartimenten, wie Endosomen, exprimiert und detektiert unmethylierte Cytosinphosphat-Guanosin (CpG)-Dinukleotide, welche insbesondere in prokaryonter DNA vorkommen (Takeda und Akira, 2007). Neueste Studien implizieren, dass TLR9 defiziente Mäuse anfälliger für eine Infektion mit *S.p.* sind. Im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigten TLR9 defiziente Mäuse nach nasaler Infektion mit Pneumokokken insbesondere im Frühstadium der Infektion vermehrt Bakteriämien verbunden mit einer signifikant höheren Letalität (Albiger et al., 2007).



**Abbildung 1: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden**

Die Abbildung zeigt schematisch die zur Zeit bekannten humanen Toll-like Rezeptoren, deren Lokalisation und natürlichen Liganden. Die Abbildung wurde modifiziert nach Takeda (Kawai und Akira, 2009; Takeda und Akira, 2005)

### 2.3.2.3 weitere DNA-erkennende Rezeptoren

Während für lange Zeit der membranständige TLR9 der einzige bekannte DNA-erkennende Rezeptor war, zeigen neueste Studien, dass weitere zytosolische Rezeptoren an der Erkennung von bakterieller und viraler DNA beteiligt sind (Takaoka und Taniguchi, 2008). Der am besten studierte Vertreter ist das zytosolisch vorliegende Z-DNA bindende Protein (ZBP1), auch als DLM-1/DAI bezeichnet. ZBP1 (DLM-1/DAI) bindet doppelsträngige DNA Fragmente und führt zu einer TLR9/MyD88-unabhängigen Induktion von Typ I Interferon Genen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen (Stetson und Medzhitov, 2006; Takaoka et al., 2007; Yanai et al., 2009). Sowohl synthetische DNA, als auch die Stimulation mit *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila* führten in Mausfibroblasten zu einer Aktivierung dieses zytosolischen DNA-Signalweges (Stetson und Medzhitov, 2006). Lippman et al. konnten diese Beobachtung in der humanen Lungenepithelzelllinie nach Stimulation mit *Legionella pneumophila* jedoch nicht nachvollziehen (Lippmann et al., 2008). Ein weiterer DNA erkennender Prozess ist die intrazelluläre Formation des AIM2-(*absent in melanoma 2*) beinhaltenden Inflammasoms, dass einen proteolytischen Signalweg triggert, der in der Aktivierung von IL-1 $\beta$  resultiert (Hornung und Latz, 2010).

### 2.3.3 Toll-like-Rezeptoren Signalweg

Toll-like Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären leucine-rich repeat (LRR) Domäne, die maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligt ist sowie einer zytoplasmatischen Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne, welche eine wichtige Rolle bei der weiteren Signaltransduktion einnimmt (Kumagai et al., 2008). Die extrazelluläre Bindung eines TLR-Liganden an seinen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und der intrazellulären Rekrutierung unterschiedlicher Adapterproteine, die als Strukturmerkmal eine TIR-Domäne enthalten (Takeda und Akira, 2007). Aktuell sind vier solcher Adapterproteine in Zusammenhang mit Toll-like Rezeptoren beschrieben. Die Eigenschaft von Toll-like Rezeptoren Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, hängt dabei maßgeblich von der unterschiedlichen Rekrutierung der vier bekannten Adapterproteine ab. Der am besten charakterisierte Vertreter ist dabei der *Myeloid differentiation factor 88* (MyD88) (Kumar et al., 2009). Mit Ausnahme von TLR3 ist das Adapterprotein MyD88 an der Signaltransduktion von allen humanen TLRs beteiligt (Kawai und Akira, 2009). Dabei interagiert MyD88 über seine TIR-Domäne mit dem zytosolischen Teil des TLR und initiiert durch Wechselwirkung mit seiner Todesdomäne einen MyD88-abhängigen Signalweg, der unter Zwischenschaltung von *interleukin-1 receptor-*

*associated kinase (IRAK)* weitere intrazelluläre Signalwege, u.a. Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK), den Inhibitorischen kappa B Kinase Komplex (IKK-Komplex) und Fas-associated death domain (FADD)/caspase8 involviert (Li et al., 2010b). Für IRAK-4 konnte bereits gezeigt werden, dass die IRAK-4 Defizienz bei Kleinkindern zu einer beeinträchtigten TLR Immunität führte, die die Ursache für wiederkehrende invasive Pneumokokkeninfektionen zu sein scheint (Ku et al., 2007).

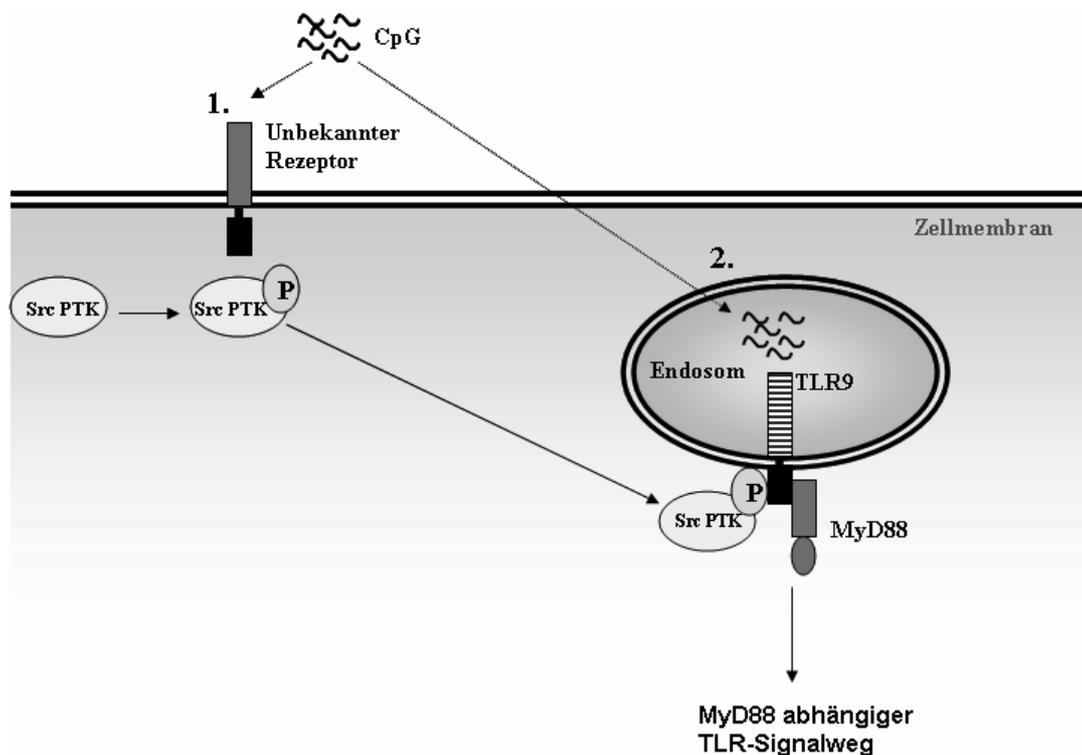
Über die Aktivierung der beschriebenen Signalwege werden schließlich die pleiotropen Effekte der TLRs wie Zellproliferation und Apoptose (Kumar et al., 2009) sowie die Induktion von proinflammatorischen (Kumagai et al., 2008; Opitz et al., 2007; Schmeck et al., 2004) und antiinflammatorischen Zytokinen vermittelt (Liu et al., 2006; Murray, 2006; Sheller et al., 2009). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit soll im Folgenden der Schwerpunkt u.a. auf die MAPKs und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B gelegt werden.

### **2.3.3.1 Mitogen-aktivierte Protein Kinasen**

Die Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK) stellen eine Gruppe von Proteinen dar, die eine Vielzahl von extrazellulären Signalen ins Zellinnere weiterleiten, zahlreiche Transkriptionsfaktoren regulieren und auf zahlreiche Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Inflammation einwirken (Eferl und Wagner, 2003; Whitmarsh und Davis, 1999). Im Entzündungsgeschehen fungieren die MAPK als wichtige Signaltransduktionsintermediate zwischen der Detektierung von TLR und der nachfolgenden Aktivierung von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa$ B (Li et al., 2010b). Die Familie der MAPK besteht im Wesentlichen aus drei Untergruppen: So involviert die TLR-induzierte Signaltransduktion die Aktivierung von ERK (engl.: *extracellular signal-regulated kinase*), JNK (engl.: *c-Jun N-terminal kinase*) und p38 MAPK (Li et al., 2010b). Die Aktivierung der MAPK nach Stimulation mit Pneumokokken konnte für JNK und p38 MAPK in Lungenepithelzellen (Schmeck et al., 2006b), für p38 MAPK in Mauslungen (Schmeck et al., 2004) und für ERK in humanen Epithelzellen (Ha et al., 2007) gezeigt werden. Neben der proinflammatorischen Aktivierung scheint der MAPK-Signalweg auch bei der TLR-vermittelten Antiinflammation eine wichtige Rolle zu spielen (Liu et al., 2006; Murray, 2006; Pilette et al., 2010).

### 2.3.3.2 Src Proteintyrosinkinasen

Tyrosinkinasen sind Proteinkinasen, die reversibel Phosphatgruppen auf Hydroxygruppen der Aminosäure Tyrosin anderer Proteine übertragen. Die Proteinphosphorylierung ist ein wichtiger zellulärer Mechanismus zur Regulation von z.B. Proliferation, Differenzierung und Inflammation (Rothschild et al., 2010; Sefton und Shenolikar, 2001). Die Src Protein Tyrosinkinasefamilie gehört zur Familie der Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen und spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen sowie der Regulation der Gefäßpermeabilität und Immunantwort von Epithel- und Endothelzellen in Lungen (Okutani et al., 2006). Derzeit sind die acht humanen Src Proteintyrosinkinasen (Src PTK) c-Src, Fyn, Yes, Blk, Fgr, Hck, Lck und Lyn bekannt, wovon c-Src, Fyn, Yes und ubiquitär exprimiert werden (Thomas und Brugge, 1997). Die Aktivierung der Src PTK erfolgt als Antwort auf die Stimulation von zahlreichen Zelloberflächenrezeptoren, wie Tyrosinkinaserezeptoren, Integrinrezeptoren, G-Protein gekoppelten Rezeptoren und TLR. Darüberhinaus regulieren Src PTK auch die Aktivität dieser Rezeptoren (Okutani et al., 2006; Thomas und Brugge, 1997). Die Expression von Hck, Lyn und Fgr wird von zahlreichen inflammatorischen Stimulantien, u.a. LPS in reifen Monozyten und Makrophagen induziert (Boulet et al., 1992). Aktuelle Studien implizieren, dass eine koordinierte Src PTK Signaltransduktion notwendig für eine erfolgreiche Invasion von *S.p.* in seine Wirtszellen zu sein scheint (Agarwal et al., 2010). Gleichfalls zeigen mehrere Studien, dass Src PTK bei der Interaktion mit TLR und der Regulation dieser eine bedeutende Rolle bei der Initiierung einer frühen Immunantwort spielen (Sanjuan et al., 2006; Smolinska et al., 2008). Weitergehende Beobachtungen deuten darauf hin, dass die frühe Aktivierung der Src PTK Hck und Lyn nach Stimulation mit dem TLR9 Ligand CpG-DNA ein essentieller Bestandteil für die nachfolgende Aktivierung von TLR9/MyD88 in Endosomen spielt (Sanjuan et al., 2006). Sanjuan et al. postulieren in ihrem Model einen unbekanntem membranständigen Rezeptor, der CpG-DNA detektiert und die beiden Src PTK Hck und Lyn aktiviert. Die nachfolgend induzierte Tyrosinphosphorylierungskaskade führt neben Umstrukturierung und Neuordnung der Aktinfilamente zur Interaktion und Aktivierung des TLR9. Erst in einem zweiten Schritt binden die in die Endosomen internalisierten CpG-DNA an den aktivierten TLR9 und initiieren die MyD88-abhängige Induktion von inflammatorischen Genen (Sanjuan et al., 2006). Der Src PTK-Signalweg kann durch die Verwendung des Src PTK Inhibitors 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2) inhibiert werden (Kong et al., 2011) und blockiert durch fehlende TLR9-Aktivierung die MyD88-abhängige Induktion von inflammatorischen Zytokinen (Sanjuan et al., 2006).



**Abbildung 2: Src-PTK und die Interaktion am TLR9**

Die Abbildung zeigt schematisch das von Sanjuan et al. postulierte Model der Zwei-Schritt Aktivierung von TLR9/Src PTK/MyD88 durch CpG-DNA über einen unbekanntem zellmembranständigen Rezeptor. Die Abbildung wurde leicht modifiziert nach Sanjuan (Sanjuan et al., 2006).

### 2.3.3.3 Aktivierung von NF- $\kappa$ B

Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kontrolliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die an der Einleitung, Aufrechterhaltung oder Limitierung einer Entzündungsreaktion beteiligt sind (Kawai und Akira, 2009; Kumar et al., 2009). Die Aktivierung aller bislang in der Literatur beschriebenen humanen TLRs durch ihre Liganden mündet nach einer komplexen Signaltransduktion in der Stimulation von NF- $\kappa$ B (Kawai und Akira, 2007). Der MAPK-Signalweg stellt hier ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von TLR und NLR und der nachfolgenden Aktivierung NF- $\kappa$ B dar (Opitz et al., 2007; Takeda und Akira, 2005). Als ein weiterer PRR scheint auch das zytosolische DNA-erkennende Protein ZBP1 (DLM-1/DAI) zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B beitragen zu können (Takaoka und Taniguchi, 2008).

NF- $\kappa$ B selbst besteht aus fünf Untereinheiten (REL-B, c-REL, p50, p52 und p65), die untereinander Homo- oder Heterodimere bilden können und für die Sequenz-spezifische DNA-

Bindung verantwortlich sind (Kawai und Akira, 2009). Die transkriptionelle Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird dabei durch mehrere nukleäre Proteine kontrolliert. So werden NF- $\kappa$ B Homo- oder Heterodimere im Zytosol normalerweise durch Proteine der I $\kappa$ B-Familie inhibiert (Kumar et al., 2009; Li et al., 2010b). Nach der Befreiung von seinem zytosolischen Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  durch proteasomale Degradation wird NF- $\kappa$ B in den Zellkern transloziert und reguliert auf Promoterebene die Transkription von Adhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Zytokinen (Janssen-Heininger et al., 2009) und antinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 (Sheller et al., 2009). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch PRRs im Pathogen-exponierten Lungenepithel ist als ein zentrales Ereignis der inflammatorischen Aktivierung anzusehen (Hippenstiel et al., 2006). Auch Pneumokokken führen nach der Infektion von Lungenepithelzellen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B (N'Guessan et al., 2006; Schmeck et al., 2006a). Unterstützend zeigen *in vivo* Daten von Sadikot et al., dass die selektive Überexpression der I $\kappa$ B Kinase in Lungenepithelzellen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B und Expression von inflammatorischen Mediatoren führte (Sadikot et al., 2003).

### **2.3.4 Krüppel-like Faktor Familie**

Krüppel-like Faktoren gehören zu der Familie der Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, die eine große Bandbreite von zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Proliferation und Apoptose regulieren (Ghaleb et al., 2005). Aktuelle Studien implizieren, dass Krüppel-like Faktoren auch im Entzündungsgeschehen eine wichtige Rolle spielen (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2007). Die Nomenklatur der Krüppel-like Faktoren basiert auf der Homologie der DNA-Bindungsdomäne zum Protein „Krüppel“ der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, welches für die Segmentierung der Fliege verantwortlich ist (Atkins und Jain, 2007). Phylogenetische Analysen zeigen eine enge Verwandtschaft zur Familie der SP1 und Krox Zink-Fingerproteine (McConnell et al., 2007). Die KLF Familie besitzt jedoch im Unterschied zu diesen neben den drei hochkonservierten Zinkfingerproteinen eine zusätzliche hochkonservierte 7aa Sequenz zwischen jedem Zinkfinger (Atkins und Jain, 2007; Bieker, 2001). Beim Säugetier wurden bislang 17 verschiedene Krüppel-like Faktoren beschrieben (Atkins und Jain, 2007; McConnell et al., 2007). Aktuelle Untersuchungen implizieren insbesondere den Transkriptionsfaktoren KLF2 und KLF4 eine wichtige Funktion bei der Modulation des Entzündungsgeschehens (Atkins und Jain, 2007; Feinberg et al., 2005).

### 2.3.4.1 Der Transkriptionsfaktor Krüppel-like Faktor 4

KLF4 gehört zur Gruppe der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren und wurde erstmals 1996 als epithelspezifischer Transkriptionsfaktor beschrieben (Shields et al., 1996). Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass KLF4 eine herausragende Rolle bei der Differenzierung und Wachstumsregulation des Darm- und Epidermisepithels spielt (Ghaleb et al., 2005). Der prädominierende Phänotyp einer KLF4<sup>-/-</sup> Knockout-Maus ist eine gestörte Barrierefunktion der Haut, die zu Dehydration und früher postnataler Letalität führt (McConnell et al., 2007). Die Überexpression von KLF4 in murinen Ösophagusepithelzellen führte hingegen zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen (Tetreault et al., 2010). Aufgrund seines hemmenden Einflusses auf den Zellzyklus scheint KLF4 als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese zu spielen. Signifikant verminderte Level von KLF4 mRNA wurden insbesondere in Tumorzellen beim Kolonkarzinom, bei der Familiären adenomatösen Polyposis (Dang et al., 2000) sowie beim Lungenkarzinom (Hu et al., 2009; Zhou et al., 2010) beobachtet. Neueste Untersuchungen implizieren den Krüppel-like Faktor 4 als einen wichtigen Regulator im Entzündungsgeschehen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die proinflammatorischen Stimuli LPS, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in Makrophagen (Feinberg et al., 2005) und IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  in humanen Endothelzellen (Hamik et al., 2007) zu einer starken Induktion von KLF4 führten. Des Weiteren konnten in humanen Makrophagen der TLR2 (Zhou und Amar, 2007) und in murinen und humanen Endothelzellen der TLR4 (Hamik et al., 2007) als an der KLF4-Induktion beteiligte Rezeptoren beschrieben werden. In vaskulären Muskelzellen konnten die Beteiligung der p38 MAPK (Li et al., 2010a) und in Endothelzellen ERK5 (Ohnesorge et al., 2010) an der Induktion einer KLF4 Expression in der aktuellen Literatur beschrieben werden.

	<u>Zelllinie</u>	<u>Autor</u>
<b><u>beschriebene KLF Induktoren</u></b>		
LPS, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$	humane Makrophagen	Feinberg et al., 2005
IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$	humane Endothelzellen	Hamik et al., 2007
<b><u>beschriebene, an der KLF-Induktion beteiligte Rezeptoren</u></b>		
TLR2	humane Makrophagen	Zhou und Amar, 2007
TLR4	murine & humane Endothelzellen	Hamik et al., 2007
<b><u>beschriebene, an der KLF-Induktion beteiligte Kinasen</u></b>		
p38 MAPK	vaskuläre Muskelzellen (Ratte)	Li et al., 2010a
ERK5	humane Endothelzellen	Ohnesorge et al., 2010

**Abbildung 3: KLF4 in der Literatur**

Die Abbildung zeigt tabellarisch, die bereits in der aktuellen Literatur beschriebenen KLF4 Induktoren sowie an der KLF-Induktion beteiligte Rezeptoren und Kinasen in der jeweils untersuchten Zelllinie.

Als potenter antiinflammatorischer Transkriptionsfaktor reguliert KLF4 die Aktivität pro- und antiinflammatorischer Gene. So inhibiert KLF4 zahlreiche proinflammatorischen Faktoren und führt zu einer signifikanten Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (Atkins und Jain, 2007; Hamik et al., 2007). Die Überexpression von KLF4 induziert antiinflammatorische Faktoren, wie die endotheliale Nitritoxidase (eNOS) (Hamik et al., 2007). Als Transkriptionsfaktor scheint KLF4 darüberhinaus durch die Interaktion am *il-10* Promoter eine kritische Rolle bei der Expression von Interleukin-10 im Entzündungsgeschehen zu spielen (Hamik et al., 2007; Liu et al., 2007).

### **2.3.5 Zytokine und Chemokine**

Nach der Erkennung von Pathogenen über PRRs und der Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden reagiert das Lungenepithel und die Immunzellen neben einer Hochregulation von Zelloberflächenadhäsionsmolekülen mit der gesteigerten Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Hippenstiel et al., 2006). Zytokine und Chemokine sind pleiotropische, regulatorische Proteine, die als Antwort auf Inflammation von Immunzellen sowie u.a. epithelialen und endothelialen Zellen exprimiert werden und als chemischer Informationsträger zwischen Zellen und Geweben agieren (Taub DD, 2004, Katsutoshi, 2002).

#### **2.3.5.1 Interleukin-10**

Interleukin-10 (IL-10) zählt neben IL-4 und IL-11 zu den wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen (Saraiva und O'Garra, 2010) und wird insbesondere von dendritischen Zellen, aktivierten Makrophagen, B-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Jankovic et al., 2007) sowie auch von Endothel- und Epithelzellen exprimiert (Hocke et al., 2006; Suzuki et al., 2008). Aktuelle Studien indizieren, dass IL-10 eine überschießende Immunantwort effizient limitieren kann, um so die empfindliche Balance zwischen Pro- und Antiinflammation einzuhalten (Mege et al., 2006). Auf der anderen Seite spielt IL-10 jedoch auch eine kritische Rolle bei der Persistenz von zahlreichen viralen Infektionen (Filippi und von Herrath, 2008). Nach Bindung an seinen zellulären Rezeptor vermittelt IL-10 eine Bandbreite unterschiedlicher Aktivitäten. Auf humanen Makrophagen und Monozyten blockiert IL-10 die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *Major Histocompatibility Complex* (MHC)) Klasse II Molekülen. Des Weiteren wird die Bildung von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18 und TNF $\alpha$ ) und Chemokinen (IL-8) in Immunzellen gehemmt

(Couper et al., 2008). Dieses führt in Konsequenz zu einer Einschränkung der Aktivierung und Zytokinfreisetzung von T-Zellen während der spezifischen Immunantwort (Moore et al., 2001; Pestka et al., 2004). Zahlreiche Bakterien, Viren, Parasiten oder ihre Produkte sind in der Lage die IL-10 Produktion in Wirtszellen zu stimulieren (Mege et al., 2006). So gibt es starke Hinweise, dass IL-10 eine herausragende Rolle bei der Modulation des Krankheitsgeschehens der Pneumonie durch *Streptococcus pneumoniae* einnimmt. So führte im Mausversuch eine erhöhte pulmonale Konzentration von IL-10 (z.B. nach einer pulmonalen viralen Infektion) zu einer erhöhten Anfälligkeit für eine Pneumokokkenpneumonie mit einer signifikant höheren Bakterienzahl und damit verbundener höherer Letalität (van der Sluijs et al., 2004). Gleichzeitig führte die Gabe eines monoklonalen IL-10 Antikörpers vor Infektion mit *S.p.* im Mauspneumoniemodell zu einer reduzierten Bakterienzahl und einem verlängertem Überleben (van der Poll et al., 1996; van der Sluijs et al., 2004). Im Serum von Patienten mit einer ambulant erworbenen Pneumonie (CAP) scheint IL-10 einen prädiktiven Wert im Hinblick auf die Letalität zu haben. So zeigte eine retrospektive Untersuchung, dass die Konzentration von IL-10 im Serum von Patienten in der Gruppe der Nicht-Überlebenden im Vergleich zur Gruppe der Überlebenden signifikant erhöht war (Lee et al., 2010). Gleichfalls stellte in klinischen Studien ein Promoterpolymorphismus in Position -1082GG mit einhergehender IL-10 Überexpression einen signifikanten Risikofaktor für die Schwere einer CAP (Gallagher et al., 2003; Wunderink und Waterer, 2005) und das Auftreten eines septischen Schocks durch *S.p.* dar (Schaaf et al., 2003). Die Folgen einer Imbalance zwischen Pro- und Antiinflammation zeigen sich u.a. beim akuten respiratorischen Atemnotsyndrom (engl.: *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)*) beim Menschen (Armstrong und Millar, 1997). Studien im Tiermodell konnten belegen, dass die Gabe von Interleukin-10 die überschießende Proinflammation im Rahmen eines ARDS effektiv limitieren kann (Bhatia und Moochhala, 2004).

Auch in anderen Krankheiten, in deren eine Imbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen diskutiert wird, bleibt die Studienlage widersprüchlich. So kam ein jüngst publiziertes systematisches Review zu dem Ergebnis, dass die Gabe von Interleukin-10 im Vergleich zu Placebo keinen Vorteil in der Behandlung eines akuten Schubes beim M. Crohn zeigte (Buruiana et al., 2010).

Es ist daher anzunehmen, dass erst das genaue Verständnis über die präzise temporospatiale Regulation von Pro- und Antiinflammation in der Pathogenese der Pneumonie und anderen Autoimmunkrankheiten ein erfolgreiches therapeutisches immunmodulatorisches Eingreifen ermöglicht.

### 2.3.5.2 Regulation der Interleukin-10 Expression

In der aktuellen Literatur werden mehrere TLR diskutiert, welche eine IL-10 Expression induzieren. In Makrophagen führte die Stimulation mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwandkomponenten zu einer TLR2/MyD88-abhängigen IL-10 Expression (Moreira et al., 2008). Liu et al. beobachteten eine IL-10 Expression nach Stimulation mit dem TLR4 Agonisten LPS in Mausmakrophagen (Liu et al., 2007). Des Weiteren führte die Stimulation mit TLR3- und TLR7-Liganden in Mausmilzzellen sowie in einem *in vivo* Mausmodell zu einer IL-10 Induktion (Aumeunier et al., 2010). Eine IL-10 Sekretion nach Stimulation mit TLR9-Liganden konnte bislang in humanen B-Zellen beobachtet werden (Liang et al., 2010).

Beim weiteren *downstream signalling* scheinen u.a. MAPK und NF-κB beteiligt zu sein. So konnten Méndez-Samperio in einem *in vitro* Modell in humanen Lungenepithelzellen zeigen, dass die *Mycobacterium bovis* induzierte IL-10 Expression PI3K/Akt und p38 MAPK Signalweg abhängig ist (Méndez-Samperio et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Liu et al. konnte zeigen, dass die LPS-induzierte IL-10 Expression in Mausmakrophagen NF-κB-abhängig ist und die MAPK ERK, JNK und p38 an der Signaltransduktion beteiligt sind (Liu et al., 2006).

	<u>Zelllinie</u>	<u>Autor</u>
<b><u>beschriebene, an der IL-10-Induktion beteiligte Rezeptoren</u></b>		
TLR2	murine Makrophagen	Moreira et al., 2008
TLR4	murine Makrophagen	Liu et al., 2007
TLR9	humane B-Zellen	Liang et al., 2010
<b><u>beschriebene, an der IL-10-Induktion beteiligte Kinasen</u></b>		
PI3K/Akt, p38 MAPK	vaskuläre Muskelzellen (Ratte)	Méndez-Samperio et al., 2008
ERK, JNK, p38, NF-κB	murine Makrophagen	Liu et al., 2006

#### Abbildung 4: IL-10 in der Literatur

Die Abbildung zeigt tabellarisch die bereits in der aktuellen Literatur beschriebenen, an der IL-10-Induktion beteiligten Rezeptoren und Kinasen in der jeweils untersuchten Zelllinie.

Am *il-10* Promoter finden sich des Weiteren Bindungsstellen für Stat3 [engl.: *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*], Sp1 und Sp3 (Benkhart et al., 2000; Tone et al., 2000). Experimentell konnte gezeigt werden, dass die beiden ubiquitär in Zellgeweben exprimierten Transkriptionsfaktoren Sp1 und Sp3 an den *il-10* Promoter binden und die Transkription des Gens positiv regulieren (Tone et al., 2000). Interessanterweise gehören beide Transkriptionsfaktoren, wie KLF4, zur Familie der Zinkfingerproteine. Liu et al. haben gezeigt, dass auch KLF4 wenigstens eine Bindungsstelle am *il-10* Promoter besitzt, so dass auch dieser Transkriptionsfaktor eine kritische Rolle bei der Induktion einnehmen könnte (Liu et al., 2007).

### 3. Herleitung der Aufgabenstellung

Die Pneumonie ist die häufigste Infektionskrankheit in Industrienationen und weltweit dritthäufigste Todesursache. Dabei ist *Streptococcus pneumoniae* der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie und für zahlreiche pulmonale und extrapulmonale Komplikationen verantwortlich. Aufgrund der in den letzten Jahren weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen und einer ansteigenden Rate an Therapieversagern ist die Pneumokokkenpneumonie von bedeutender medizinischer und volkswirtschaftlicher Relevanz in unserer Gesellschaft. Diese Problematik erfordert es, die intensive Interaktion zwischen Erreger und Lungenepithelzelle zu studieren, um ein besseres Verständnis für die Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie zu entwickeln und neue Therapiestrategien hieraus abzuleiten. Während der Großteil der Studien sich in der Vergangenheit auf die Aktivierung der Proinflammation konzentrierte, ist wenig über die Mechanismen der Terminierung und der Limitierung einer überschießenden Immunreaktion bekannt. Interleukin-10 ist ein wichtiger antiinflammatorischer Mediator, der überschießende Immunreaktionen limitieren, aber auch eine kritische Rolle bei der Persistenz von Erregern spielen kann. Obwohl IL-10 als wichtiger Regulator im Entzündungsgeschehen beschrieben wurde, ist dessen Regulation im Rahmen einer Pneumokokkeninfektion weitestgehend unbekannt. Erst kürzlich konnte von der Arbeitsgruppe um Liu et al. gezeigt werden, dass in Makrophagen der Transkriptionsfaktor KLF4 die Expression von IL-10 positiv reguliert (Liu et al., 2007).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte daher der Einfluss des Transkriptionsfaktors KLF4 im Rahmen der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie untersucht werden.

Folgende Fragen wurden dabei adressiert:

- 1) Induziert *Streptococcus pneumoniae* den Transkriptionsfaktor KLF4 in humanen Bronchialepithelzellen?
- 2) Welche Rezeptoren und Proteinkinasen sind an der *S.p.* bedingten KLF4 Induktion in humanen Bronchialepithelzellen beteiligt?
- 3) Welche Rezeptoren und Proteinkinasen sind an der *S.p.* bedingten IL-10 Induktion in humanen Bronchialepithelzellen beteiligt?
- 4) Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Pneumokokken induzierten KLF4 und IL-10 Expression in humanen Bronchialepithelzellen?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Material**

Für diese Arbeit wurden ausschließlich Chemikalien mit analytischem Reinheitsgrad bzw. zellkulturgeeignete Substanzen verwendet. Bei Verwendung spezieller Produkte wird auf Hersteller und Bezugsquelle im Nachfolgenden hingewiesen. Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit Reinstwasser (Millipore Qualität) angesetzt.

#### **4.1.1 verwendete Zelllinien**

##### **4.1.1.1 Humane Bronchialepithelzelllinie (BEAS-2B)**

Bei den BEAS-2B-Zellen handelt es sich um eine humane Bronchialepithelzelllinie. Die Ursprungszellen wurden durch Autopsie einer gesunden Spenderlunge gewonnen, mit einem Adenovirushybrid 12-SV40 (Ad12SV40) transfiziert und im Anschluss geklont (Reddel et al., 1988). Ohne Zugabe von Serum bleiben die BEAS-2B-Zellen undifferenziert. Die Zellen wurden zwischen Passage 7 und 25 eingesetzt. Die Zellen wurden erworben von ATCC-LGC Standards GmbH, Wesel.

##### **4.1.1.2 Humane embryonale Nierenepithelzelllinie (HEK293)**

Die HEK293-Zellen wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ erworben und sind eine permanente Linie primärer humaner embryonaler Nierenzellen (HEK; Nummer: ACC 305; Kennzeichnung: 293). Die Zellen sind mit Adenovirus Typ 5 DNA transformiert (Graham et al., 1977). Die Zellen wurden zwischen Passage 10 und 30 eingesetzt.

##### **4.1.1.3 Small Airway Epithelial Cells (SAEC)**

SAE-Zellen sind primäre, humane pulmonale Epithelzellen. Sie wurden von der Firma Clonetics/Cambrex (Nummer CC-2547) als Kryostock bezogen und im SAB Medium/BulletKit, inkl. Wachstumssupplementen, kultiviert. Die Zellen wurden in Passage 1 eingesetzt.

#### **4.1.2 Mauslungenproben aus einem *in vivo* Mauspneumoniemodell**

Die in dieser Arbeit abgebildeten Western Blots aus einem *in vivo* Mauspneumoniemodell wurden mit Gesamtmauslungenlysaten durchgeführt. Dafür wurden 10 Wochen alte, ca. 20 g schwere, weibliche C57BL/6-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) unter einer intraperitonealen

Ketamin/Xylazin-Anästhesie intranasal mit 20 µl des *Streptococcus pneumoniae* Stammes PN36 ( $5 \times 10^6$  cfu in PBS) infiziert und nach 6, 12, 24, 48 und 60 Stunden euthanasiert. Die explantierten Lungen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Als Negativkontrolle wurde den Mäusen 20 µl PBS intranasal appliziert und die Lungen zum jeweiligen Zeitpunkt explantiert.

#### 4.1.3 Kulturmedien, Kryokonservierungsmedien und Adhäsionsflüssigkeiten

BEAS-2B-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b>Stimulationsmedium</b>		
Keratinocyten SFM	500 ml	Gibco
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	2,50 µg	Gibco
Rinderhypophysenextrakt	25,00 mg	Gibco
Glutamin 200 mM 100x	5,00 ml	Gibco
Epinephrin-Hydrochlorid (1mg/ml)	250,00 µl	Sigma
All trans Retinolsäure (1mg/ml)	50,00 µl	Sigma
<b>Zellkulturmedium</b>		
Stimulationsmedium	500 ml	Gibco
Penicillin/ Streptomycin 100 x	7,00 ml	PAA
<b>Adhäsionsflüssigkeit</b>		
Keratinocyten SFM	100,00 ml	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA) 100 mg/ml	1,00 ml	Sigma
Fibronectin 1mg/ml	0,10 ml	Sigma
Vitronectin 50 µg/ml	0,10 ml	Sigma
<b>Kryokonservierungsmedium</b>		
Keratinocyten SFM	10,00 ml	Gibco
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	1,00 %	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	7,50 %	Sigma

HEK293-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b>Stimulations-/Zellkulturmedium</b>		
Stimulationsmedium	500,00 ml	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)	10,00 %	Gibco
Glutamin 200 mM 100 x	5,00 ml	Gibco
<b>Kryokonservierungsmedium</b>		
Stimulationsmedium	500,00 ml	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10,00 %	Sigma

SAE-Zellen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b>Stimulationsmedium</b>		
Small Airway Cell Basal Medium + mitgelieferte Supplemente	500,00 ml	Clonetics

#### 4.1.4 Pneumokokkenstämme R6x, R6x $\Delta$ ply und PN36

BEAS-2B-Zellen wurden mit dem *S.p.* Stamm R6x und R6x $\Delta$ ply stimuliert. Dabei handelt es bei dem Stamm R6x um eine unbekapselte Mutante des D39 Wildtyps (Serotyp 2). Die Generierung des R6x erfolgte durch chemische Mutagenese und wurde durch Transkriptionsanalysen verifiziert. Stimulationsversuche mit HEK293-Zellen wurden ausschließlich mit R6x $\Delta$ ply durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine durch Insertionsduplikationsmutagenese generierte Pneumolysin negative Mutante von R6x. Durch eine zusätzlich erworbene Erythromycinresistenz wurden die R6x $\Delta$ ply positiv selektiert. Die Insertion des Plasmids in das Pneumolysin codierende Gen wurde durch PCR-Analyse und DNA-Sequenzierung verifiziert. Im *in vivo* Mauspneumoniemodell wurde der Pneumokokkenstamm PN36 für die intranasale Infektion der Mäuse verwendet. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen unbekapselten Wildtyp (Serotyp 3). Die Pneumokokkenstämme wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. Hammerschmidt, Greifswald.

#### 4.1.5 Medien für die Bakterienkultur

Medien für die Bakterienkultur	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b><i>S.p.</i> Anzuchtboullion</b>		
Todd Hewitt Broth	30,00 g	BD Mikrobiologie
Hefeextrakt	5,00 g	Sigma
A. bidest. ad	1000,00 ml	
<b><i>S.p.</i> Kryomedium</b>		
<i>S.p.</i> Anzuchtboullion	80,00 %	
Glycerol 99 %ig	20,00 %	Sigma

Die Bakterienkulturmedien wurden vor Verwendung für 15 min. bei 115°C autoklaviert.

#### 4.1.7 Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Columbia Agar Platten	Anzucht von <i>S.p.</i>	BD Mikrobiologie
Erythromycin 1 mg/ml in Ethanol	Selektionsantibiotikum für R6xΔply	Sigma
Sterile Watteträger	Überführen von Bakterien	Applied SA
Einmal Impfösen 10 µl	Ausplattieren von Bakterien	Roth

#### 4.1.8 Stimulantien, Inhibitoren und Enzyme

Stimuli	Ursprung	Bezugsquelle
ODN M362	CpG Typ C	InvivoGen
Lipopolysaccharid (LPS)	Salmonella enterica	Sigma
MALP-2	Synthetisch	Alexis Biochemicals
Inhibitor	Spezifität gegen	Bezugsquelle
ODN TTAGGG	Humanen TLR9	InvivoGen
4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2)	Src Tyrosinkinase	Biosource
4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d]	Negativ Kontrolle für PP2	Calbiochem

pyrimidin (PP3)

SB202190	p38 MAPK	Calbiochem
U0126	ERK	Calbiochem
SP600125	JNK	Calbiochem
IKK-NBD	IKK Untereinheit NEMO	Biomol

Enzyme	Verwendungszweck	Bezugsquelle
Red Taq Polymerase	Vermehrung der cDNA	Sigma
MMLV Reverse Transkriptase	Generierung von cDNA aus RNA	Promega
HotStarTaq Polymerase	cDNA-Vermehrung	Qiagen
RNasin	RNase-Inhibitor	Promega

#### 4.1.9 small interfering RNA (siRNA) Sequenzen

siRNA	Sequenz	Bezugsquelle
MyD88	Sense GGAGGAUUGCCAAAAGUAUtt	Ambion
	Antisense AUACUUUUGGCAAUCCUCctc	
KLF4	Sense CCUGGCGCCCUACCUCGGtt	Ambion
	Antisense CCGAGGUAGGGGCGCCAGGtt	
Kontrolle	Sense UUCUCCGAACGUGUCACGUtt	Ambion
	Antisense ACGUGACACGUUCGGAGAAtt	

#### 4.1.10 Primer

Gen	Sequenz	Bezugsquelle
<b>PCR-Primer</b>		
GAPDH	Fw 5'-CCACCCATggCAAATTCCATggCA	TIB MOLBIOL
	Rv 5'-TCTAgACggCAggTCaggTCCACC	
IL-10	Fw 5'-TgTTgCCTggTCCTCCTgA	TIB MOLBIOL
	Rv 5'-AAgAAATCgATgACAgCgCC	
MyD88	Fw 5'-ACACAaggTggCggCCgACT	TIB MOLBIOL
	Rv 5'-AgCAgATgAAggCATCgAAAC	
<b>Promoterprimer</b>		
IL-10	Fw 5'-AggggAAgTAgggATaggTA	TIB MOLBIOL
	Rv 5'-AgAgACTggCTTCCTACAgg	

#### 4.1.11 Primäre und sekundäre Antikörper und rekombinante Proteine für den Western Blot

Primärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
KLF4	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz
ERK2	Maus	1:1000	Santa Cruz
Interleukin-10	Kaninchen	1:5000	Biozol
Actin	Ziege	1:1000	Transd. L.
COX2	Ziege	1:1000	Santa Cruz
KLF2	Ziege	1:500	Santa Cruz

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
anti-Kaninchen Cy 5.5	Ziege	1:2000	Rockland
anti-Maus IRDye 800	Ziege	1:2000	Rockland
anti-Ziege IRDye 800	Esel	1:2000	Rockland

Rekombinante Proteine	Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
Rekombinantes IL-10	Human	50 µg/ml	R&D Systems
Pneumolysin	<i>S.p.</i>	Variabel	T.J. Mitchell

#### 4.1.12 Puffer, Lösungen und Gele

IL-10 ELISA Puffer	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b>Carbonatpuffer 0,1 M, pH 9,5</b>		
Natriumhydrogencarbonat	4,2 g	Merck
Natriumcarbonat	1,75 g	Merck
A. bidest. ad	500,00 ml	
<b>Blockpuffer</b>		
Dulbeccos PBS 1x	45,00 ml	PAA
FCS	5,00 ml	Gibco
<b>Waschpuffer</b>		
Dulbeccos PBS 1x	1000,00 ml	PAA
Tween20	0,05 %	Sigma

<b>PCR-Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>PCR-Lysepuffer</b>		
RLT-Puffer	1,00 ml	Qiagen
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,01 %	Sigma
<b>TAE Puffer, pH 8,0</b>		
Tris Base	4,84 g	Sigma
Eisessig 100 %ig	1,14 ml	Merck
EDTA 0,5 M	2,00 ml	Roth
A. bidest. ad	1000,00 ml	
<b>ChIP- Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Fixierlösung</b>		
Dulbeccos PBS 1x	40 ml	PAA
Formaldehyd	1 %	Sigma
<b>RIPA-Puffer</b>		
NaCl	10 ml	Merck
Tris pH 7,5	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Roth
Nonidet®p-40 (99 %ig)	1 %	Fluka
Desoxycholat (97 %ig)	1 %	Sigma
Aprotinin	15 $\mu$ M	Sigma
<b>High-Salt-Puffer</b>		
2M NaCl	10 ml	Merck
Tris pH 7,5	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Roth
Nonidet®p-40 (99 %ig)	1 %	Fluka
Desoxycholat (97 %ig)	0,5 %	Sigma
<b>TE-Puffer</b>		
Tris pH 7,5	10 mM	Sigma
EDTA	1 mM	Roth
A. bidest. Ad	500 ml	
<b>Eluierungspuffer</b>		
Tris pH 7,5	10 mM	Sigma

EDTA	1 mM	Roth
SDS (10 % w/v)	1 %	Serva
A. bidest. Ad	20 ml	

Western Blot-Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Bezugsquelle
<b>Phosphoproteinwaschpuffer</b>		
Natriumorthovanadat 98 %ig 200 mM	5,00 ml	Sigma
Natriumpyrophosphat 150 nM	50,00 ml	Sigma
Natriumfluorid 99 %ig 1 M	50,00 ml	Sigma
Dulbeccos PBS 1 x ad	500,00 ml	PAA
<b>Western Blot Lysepuffer</b>		
Tris-HCl, pH 7,4	50,00 mM	Sigma
EDTA	0,25 mM	Roth
PMSF	1,00 mM	Sigma
Antipain, Leupeptin, Pepstatin	à 10,00 µg/ml	Sigma
Nonidet® P-40 99 %ig	1,00 %	Fluka
Phosphoproteinwaschpuffer ad	1,00 ml	
<b>Bradford Reagenz</b>		
BioRad Protein Assay	20,00 %	BioRad
A. bidest.	80,00 %	
<b>Gelladepuffer (Blaupuffer)</b>		
Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	1,00 ml	Sigma
Glycerol	0,80 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	1,60 ml	Serva
Bromphenolblau (1 % w/v)	0,40 ml	Pharmacia Biotech
β-Mercaptoethanol (1 % w/v)	0,40 ml	Sigma
A. bidest. Ad	5,00 ml	
<b>Gelelektrophoresepuffer</b>		
Tris-Base	3,00 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merck
SDS (10 % w/v)	1,00 g	Serva
A. bidest. Ad	1000,00 ml	

### **Blotpuffer**

Tris-Base	3,00 g	Sigma
Glycin	14,40 g	Merck
Methanol	20,00 %	Merck
A. bidest. Ad	1000,00 ml	

### **Odyssey-Blockpuffer**

Ody Blocking Puffer	50,00 %	LI-COR
Dulbeccos PBS 1x	50,00 %	PAA

### **Ponceau-S-Proteinfärbung**

Ponceau S	1,00 g	Sigma
Essigsäure 100 %ig	50,00 ml	Merck
A. bidest. ad	1000,00 ml	

<b>Western Blot-Gele</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<b>Sammelgel</b>		
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	2,50 µl	Sigma
SDS (10 % w/v)	100,00 µl	Serva
40 %iges Bis-Acrylamid, Ratio 19:1	1,33 ml	Serva
TEMED	10,00 µl	R&D Systems
Ammoniumpersulfat 10 %ig	50, 00 µl	Serva
A. bidest. Ad	10,00 ml	
<b>Trenngel 10 %ig</b>		
Tris-HCl 0,5 M, pH 8,8	2,50 ml	Sigma
SDS (10 % w/v)	100,00 µl	Serva
40 %iges Bis-Acrylamid, Ratio 19:1	3,35 ml	Serva
TEMED	10,00 µl	R&D Systems
APS 10 %ig	3,35 ml	Serva
A. bidest. ad	10,00 ml	

### **4.1.13 Geräte**

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

Produkt	Verwendungszweck/Methode	Bezugsquelle
BioRad Gelelektrophorese System	Gelelektrophorese (Western Blot)	BioRad
BlotSystem	Proteintransfer (Western Blot)	Transblot
Odyssey Scanner	Dokumentation (Western Blot)	LI-COR
Platereader	Auslesen der ELISA Platten	STL
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Durchführung der RT-PCR	MJ Research
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera (PCR/ ChIP)	Olympus
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Olympus Kamera	
FFX-20M GIBCO UV Transluminator	Darstellung der Banden im PCR Gel	Life Technologies

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden unter Einhaltung steriler Bedingungen an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt. Das Arbeiten mit den Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien und Geräten bzw. sterilfiltrierten Lösungen. Die Kultivierung aller in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

#### 4.2.1.1 Kultivierung und Passagierung von BEAS-2B-Zellen

Die Kultivierung der BEAS-2B-Zellen erfolgte in den Zellkulturflaschen T<sub>75</sub>. Das Zellkultumedium wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Passagierung der BEAS-2B-Zellen erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens nach ca. drei- bis viertägiger Kultivierung im Brutschrank. Für die Passagierung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen in der Zellkulturflasche mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 ml Trypsin/EDTA und anschließender fünf-minütiger Inkubation bei 37°C. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min. bei 172 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 200 µl Trypsin-Inhibitor resuspendiert, anschließend frisches Zellkulturmedium hinzugegeben und die Zellen im Verhältnis 1:3 auf die neuen Zellkulturflaschen oder Lochplatten ausgesät. Vor der Passagierung der BEAS-2B-Zellen wurden die neu benötigten

Zellkulturflaschen und Lochplatten mit ausreichend Adhäsionsflüssigkeit für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die restliche Flüssigkeit wurde nach der Inkubation wieder abgenommen.

#### **4.2.1.2 Kultivierung und Passagierung von HEK293-Zellen**

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in den Zellkulturflaschen T<sub>75</sub>. Das Zellkultumedium wurde alle drei Tage gewechselt. Die Passagierung der HEK293-Zellen erfolgte nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens nach ca. drei- bis viertägiger Kultivierung im Brutschrank. Für die Passagierung wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen in der Zellkulturflasche mit 10 ml PBS<sup>-/-</sup> vorsichtig gewaschen. Mit weiteren 10 ml PBS<sup>-/-</sup> wurden die Zellen abgespült, in PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension für 5 min. bei 172 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 auf die jeweiligen neuen Zellkulturflaschen oder Lochplatten verteilt.

#### **4.2.1.3 Kultivierung und Passagierung von SAE-Zellen**

Bei SAE-Zellen handelt es sich um primäre Zellen, die nicht passagiert werden können. Daher wurden diese Zellen direkt nach dem Auftauen gezählt und in die für die jeweiligen Stimulation vorgesehenen Zellkulturschalen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte im SAB Medium/BulletKit inklusive Wachstumssupplementen. Der Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen. Nach ca. 10-12 Tagen hatten die Zellen einen konfluenten Zellrasen ausgebildet und konnten für die Stimulation verwendet werden.

#### **4.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zur Kryokonservierung von BEAS-2B- und HEK293-Zellen wurde zunächst vorgegangen wie bei der Passagierung der Zelllinien beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit 1 ml Kryokonservierungsmedium für die entsprechenden Zelllinien suspendiert und in 1 ml fassende Kryokonservierungsröhrchen überführt. Um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrierprozess zu vermeiden, wurden die Kryoröhrchen zunächst für fünf Stunden auf -20°C und für 15 Stunden auf -80°C heruntergekühlt, bevor die Umlagerung zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) erfolgte. Zum Auftauen wurde das Kryokonservierungsröhrchen aus dem Stickstofftank in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt.

Anschließend wurden die Zellen in ihrem jeweiligen Zellkulturmedium resuspendiert, in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 min bei 172 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet vorsichtig in frischem 10 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine neue Zellkulturflasche verteilt. Der erste Mediumwechsel erfolgte am folgenden Tag.

#### **4.2.1.5 Zellstimulation und der Einsatz von Stimulantien, Inhibitoren und Kontrollen**

Zur Stimulation der Zelllinien mit den Pneumokokkenstämmen, Stimulantien oder chemischen Inhibitoren wurde die jeweilige Zelllinie in die benötigte Lochplatte passagiert und bis zur Ausbildung eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Am Stimulationstag wurde die gewünschte Konzentration des Stimulans bzw. die gewünschte Pneumokokkenkonzentration nach Anzucht (s.u.) durch Verdünnung in dem Stimulationsmedium eingestellt und für die jeweilige Stimulationsdauer auf die Zellen gegeben. Die chemischen Inhibitoren wurden in allen Versuchen zwei Stunden, die MAPK Inhibitoren 30 Minuten vor der Stimulation in der jeweiligen Konzentration auf die Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurde zugleich das entsprechende Stimulationsmedium eingesetzt. Die nach der Zellstimulation erfolgte Probengewinnung wird bei den jeweiligen molekularbiologischen bzw. biochemischen Methoden beschrieben.

#### **4.2.1.6 Aufbereitung der Mauslungenproben aus dem *in vivo* Mauspneumoniemodell**

Die im Flüssigstickstoff schockgefrosteten Mauslungen wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank mechanisch homogenisiert und in Western Blot-Lysepuffer suspendiert. Um größere Zellstrukturen aufzubrechen, wurden die Lysate zusätzlich mit Ultraschall für 6 x 3 Sekunden bei 50 % Power behandelt.

### **4.2.2 Mikrobiologische Methoden**

#### **4.2.2.1 Bakterienkultur**

Die Anzucht und das Arbeiten mit den *Streptococcus pneumoniae* Stämmen erfolgte an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Raumwerkbank. Alle

benötigten Materialien und Geräte wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert bzw. heißluftsterilisiert. Kontaminierte Geräte und Materialien wurden im Anschluss mit Descosept (Dr. Schumacher GmbH) desinfiziert und anschließend autoklaviert. Die Lagerung der Pneumokokkenstämme erfolgte in einem Kryokonservierungsmedium bei -80°C.

#### **4.2.2.2 Zellstimulation mit den Pneumokokkenstämmen R6x und R6xΔply**

Alle Zellstimulationen in dieser Arbeit wurden durchgehend mit Pneumokokken aus einem zuvor angelegten Stock durchgeführt. Am Vorabend der Stimulation wurde der jeweilige Pneumokokkenstamm auf Columbiaagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Bei der Anzucht des Pneumokokkenstammes R6xΔply wurde als Selektionsantibiotikum zusätzlich 40 µl des 1 mg/ml Erythromycins in Ethanol auf die Columbiaagarplatten aufgetragen. Am folgenden Morgen wurden einzelne Bakterienkolonien in vorgewärmte Todd Hewitt Bouillon (mit 0,5 % Hefe supplementiert) überführt. Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde bei einer optischen Dichte (OD) von 600 nm (OD<sub>600</sub>) die optimale Startkonzentration von 3-6 x 10<sup>7</sup> cfu/ml eingestellt (entspricht OD<sub>600</sub> 0,03-0,06). Die Inkubation im Brutschrank erfolgte bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis sich eine optimale Stimulationskonzentration von 2-4 x 10<sup>8</sup> cfu/ml (entspricht OD<sub>600</sub> 0,2-0,4) eingestellt hatte. Bei dieser Konzentration befinden sich die Pneumokokken in einer mittleren logarithmischen Wachstumsphase, in welcher sie optimale Infektionseigenschaften besitzen. Die Pneumokokken wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 1800 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet vorsichtig in dem der jeweiligen Zelllinie entsprechenden Stimulationsmedium so resuspendiert, dass sich eine Konzentration von 1 x 10<sup>8</sup> cfu/ml eingestellt hatte. Für die Stimulation der entsprechenden Zelllinie wurde die gewünschte Pneumokokkenkonzentration durch Verdünnung in dem Stimulationsmedium eingestellt.

#### **4.2.2.3 Aufreinigung von bakterieller DNA aus *S.p.* R6x und humaner DNA aus BEAS-2B-Zellen**

Für die Aufreinigung der bakteriellen DNA aus dem Pneumokokkenstamm R6x erfolgte die Anzucht der Bakterien zunächst wie im obigen Abschnitt 4.2.2.2 beschrieben. Die Bakterien wurden bei 1 x 10<sup>9</sup> cfu/ml eingestellt, was einer OD von 1 bei 600 nm entspricht. Die Pneumokokken wurden anschließend in 50 ml Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei 1800 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellet 2x mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Für die Aufreinigung der humanen DNA aus BEAS-2B-Zellen wurden die Zellen bis zur Ausbildung

eines konfluenten Zellrasens kultiviert. Die Ablösung der Zellen aus den Zellkulturschalen erfolgte wie unter dem Punkt Passagierung im obigen Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 200 µl Trypsin-Inhibitor resuspendiert, mit PBS<sup>-/-</sup> aufgefüllt, nochmals zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für die weitere DNA Aufreinigung verwendet.

Die eigentliche Aufreinigung der bakteriellen und humanen DNA erfolgte mit dem QIAamp DANN Mini Kit (Cat. Nr.:51304) der Firma Qiagen und wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt gemäß dem Herstellerprotokoll werden die Pellets in TE Puffer resuspendiert und die Lichtabsorption im Spektralphotometer bei OD<sub>260nm</sub> gemessen. Dazu wurden 2 µl der DNA Probe mit 198 µl A. bidest. vermischt und gegen einen Leerwertabgleich (200 µl A. bidest.) gemessen. Der DNA-Gehalt wurde mit folgender Formel errechnet: OD<sub>260nm</sub> x 5 = DNA [µg/µl]. Aus dem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> wurde die Verunreinigung mit Proteinen errechnet. Die aufgereinigte DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -20° C gelagert.

## **4.2.3 Molekularbiologische Methoden**

### **4.2.3.1 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

#### RNA-Extraktion und Reverse Transkription

Nach der Zellstimulation wurde der Stimulationsüberstand abgenommen und die Zellen pro Vertiefung einer 12-Lochplatte mit 350 µl PCR-Lysepuffer lysiert. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit und wurde nach dem Herstellerprotokoll der Firma Qiagen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung für RNA erfolgte analog wie in Abschnitt 4.2.2.3 für DNA beschrieben. Durch die Multiplikation der Absorption mit dem Faktor vier wurde die RNA Konzentration [µg/µl] in der jeweiligen Probe errechnet. Anschließend wurden die RNA-Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren. Für die Reverse Transkriptase Reaktion wurde pro Ansatz 1 µg RNA eingesetzt. Das zum Endvolumen von 10 µl fehlende Volumen wurde mit RNase freiem Wasser aufgefüllt sowie 10,5 mM dNTP's und 10 ng/ml Hexamer-Primer je Probenansatz hinzugegeben. Die Denaturierung der RNA erfolgte für 5 min. bei 65°C. Bei Zugabe des Mastermixes wurden die Proben auf Eis gestellt und zu einem Gesamtvolumen von 20 µl dem Ansatz 1/5 Vol 5x M-MLV Puffer, 1/10 vol DTT (0,1 M) und 40 U RNasin hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation von 2 min. bei 37°C wurde dem Ansatz 200 U M-MLV RT hinzugefügt. Die Umschreibung der RNA auf cDNA erfolgte bei 37°C für 50

min. und bei 70°C für 15 min., gefolgt von der abschließenden Herunterkühlung auf 4°C. Die cDNA wurde mit 80 µl A. bidest. aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

#### Polymerasekettenreaktion und Gelelektrophorese:

Für die sich anschließende Amplifizierung der DNA wurde je Probe 5 µl cDNA eingesetzt und mit jeweils 15,5 µl Aqua tridest, 2,5 µl Ammonium-PCR-Puffer (10x), 0,5 µl Nukleotide (dNTP, 10 mM), jeweils 0,25 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (0,5 µg/ml) sowie 1 µl Taq-Polymerase versetzt. Entsprechend des linearen Amplifikationsbereiches des Fragmentes schließen sich 20 bis 35 Zyklen mit folgendem Ablauf an: Denaturierung 30 sec. bei 94°C, Hybridisierung der Primer an das Template bei Primer-spezifischer Temperatur (s.u. PCR Konditionen) für 2 min. und DNA-Synthese bei 72°C für 2 min. mittels Taq-Polymerase. Die finale Extension erfolgte bei 72 °C für 5 min.. Um die gleichmäßige Beladung mit RNA in jedem Experiment zu sichern, wurden alle Ansätze auf die jeweilige Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)-mRNA Expression untersucht.

#### PCR-Konditionen:

PCR-Primer	Annealingtemperatur	Zyklen
GAPDH	60°C	20
IL-10	59°C	34
MyD88	68°C	30

Nach der Amplifizierung wurden die PCR Produkte in einem 1,5 %igen- Agarosegel in 1x TAE Puffer aufgetrennt. Dafür wurde 1,5 g Agarosepulver der Firma Promega mit 100 ml 1x TAE Puffer vermischt, aufgeköcht und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid der Firma Sigma versetzt. Nach 20-30 min. wurden auf das nun auspolymerisierte Agarosegel die Proben inklusive eines DNA-Längenstandards in die Taschen des Gelkammes aufgetragen und eine Spannung von 100 V an die Gelelektrophoresekammer angelegt. Mittels UV-Transilluminator und Kamera wurde das Ergebnis nach ca. 30 min. dokumentiert.

#### **4.2.3.2 Transfektion von small interfering RNA (siRNA)**

HEK293- und BEAS-2B-Zellen wurden mit dem Transfektionsreagenz AtuFECT01 transfiziert. Dieses Transfektionsreagenz ist kommerziell nicht erhältlich und wurde der Arbeitsgruppe freundlicherweise von der Firma Silence Therapeutics AG, Berlin, Germany zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben in die entsprechenden Lochplatten passagiert.

Die Transfektion erfolgte bei HEK293-Zellen ca. eine Stunde und bei BEAS-2B-Zellen 24 Stunden nach der Passagierung. Die siRNA wurde standardmäßig in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Es wurde ein Ansatz im Verhältnis 97:2:1 aus Blankmedium, AtuFECT01 und der entsprechenden siRNA angesetzt. Der Ansatz wurde für 20 min. bei 37°C inkubiert und anschließend zu den zu transfizierenden Zellen gegeben. 24 Stunden vor der Stimulation wurde der Überstand abgenommen, einmal mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen und frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden Zellen nach gleichem Schema mit einer Kontroll siRNA transfiziert.

#### **4.2.3.3 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist ein experimentelles Verfahren in der Molekularbiologie mit dem Ziel festzustellen, ob Transkriptionsfaktoren an bestimmte DNA-Promoterabschnitte binden. Die Stimulation der Zellen mit dem jeweiligen Stimulus erfolgte in T<sub>75</sub> Zellkulturflaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 10 ml warmer Formaldehydlösung 1 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Fixierlösung wieder abgesaugt und mit 10 ml kaltem 0,125 M Glycin neutralisiert und nach dem Absaugen kaltes, steriles PBS<sup>-/-</sup> auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden mechanisch abgeschabt, in PBS<sup>-/-</sup> aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. In einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge wurden die Zellen bei 252 g 5 min. lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Zellpellet erneut in 10 ml kaltem PBS<sup>-/-</sup> gelöst und bei 252 g 5 min. lang zentrifugiert. Nach diesem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 2 ml ChIP-RIPA Puffer gelöst und auf Eis 4 x 1 min. sonifiziert (Sonde Bandelin Sonoplus, Power 50 %). Nach jedem Sonifizierungsschritt erfolgte mindestens eine Pause von 1 min.. Um verbleibende Zelltrümmer zu entfernen, wurden die sonifizierten Zelllysate anschließend noch einmal 20 min. bei 4°C und 21.530 g zentrifugiert, aliquotiert und für die nachfolgende Immunpräzipitation bzw. als Inputkontrolle bei -80°C weggefroren. Bei der Immunpräzipitation wurden die entsprechenden Antikörper in der jeweiligen Verdünnung dem Lysat hinzugegeben und über Nacht bei 4°C in einem Drehinkubator inkubiert. Am folgenden Morgen wurde dem Lysat zur Bindung des Antikörper-Proteinkomplexes 100 µl Beadmischung (je 20 µl Protein A und G gekoppelt an Agarose (Firma Santa Cruz) plus 60 µl ChIP-RIPA Puffer) hinzugegeben und eine Stunde bei 4°C auf dem Drehinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Beads bei 4°C und 21.530 g für 1 min. herunterzentrifugiert. Es folgten in der Reihenfolge zwei Waschschriffe mit ChIP-RIPA-Puffer, ein Waschschriff mit High-Salt-Puffer, ein Waschschriff mit ChIP-RIPA-

Puffer und die Aufnahme in TE-Puffer. Nach jedem Waschschrift wurde das Lysat bei 21.530 g 1 min. lang bei 4°C zentrifugiert und nachfolgend der Überstand vorsichtig abgesaugt. Durch Zugabe von 55 µl Eluierungspuffer und Erwärmung in einem Heizschüttler (15 min., 30°C, 1200 rpm) wurden die Immunkomplexe von den Agarosebeads wieder abgetrennt und nachfolgend 50 µl des Überstandes abgenommen und mit 150 µl TE-Puffer versetzt. Zur DNA-Isolierung wurde dem Lysat RNase (0,05 µg/µl) (30 min. Inkubation bei 37°C) und ProteinaseK (0,5 µg/µl) (sechs Stunden Inkubation bei 37°C) hinzugegeben. Anschließend erfolgte ein sechsstündiger Verdau im Thermocycler (Peltiert MJ Research) bei 65°C. Mit Hilfe des PCR Purification Kits (Firma Qiagen) wurde die DNA aufgereinigt und zur anschließenden Amplifizierung der Promoter-DNA die HotStarTaq Polymerase (Firma Qiagen) eingesetzt. Die Amplifizierung im Thermocycler erfolgte nach folgendem Schema: Vordenaturierung (15min., 95°C), Denaturierung (20 sec., 94°C), Annealing (20 sec., bei 64°C, der Promoterprimer spezifischer Annealingtemperatur) und Elongation (20 sec., 72°C), der 38x wiederholt wurde und abschließend eine finale Elongation (7 min., 72°C).

#### ChIP-PCR Konditionen:

Promoterprimer	Annealingtemperatur	Zyklen
IL-8	62°C	32
IL-10	64°C	38
KLF4	67°C	35

Die PCR Produkte wurden mit 10 µl OrangeG Ladepuffer versetzt, im Agarosegel bei 100 V für 30 min. aufgetrennt und anschließend mittels UV-Transilluminator und Kamera dokumentiert.

## **4.2.4 Biochemische Methoden**

### **4.2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Nach der Zellstimulation wurde der Überstand nach 24 Stunden abgenommen und die Konzentration von Interleukin-10 mittels eines Enzym-gekoppelten Immunoabsorptionstests der Firma BD Bioscience ermittelt. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde nur 50 % der Konzentration des Standard IL-10 eingesetzt. Die Durchführung des ELISAs erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und wird hier nicht weiter ausgeführt. Die ELISA-Platten wurden bei 450 nm im Platereader der Firma STL dokumentiert und mit Hilfe des Programms PRISM5.0 (Graph Pad Prism) ausgewertet.

#### 4.2.4.2 Laktatdehydrogenase (LDH) -Assay

Beschädigte oder tote Zellen setzen aufgrund ihrer beschädigten Zellmembran das sonst strikt intrazelluläre Enzym Laktatdehydrogenase frei. Die Messung der LDH erfolgte mit dem *Cytotoxicity Detection Kit* der Firma Roche Diagnostics, Mannheim. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers und soll hier nicht weiter aufgeführt werden. Zur LDH Bestimmung wurden jeweils 100 µl des Kulturüberstandes nach der Zellstimulation in eine 96-Loch Platte überführt und zu jedem Ansatz 100 µl des Reaktionsmixes aus dem *Cytotoxicity Detection Kit* hinzugefügt. Die ELISA-Platten wurden nach 20-minütiger abgedunkelter Inkubation bei 450 nm im Platerader der Firma STL dokumentiert und mit Hilfe des Programms PRISM5.0 (Graph Pad Prism) ausgewertet.

#### 4.2.4.3 Western Blot

Die Proteinextraktion erfolgte auf Eis. Nach der Zellstimulation wurde der Überstand abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Der Puffer wurde sorgfältig abgesaugt und eiskalter Western Blot Lysepuffer auf die Zellen pipettiert. Mit einem Schaber wurde der Zellrasen von der Oberfläche abgelöst, im Western Blot Lysepuffer aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge wurden die Reaktionsgefäße 10 min. bei 25.000 g zentrifugiert.

Nach der Proteinbestimmung nach Bradford wurden 80 µg Protein (bei IL-10 160 µg) 1:2 mit dem Gelladepuffer versetzt und 5 min. bei 95°C unter Schütteln in einem Wärmeblock gekocht. Zwischenzeitlich wurde als Vorbereitung auf die Proteinauftrennung das 10 %ige Trenngel und nach Auspolymerisierung das Sammelgel gegossen, die Gelhalterungen in der Kammer montiert und die gesamte Kammer mit ausreichend Gelelektrophoresepuffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Auftragung der vorbereiteten Proben in die Taschen des Sammelgels. Ein mitaufgetragener Proteinmarker (Full Range Rainbow RPN800, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) diente zur Überwachung des Auftrennprozesses und zur Identifizierung der Höhe der Banden bei der späteren Antikörperanfärbung.

Die Western Blot Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben bei 25 mA/Gel bis zum Austritt des Gelladepuffers ca. 90 min. lang aufgetrennt. Nach dem Auftrennprozess wurde das Trenngel mit den nun nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteinen zum Proteintransfer auf eine Hybond-Membran zu einem Sandwich zusammengebaut. Ein solcher Sandwich besteht in der Reihenfolge aus einem Schwämmchen, zwei Lagen Whatman-Filterpapier, der Hybond-Membran, Trenngel, zwei Lagen Whatman-Filterpapier und

einem weiteren Schwämmchen. Zwei solcher Sandwiche wurden mit einem Kühlakkumulator in einer Blotkammer installiert und mit zuvor gekühltem Blotpuffer aufgefüllt. Die Blotkammer wurde auf einem Magnetrührer für 60 min. bei 100 V an eine Spannungsquelle angeschlossen. Nach dem Blotprozess wurden die Proteine auf der Blotmembran orientierend mit Ponceau-S angefärbt und nach dem Entfärben mit A. bidest für eine Stunde bei Raumtemperatur in Odyssey-Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Blotmembran mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Der primäre Antikörper (Konzentration siehe Material) wurde 5 min. in Odyssey-Blockpuffer + 0,1 % Tween20 angesetzt. Nach der Inkubation erfolgten drei Waschschrte mit PBS + 0,1 % Tween20. Die sekundären Antikörper wurde je 1:2000 in Odyssey-Blockpuffer + 0,1 % Tween20 angesetzt. Die Inkubation erfolgte abgedunkelt eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgten zwei Waschschrte à 5 min. mit PBS + 0,1 % Tween20 sowie ein finaler Waschschrte mit PBS<sup>-/-</sup>. Mit einem Scanner von Li-COR wurden die Blotmembranen bei 700 nm und 800 nm Kanal gescannt. Die Auswertung der Scans erfolgte mit der Software Odyssey Version 2.0.

#### **4.2.5 Statistik**

Die gezeigten Daten sind als Mittelwert der Standardabweichung von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des „One way ANOVA“ und dem Newmann Keuls post Test. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ( $p < 0,05$ ) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Balkendiagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Mittelwertabweichungen und Signifikanzen wurde das Programm PRISM5.0 (Graph Pad Prism) verwendet. Für die Abbildungen von Western Blot Analysen, PCRs und ChIPs wurden repräsentative Gele aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit gleichem Ergebnis gewählt.

## 5. Ergebnisse

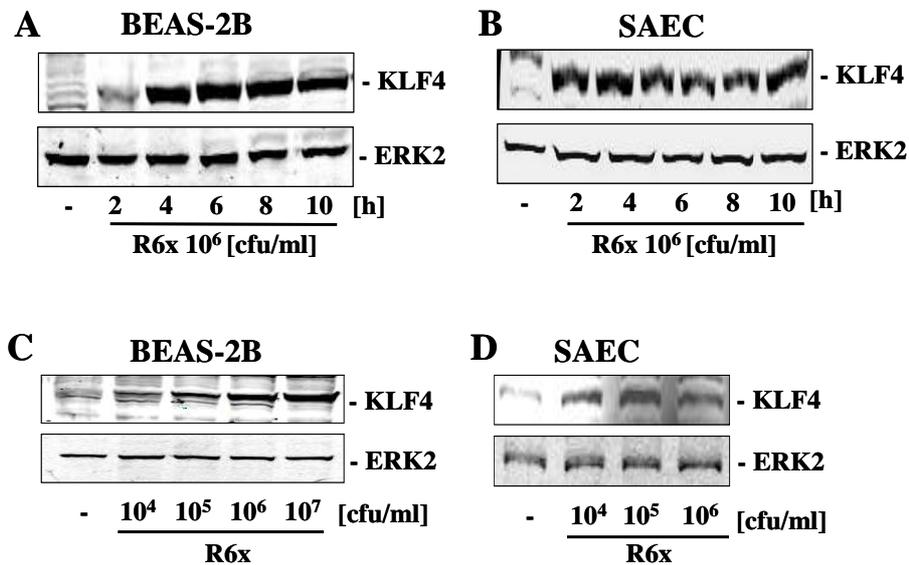
### 5.1 *S. pneumoniae* induziert TLR9-abhängig den Transkriptionsfaktor KLF4 in humanen Bronchialepithelzellen

KLF4 gehört zur Gruppe der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren. Neben einer wichtigen Rolle bei der Differenzierung und Regulation des Zellzyklus (Alder et al., 2008) indiziert eine Studie von Feinberg et al. und Liu et al., dass der epithelspezifische Transkriptionsfaktor KLF4 auch eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen spielen könnte (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2007). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob der Transkriptionsfaktor KLF4 auch bei der Infektion von humanen Bronchialepithelzellen mit *S. pneumoniae* induziert wird sowie welche Rezeptoren und Signalwege an dieser Induktion beteiligt sind.

#### 5.1.1 *S. pneumoniae* induziert zeit- und dosisabhängig die KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen

Zunächst wurde untersucht, ob *Streptococcus pneumoniae* in humanen Epithelzellen die KLF4 Expression induziert. Dafür wurden BEAS-2B- und SAE-Zellen mit der unbekapselten Pneumokokkenmutante R6x des Wildtyps D39 (Serotyp 2) für zwei bis zehn Stunden in einer Konzentration von  $10^6$  cfu/ml stimuliert. Die Expression des Transkriptionsfaktors KLF4 wurde nach anschließender Proteinextraktion mit einem KLF4-spezifischen Antikörper im Western Blot dokumentiert. Die Abbildung 5A-B zeigen, dass der Pneumokokkenstamm R6x zeitabhängig sowohl in BEAS-2B-Zellen (Abbildung 5A), als auch in SAE-Zellen (Abbildung 5B) die KLF4 Expression induzierte. Beide Zelllinien zeigten im unstimulierten Leerwert nur eine geringe basale Expression von KLF4 auf Proteinebene. In *S.p.*-infizierten BEAS-2B-Zellen kam es nach vierstündiger Stimulation im Vergleich zum Leerwert zu einer deutlichen Steigerung der KLF4 Expression, die sich bis 10 Stunden *post infectionem* auf einem quantitativ ähnlichen Niveau hielt (Abbildung 5A). Auch in SAE-Zellen zeigte sich bereits nach vierstündiger Stimulation mit *S.p.* eine KLF4 Induktion. Eine maximale KLF4 Expression war hier nach acht bis zehn Stunden zu beobachten (Abbildung 5B). Des Weiteren sollte der dosisabhängige Effekt von *S.p.* auf die Induktion von KLF4 untersucht werden. Dafür wurden BEAS-2B- und SAE-Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x in Konzentrationen von  $10^4$  bis  $10^7$  cfu/ml bzw.  $10^4$  bis  $10^6$  cfu/ml für acht Stunden stimuliert und die KLF4 Expression auf Proteinebene im Western Blot dokumentiert.

Die Abbildung 5C-D zeigen eine dosisabhängige Induktion von KLF4 in BEAS-2B- (Abbildung 5C) und SAE-Zellen (Abbildung 5D) nach achtstündiger Stimulation mit *S.p.* R6x. Dabei wurde in BEAS-2B-Zellen eine deutliche KLF4 Expression ab einer Konzentration von  $10^5$  cfu/ml R6x mit einer Zunahme bis  $10^7$  cfu/ml (Abbildung 5C), in SAE-Zellen ab einer R6x Konzentration von  $10^4$  cfu/ml mit einer maximalen Expression ab  $10^5$  cfu/ml erreicht (Abbildung 5D).

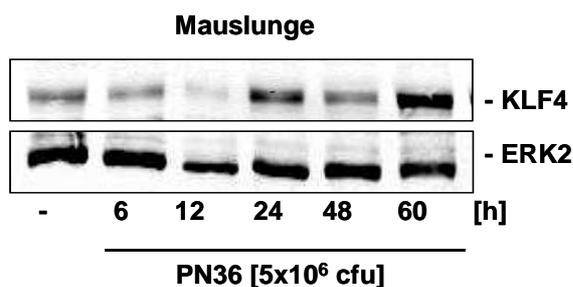


**Abbildung 5A-D: *S.p.* induziert zeit- und dosisabhängig die Induktion von KLF4 in BEAS-2B- und SAE-Zellen**

In Abbildung 5A+B wurden BEAS-2B-Zellen (A) bzw. SAE-Zellen (B) für zwei bis zehn Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert und die Expression von KLF4 auf Proteinebene im Western Blot dokumentiert. In Abbildung 5C+D wurden BEAS-2B-Zellen (C) bzw. SAE-Zellen (D) für acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x in Konzentrationen von  $10^4$  bis  $10^7$  cfu/ml stimuliert und die Expression von KLF4 auf Proteinebene im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung dienten in allen Abbildungen die konstitutiv exprimierten Proteine ERK2. In allen Abbildungen werden jeweils repräsentative Blots aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

### 5.1.2 *S. pneumoniae* induziert die KLF4 Expression in einem *in vivo* Mauspneumoniemodell

Die in humanen Epithelzellen gemachten Beobachtungen sollten zunächst in einem *in vivo* Mausmodell qualitativ verifiziert werden. Dafür wurden weibliche C57BL/6-Mäuse unter leichter Anästhesie intranasal mit dem Pneumokokkenstamm PN36 für sechs bis 60 Stunden infiziert. Anschließend wurden die Lungen explantiert, schockgefroren und homogenisiert. In den Zellysaten von infizierten Tieren und nichtinfizierten Kontrolltieren wurde dann im Western Blot mit einem KLF4 spezifischen Antikörper die KLF4 Expression dokumentiert. Abbildung 6 zeigt, dass sich die KLF4 Expression nach sechs und zwölf Stunden Stimulation weitestgehend auf dem Niveau des unstimulierten Leerwert bewegte. Nach 24 Stunden *post infectionem* zeigte sich eine leichte, nach 60 Stunden *post infectionem* schließlich eine deutliche KLF4 Induktion auf Proteinebene im Vergleich zum Leerwert.



**Abbildung 6: Nachweis der KLF4 Induktion in Pneumokokken-infizierten Mauslungen**

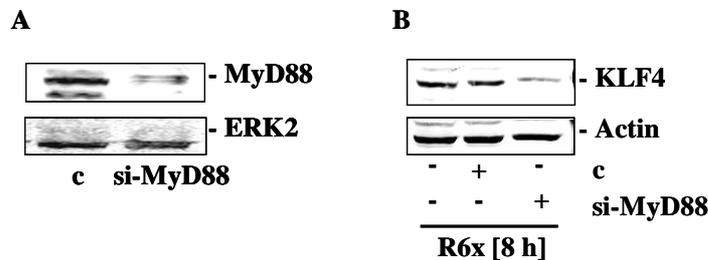
Nach intranasaler Infektion von C57BL/6 Mäusen mit dem Pneumokokkenstamm PN36 für sechs bis 60 Stunden wurden die Lungen explantiert, schockgefroren, homogenisiert und die Expression von KLF4 im Western Blot untersucht. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente konstitutiv exprimiertes ERK2. In der Abbildung

wird ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt.

### 5.1.3 Die *S. pneumoniae*-induzierte KLF4 Expression ist MyD88-abhängig

TLR spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pneumokokken (Santos-Sierra et al., 2006; Schröder et al., 2003). Dabei ist das Adapterprotein MyD88 maßgeblich an der Signaltransduktion der TLRs beteiligt. Um die Annahme zu überprüfen, dass ein TLR an der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression beteiligt ist, wurden BEAS-2B-Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen das Adapterprotein MyD88 für 48 Stunden transfiziert. Als Negativkontrolle wurden BEAS-2B-Zellen mit einer Kontroll siRNA unter gleichen Bedingungen transfiziert. Die Zellen wurden acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x stimuliert und die Expression von KLF4 bzw. MyD88 nach anschließender Proteinextraktion mit einem spezifischen Antikörper im Western Blot dokumentiert. Die Abbildung 7A zeigt zunächst, dass die Transfektion mit der MyD88 siRNA in BEAS-2B-Zellen zu einer deutlichen Hemmung der

konstitutiv exprimierten MyD88 auf Proteinebene im Vergleich zur Transfektion mit der Kontroll siRNA führte. Der Abbildung 7B ist zu entnehmen, dass die Transfektion mit der MyD88 siRNA im Vergleich zur Kontroll siRNA zu einer deutlichen Inhibition der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression in BEAS-2B-Zellen führte.



**Abbildung 7: MyD88 siRNA blockiert die Induktion von KLF4 durch *S.p.* auf Proteinebene**

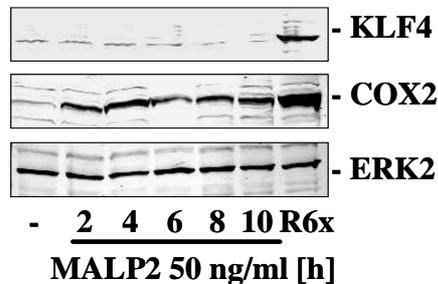
In Abbildung 7A+B wurden BEAS-2B-Zellen mit einer spezifischen MyD88 siRNA und einer Kontroll siRNA (c) je [1 µg/ml] für 48 Stunden transfiziert und im Anschluss für acht Stunden mit R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert. Die MyD88 (A) und KLF4 (B) Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein ERK2 (A) bzw. Actin (B). In beiden Abbildungen werden jeweils repräsentative Blots aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

#### **5.1.4 Die KLF4 Induktion in humanen Bronchialepithelzellen ist TLR2- und TLR4-unabhängig**

Aufgrund der beobachteten MyD88-Abhängigkeit der KLF4-Expression wurde anschließend die Hypothese geprüft, ob TLR bei der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression beteiligt sein könnten. Der TLR2 (Schmeck et al., 2006a; Schröder et al., 2003), TLR4 (Malley et al., 2003) und TLR9 (Albiger et al., 2007) wurden bereits im Rahmen der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie beschrieben. Darüber hinaus wurden der TLR2 (Zhou und Amar, 2007) und der TLR4 (Hamik et al., 2007) bereits im Zusammenhang mit KLF4 in der aktuellen Literatur beschrieben, so dass zunächst untersucht werden sollte, ob diese beiden Rezeptoren an der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression beteiligt sind.

Dafür wurden BEAS-2B-Zellen mit den TLR2 Liganden MALP2 in einer Konzentration von 50 ng/ml für zwei bis zehn Stunden stimuliert und die KLF4 Expression im Western Blot auf Proteinebene detektiert. Als Positivkontrolle für eine KLF4 Induktion wurden BEAS-2B-Zellen parallel mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] für acht Stunden infiziert. Parallel hierzu wurde als Stimulationskontrolle die Cyclooxygenase-2 (COX2) im Gesamtproteinextrakt detektiert. Eine Induktion von KLF4 konnte im Gegensatz zu R6x nach Stimulation mit MALP2 [50 ng/ml] in BEAS-2B-Zellen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die Induktion der

COX2 nach zwei bis zehn Stunden *post infectionem* sowie bei der R6x Positivkontrolle zeigte die Funktionalität des eingesetzten Stimulus und der Positivkontrolle im selben Versuch (Abbildung 8).



**Abbildung 8: MALP2 induziert keine KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen**

In Abbildung 8 wurden BEAS-2B-Zellen mit MALP2 [50 ng/ml] für zwei bis zehn Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion von KLF4 wurden die Zellen mit R6x [ $10^6$  cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein ERK2. Als Stimulationskontrolle

wurde COX2 detektiert. In der Abbildung werden jeweils repräsentative Blots aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

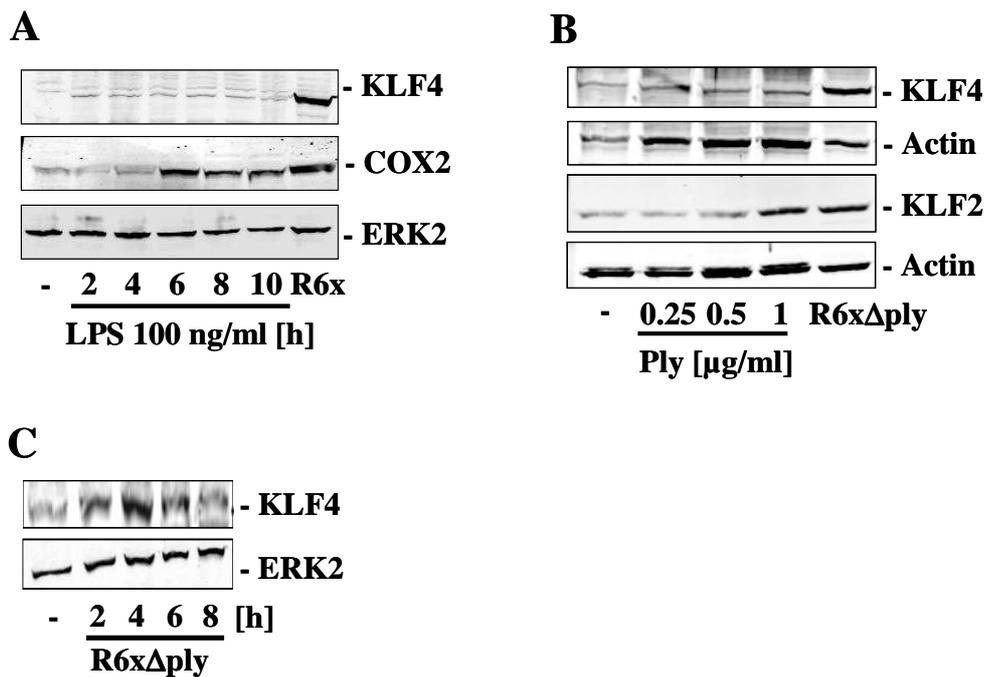
Des Weiteren sollte eine Beteiligung des TLR4 bei der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression untersucht werden. Dafür wurden BEAS-2B-Zellen mit LPS in einer Konzentration von 100 ng/ml für zwei bis zehn Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für eine KLF4 Induktion wurden BEAS-2B-Zellen parallel mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] für acht Stunden infiziert und als Stimulationskontrolle die COX2 detektiert. Die KLF4 Expression wurde auf Proteinebene im Western Blot detektiert. Wie in der Abbildung 9A zu erkennen ist, führte die Stimulation mit LPS [100 ng/ml] zu keinem Zeitpunkt zu einer Induktion der KLF4 Expression und bewegte sich auf dem Niveau des unstimulierten Leerwertes. Eine Induktion der COX2 als Stimulationskontrolle für den eingesetzten Stimulus konnte nach sechs bis zehn Stunden *post infectionem* sowie bei der R6x Positivkontrolle beobachtet werden.

Da das Pneumokokken-eigene Pneumolysin ebenfalls über den TLR4 detektiert wird (Malley et al., 2003; Schreck et al., 2006a), wurden BEAS-2B-Zellen mit aufgereinigtem Pneumolysin in Konzentrationen von 0,25 bis 1  $\mu$ g/ml für acht Stunden stimuliert und als Stimulationskontrolle KLF2 im Western Blot detektiert. Als Positivkontrolle wurde mit der pneumolysinnegativen Mutante R6x $\Delta$ ply in einer Konzentration von  $10^6$  cfu/ml stimuliert. Die KLF4 Expression wurde auf Proteinebene im Western Blot detektiert. Der Abbildung 9B ist zu entnehmen, dass die Stimulation mit Pneumolysin zu keinem Zeitpunkt zu einer KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen führte. Als Stimulationskontrolle führte Pneumolysin in höherer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml zu einer Induktion der KLF2 Expression. Die Stimulation mit dem

Pneumolysin-negativen Stamm R6xΔply führte hingegen zu einer deutlichen KLF2 und KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen.

In einer weiteren Untersuchung wurden HEK293-Zellen, die den TLR2 und TLR4 nicht exprimieren (Hornung et al., 2002), mit der pneumolysinnegativen Mutante R6xΔply in einer Konzentration von  $10^6$  cfu/ml für zwei bis acht Stunden stimuliert und die KLF4 Expression auf Proteinebene im Western Blot detektiert. Wie der Abbildung 9C zu entnehmen ist, zeigte sich hierbei bereits nach vier Stunden eine maximale Induktion der KLF4 Expression, die bis zum acht Stunden Wert wieder langsam auf das unstimulierte Niveau abfiel.

Zusammenfassend konnte aufgrund der Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen unabhängig vom TLR2 und TLR4 ist. Die Tatsache, dass die pneumolysinnegative Mutante R6xΔply in HEK293-Zellen, die den TLR2 und TLR4 nicht exprimieren, eine KLF4 Expression induzierte, unterstreicht die Beobachtungen in humanen Bronchialepithelzellen und gibt gleichzeitig einen Hinweis darauf, dass eventuell der von HEK293-Zellen exprimierte TLR9 an der KLF4 Induktion beteiligt sein könnte.

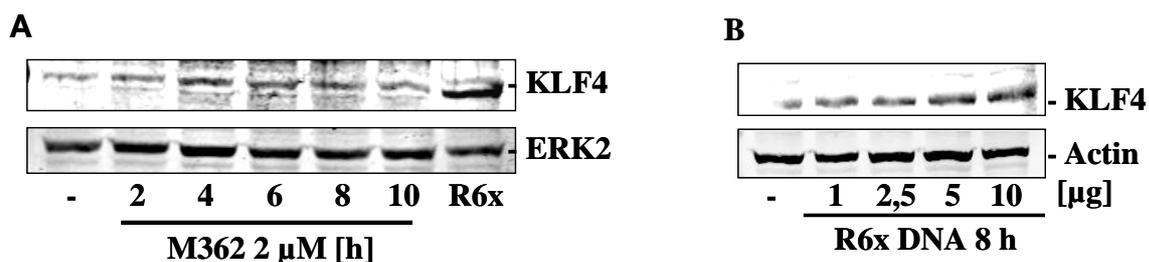


**Abbildung 9A-C: Die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression ist nicht abhängig vom TLR4**

In Abbildung 9A wurden BEAS-2B-Zellen mit LPS [100 ng/ml] für zwei bis zehn Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion von KLF4 wurden die Zellen mit R6x [10<sup>6</sup> cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Als Stimulationsskontrolle wurde COX2 auf der gleichen Membran detektiert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein ERK2. In Abbildung 9B wurden BEAS-2B-Zellen mit Pneumolysin (Ply) [0,25 - 1 µg/ml] für acht Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit der pneumolysinnegativen Mutante R6xΔply [10<sup>6</sup> cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Die KLF4 Expression wurde anschließend im Western Blot dokumentiert. Als Stimulationsskontrolle wurde KLF2 detektiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente jeweils das konstitutiv exprimierte Protein Actin. In Abbildung 9C wurden HEK293-Zellen mit der pneumolysinnegativen Mutante R6xΔply [10<sup>6</sup> cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein ERK2. In den Abbildungen werden jeweils repräsentative Blots aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

### 5.1.5 Der TLR9 Ligand CpG-DNA und aufgereinigte R6x DNA induzieren die KLF4 Expression in humanen Bronchialepithelzellen

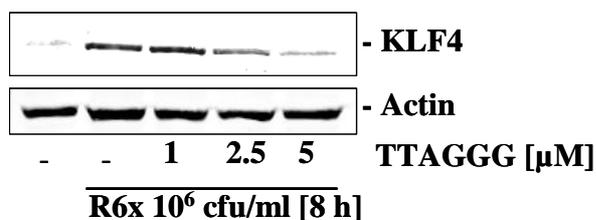
Aufgrund der zuvor im vorherigen Abschnitt gemachten Beobachtungen in HEK293-Zellen, wurden BEAS-2B-Zellen mit dem TLR9 Ligand CpG-DNA (ODN M362) für zwei bis zehn Stunden lang in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  stimuliert. Als Positivkontrolle für eine KLF4 Induktion wurden BEAS-2B-Zellen parallel mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] für acht Stunden infiziert. Der Abbildung 10A ist zu entnehmen, dass es bereits nach vierstündiger Stimulation mit ODN M362 im Vergleich zum unstimulierten Leerwert zu einer Induktion von KLF4 kam. Nach achtstündiger Stimulation konnte eine leichte Abnahme beobachtet werden, bis die KLF4 Expression sich nach zehnstündiger Stimulation mit ODN M362 wieder auf dem Niveau des unstimulierten Leerwertes bewegte. Bei ODN M362 handelt es sich um unmethylierte CpG-DNA, wie sie typischerweise in bakterieller DNA vorkommt (Takeda und Akira, 2007). Um zu untersuchen, ob bakterielle DNA ebenfalls zu einer Induktion von KLF4 führt, wurden BEAS-2B-Zellen mit aufgereinigter bakterieller R6x DNA in einer Konzentration von 1 bis 10  $\mu\text{g}$  für acht Stunden stimuliert und die KLF4 Expression im Western Blot dokumentiert. Der Abbildung 10B ist zu entnehmen, dass die Stimulation mit bakterieller R6x DNA zu einer dosisabhängigen Induktion der KLF4 Expression führte. Im Vergleich zum unstimulierten Leerwert kam es bereits bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}$  zu einer Induktion der KLF4 Expression, die mit ansteigender Konzentration der eingesetzten bakteriellen R6x DNA dosisabhängig bis auf eine maximale Induktion bei 10  $\mu\text{g}$  zunahm.



**Abbildung 10A und B: ODN M362 induziert zeitabhängig und R6x DNA dosisabhängig die KLF4 Expression**

In Abbildung 10A wurden BEAS-2B-Zellen mit ODN M362 [2  $\mu\text{M}$ ] für zwei bis zehn Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für die Induktion von KLF4 wurden die Zellen mit R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein ERK2. In Abbildung 10B wurden BEAS-2B-Zellen mit R6x DNA in einer Konzentration von 1 bis 10  $\mu\text{g}$  für acht Stunden stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein Actin. In beiden Abbildungen werden jeweils repräsentative Blots aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

Um zu überprüfen, ob die R6x-induzierte KLF4 Expression in humanen Epithelzellen TLR9 abhängig ist, wurden BEAS-2B-Zellen in einem weiteren Experiment mit dem TLR9 Inhibitor TTAGGG [1 bis 5  $\mu\text{M}$ ] für zwei Stunden vorinkubiert und anschließend die Zellen für acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert. Die KLF4 Expression wurde auf Proteinebene im Western Blot detektiert. Der Abbildung 11 ist zu entnehmen, dass die Stimulation mit Pneumokokken im Vergleich zum unstimulierten Leerwert zu einer kräftigen KLF4 Induktion führte. Der Einsatz des TLR9 Inhibitors TTAGGG führte bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  noch zu keiner erkennbaren Inhibition der KLF4 Expression auf Proteinebene. Bei einer eingesetzten Konzentration des Inhibitors von 2,5 und 5  $\mu\text{M}$  konnte jedoch eine sukzessive und dosisabhängige Blockierung der R6x-induzierten KLF4 Expression in BEAS-2B-Zellen beobachtet werden.



**Abbildung 11: Der TLR9 Inhibitor TTAGGG inhibiert dosisabhängig die R6x-induzierte KLF4 Expression**

BEAS-2B-Zellen wurden zwei Stunden vor der Stimulation mit TTAGGG [1 bis 5  $\mu\text{M}$ ] vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für acht Stunden mit

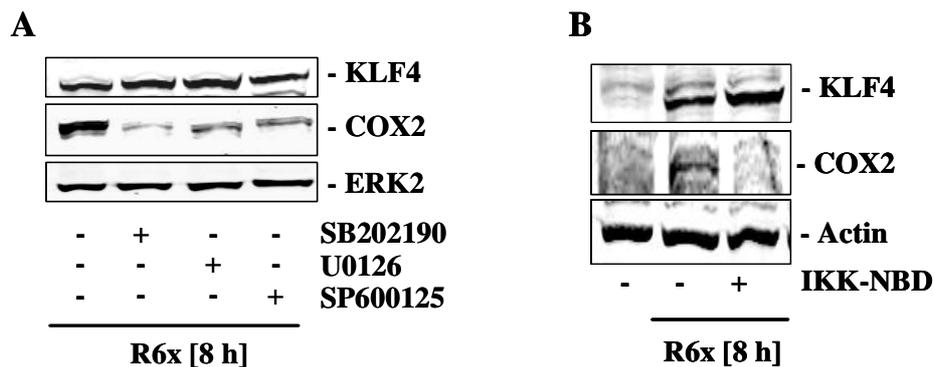
dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot dokumentiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein Actin. In der Abbildung wird jeweils ein repräsentativer Blot aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

### **5.1.6 Die *S. pneumoniae*-induzierte KLF4 Expression ist p38 MAPK, ERK, JNK und NF- $\kappa\text{B}$ unabhängig**

Im Entzündungsgeschehen stellt der intrazelluläre MAPK-Signalweg ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von TLRs (Takeda und Akira, 2007) und der nachfolgenden Aktivierung von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- $\kappa\text{B}$  dar (Takeda und Akira, 2007). Auch in der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie spielt der MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Initiierung der Immunantwort (Schmeck et al., 2006b; Schmeck et al., 2004). Ein Zusammenhang zwischen MAPK und einer KLF4 Expression konnte für p38 MAPK in vaskulären Muskelzellen (Li et al., 2010a) und für ERK5 in Endothelzellen (Ohnesorge et al., 2010) gezeigt werden. Eine Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  durch *S.p.* konnte in humanen

Lungenepithelzellen beobachtet werden (N'Guessan et al., 2006; Sadikot et al., 2003; Schmeck et al., 2006a).

Im Nachfolgenden sollte daher untersucht werden, ob bei der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression die MAPKs p38, ERK und JNK involviert sind und die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression vom Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B-abhängig ist. Dafür wurden BEAS-2B-Zellen vor der Stimulation mit dem p38 MAPK Inhibitor (SB202190), dem ERK Inhibitor (U0126), dem JNK Inhibitor (SP600125) in einer Konzentration von jeweils 10  $\mu$ M für 30 Minuten sowie mit dem NF- $\kappa$ B Inhibitor IKK-NBD [10  $\mu$ M] für zwei Stunden vorinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Die Expression des Transkriptionsfaktors KLF4 wurde nach anschließender Proteinextraktion mit einem KLF4 spezifischen Antikörper im Western Blot dokumentiert. Als Stimulationskontrolle und zur Überprüfung der Funktionalität der eingesetzten Inhibitoren wurde die COX2 Expression auf Proteinebene im Western Blot parallel hierzu dokumentiert. Der Abbildung 12A ist zu entnehmen, dass die Inhibition der MAPKs p38, ERK und JNK zu keiner Hemmung der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression in BEAS-2B-Zellen führte. Da die COX2 Expression MAPK-abhängig ist (N'Guessan et al., 2006), zeigt die im Vergleich zur Stimulationskontrolle abnehmende COX2 Expression die Funktionalität aller drei MAPK Inhibitoren. Der Abbildung 12B ist zu entnehmen, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ebenfalls zu keiner erkennbaren Abschwächung der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression führte. Die abnehmende COX2 Expression im Vergleich zur Stimulationskontrolle zeigte auch in diesem Versuch die Funktionalität des Inhibitors.



**Abbildung 12A und B: Die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression ist unabhängig von den MAPK p38, ERK, JNK und dem Transkriptionsparameter NF- $\kappa$ B**

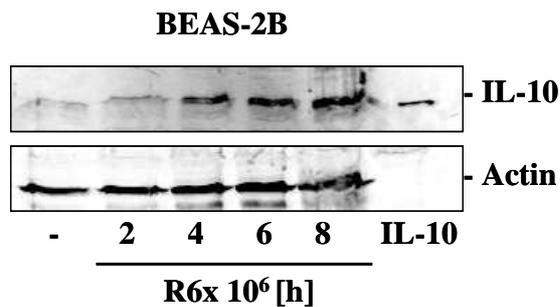
In Abbildung 12A wurden BEAS-2B-Zellen vor der Stimulation mit dem p38 MAPK Inhibitor SB202190 [10  $\mu$ M], dem ERK Inhibitor U0126 [10  $\mu$ M] sowie dem JNK Inhibitor SP600125 [10  $\mu$ M] für 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [10<sup>6</sup> cfu/ml] stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot detektiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Proteine ERK2. Als Inhibitionskontrolle wurde COX2 detektiert. In Abbildung 12B wurden BEAS-2B-Zellen vor der Stimulation mit dem NF- $\kappa$ B Inhibitor IKK-NBD [10  $\mu$ M] für zwei Stunden vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen für acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [10<sup>6</sup> cfu/ml] stimuliert. Die KLF4 Expression wurde im Western Blot detektiert. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein Actin. Als Inhibitionskontrolle wurde COX2 detektiert. In beiden Abbildungen wird jeweils ein repräsentativer Blot aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

### **5.1.7 Der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 führt zu einer dosisabhängigen Inhibition der *S. pneumoniae*-induzierten KLF4 Expression**

Sanjuan et al. implizieren insbesondere den Src Tyrosinkinasen eine bedeutende Rolle bei der TLR9 nachfolgenden Signalkaskade. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob Src Tyrosinkinasen in Bronchialepithelzellen einen Einfluss auf die KLF4 Induktion haben. Dafür wurden BEAS-2B-Zellen zwei Stunden vor der Stimulation mit einem Src Tyrosinkinaseinhibitor 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(T-butyl)pyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP2) [0,1  $\mu$ M und 1  $\mu$ M ] sowie einer PP2-Negativkontrolle 4-Amino-7-phenylpyrazolol[3,4-d] pyrimidin (PP3) in einer Konzentration von 1  $\mu$ M vorinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6x [10<sup>6</sup> cfu/ml] für acht Stunden stimuliert. Die Expression des Transkriptionsfaktors KLF4 wurde nach anschließender Proteinextraktion mit einem KLF4 spezifischen Antikörper im Western Blot dokumentiert. Der Abbildung 13 ist zu entnehmen, dass der Pneumokokkenstamm R6x eine starke KLF4 Expression induzierte.



einem IL-10 spezifischen Antikörper im Western Blot dokumentiert. Die Untersuchungen zeigten, dass unstimulierte BEAS-2B-Zellen kein IL-10 exprimierten, wohingegen die Stimulation mit Pneumokokken zeitabhängig eine IL-10 Expression induzierte. Während nach zweistündiger Stimulation mit R6x noch keine IL-10 Induktion erkennbar war, kam es nach vier Stunden zu einer leichten und nach sechs bis acht Stunden *post infectionem* schließlich zu einer kräftigen IL-10 Induktion im Western Blot (Abbildung 14).

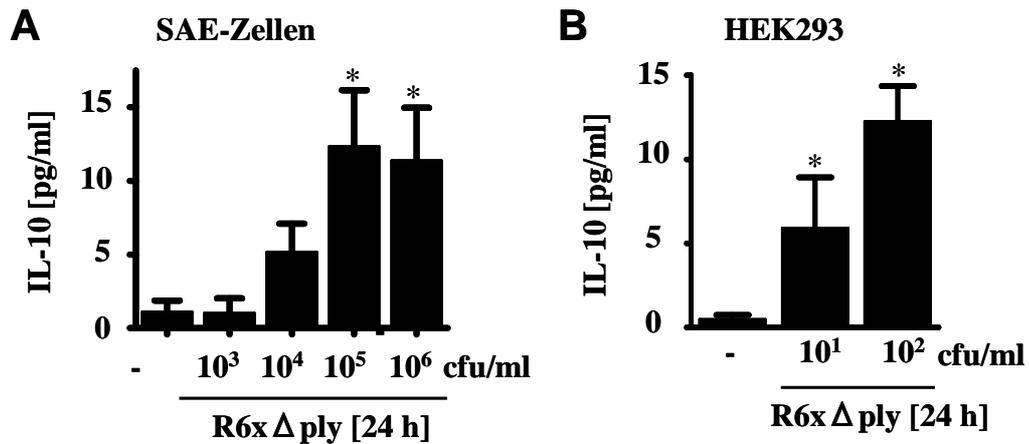


**Abbildung 14: *S.p.* induziert zeitabhängig eine IL-10 Expression in BEAS-2B-Zellen**

BEAS-2B-Zellen wurden für zwei bis zehn Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Die IL-10 Expression wurde im Western Blot detektiert. Zur Überprüfung der Spezifität des IL-10 Antikörpers im

Western Blot wurde parallel ein rekombinantes IL-10 [0,25  $\mu$ g] aufgetragen. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein Actin. In der Abbildung wird ein repräsentativer Blot aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

Die in BEAS-2B-Zellen gemachten Beobachtungen wurden anschließend in zwei weiteren humanen Zelllinien verifiziert. Dafür wurden SAE- und HEK293-Zellen jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen [ $10^3$  bis  $10^6$  cfu/ml] des Pneumokokkenstammes R6x $\Delta$ ply für 24 Stunden stimuliert. Die IL-10 Sekretion in den Zellüberständen wurde anschließend im IL-10 ELISA bestimmt. Während in SAE-Zellen bei einer Pneumokokkenkonzentration von  $10^3$  cfu/ml nur eine dem unstimulierten Leerwert vergleichbaren IL-10 Konzentration beobachtet werden konnte, führten höhere Konzentration von  $10^4$  bis  $10^6$  cfu/ml zu einer dosisabhängigen Induktion der IL-10 Sekretion. Bei einer Pneumokokkenkonzentration von  $10^5$  und  $10^6$  cfu/ml wurde die maximale und im Vergleich zum unstimulierten Leerwert signifikante Induktion von IL-10 in SAE-Zellen beobachtet (Abbildung 15A). Bei HEK293-Zellen führten hingegen schon sehr geringe Konzentrationen von  $10^1$  und  $10^2$  cfu/ml zu einer signifikanten und dosisabhängigen IL-10 Sekretion im Vergleich zum unstimulierten Leerwert (Abbildung 15B).

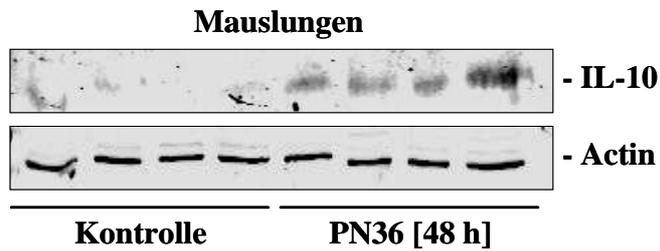


**Abbildung 15A und B: *S.p.* induziert eine dosisabhängige IL-10 Sekretion in SAE- und HEK293-Zellen**

In Abbildung 15A wurden SAE-Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply mit einer Konzentration von 10<sup>3</sup> bis 10<sup>6</sup> cfu/ml für 24 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Die IL-10 Konzentration im Zellüberstand wurde anschließend im ELISA dokumentiert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. In Abbildung 15B wurden HEK293-Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply in einer Konzentration von 10<sup>1</sup> und 10<sup>2</sup> cfu/ml für 24 Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Die IL-10 Konzentration im Zellüberstand wurde anschließend im ELISA dokumentiert. In beiden Graphen wurden signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle mit einem Stern gekennzeichnet. Die hier gezeigten Graphen wurden jeweils aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

### 5.2.2 *S. pneumoniae* induziert die IL-10 Sekretion in einem *in vivo* Mauspneumoniemodell

Die in humanen Epithelzellen gemachten Beobachtungen sollten in einem *in vivo* Mausmodell qualitativ verifiziert werden. Dafür wurden weibliche C57BL/6-Mäuse unter leichter Anästhesie intranasal mit dem Pneumokokkenstamm PN36 infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Lungen explantiert, schockgefroren und homogenisiert. In den Zelllysaten von infizierten Tieren und in nichtinfizierten Kontrolltieren wurde im Western Blot mit einem IL-10 spezifischen Antikörper die IL-10 Expression dokumentiert. Abbildung 16 zeigt, dass es in allen vier infizierten Mäusen im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrolltieren zu einer deutlichen Induktion der IL-10 Expression auf Proteinebene kam.



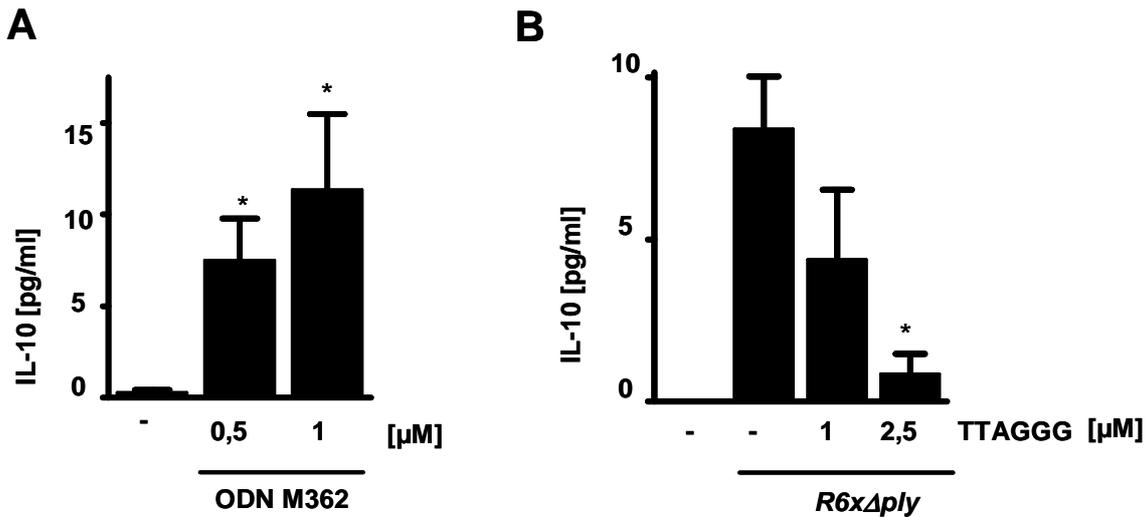
**Abbildung 16: Nachweis der IL-10 Induktion in *S.p.* infizierten Mauslungen**

In dieser Abbildung wurden die Lungen von C57BL/6-Mäusen intranasal mit dem Pneumokokkenstamm PN36 [ $5 \times 10^6$  cfu] für 48 Stunden infiziert, die Lungen anschließend explantiert, schockgefroren, homogenisiert, in

Western Blot Lysepuffer resuspendiert und die Expression von IL-10 im Western Blot untersucht. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Protein Actin. In der Abbildung werden Proben von acht unterschiedlichen Mauslungen gezeigt.

### **5.2.3 Der TLR9 Ligand CpG-DNA induziert die IL-10 Sekretion in humanen Bronchialepithelzellen**

Um zu untersuchen, ob der TLR9 an der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion beteiligt ist, wurden HEK293-Zellen mit dem TLR9 Ligand CpG-DNA (ODN M362) für 24 Stunden lang mit einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M stimuliert. Die IL-10 Sekretion wurde auf Proteinebene im IL-10 ELISA dokumentiert. Dabei zeigte sich, dass ODN M362 zu einer signifikanten und dosisabhängigen Induktion der IL-10 Sekretion im Vergleich zum unstimulierten Leerwert führte. Bereits bei einer Konzentration von 0,5  $\mu$ M zeigte sich im Vergleich zum unstimulierten Leerwert eine signifikante Induktion von IL-10 durch ODN M362. Eine maximale und signifikante IL-10 Induktion konnte bei einer eingesetzten Konzentration von 1  $\mu$ M beobachtet werden (Abbildung 17A). Anschließend sollte untersucht werden, ob ein TLR9 Inhibitor die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion blockieren kann. Dafür wurden HEK293-Zellen in einem weiteren Experiment mit dem TLR9 Inhibitor TTAGGG für zwei Stunden vorinkubiert und anschließend mit dem Pneumokokkenstamm R6x $\Delta$ ply [ $10^2$  cfu/ml] für 24 Stunden stimuliert und die IL-10 Sekretion auf Proteinebene im ELISA erfasst. Der Abbildung 17B ist zu entnehmen, dass TTAGGG bei einer eingesetzten Konzentration von 1  $\mu$ M zu einer leichten und bei 2,5  $\mu$ M zu einer signifikanten Inhibition der *S.p.*-vermittelten Induktion der IL-10 Sekretion führte.



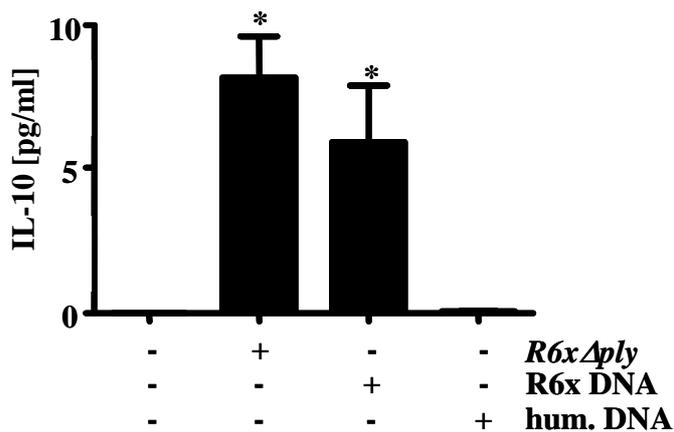
**Abbildung 17A und B: CpG-DNA (ODN M362) induziert dosisabhängig die IL-10 Sekretion**

In Abbildung 17A wurden HEK293-Zellen mit ODN M362 [0,5μM und 1 μM] für 24 Stunden stimuliert. In Abbildung 17B wurden HEK293-Zellen zunächst mit dem Inhibitor TTAGGG [1 μM und 2,5 μM] für zwei Stunden vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply [ $10^2$  cfu/ml] stimuliert. Die IL-10 Sekretion in den Überständen wurde mittels ELISA detektiert. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle (A) bzw. im Vergleich zur Pneumokokken-stimulierten IL-10 Sekretion (B) wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Die hier gezeigten Graphen wurden jeweils aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

### 5.2.4 Aufgereinigte bakterielle R6x DNA induziert die IL-10 Sekretion

Die DNA von Prokaryonten enthält CpG-Motive (nicht-methylierte Cytidin-Guanosin-Dinukleotide). DNA, die solche CpG-DNA Motive enthält, wird von humanen Zellen über den TLR9 als molekulares Muster für mikrobielle Erreger erkannt und versetzt diese in einen „Alarmzustand“. Um eine Autoimmunreaktion zu verhindern, muss der TLR9 zwischen bakterieller und humaner DNA unterscheiden können. So weist humane Eukaryonten-DNA signifikant weniger CpG-Motive auf und wird daher nicht vom TLR9 als „Alarmsignal“ erkannt. Daher sollte untersucht werden, ob der mutmaßlich an der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion beteiligte Rezeptor ebenfalls zwischen bakterieller und humaner DNA selektieren kann. Daher wurde aus dem Pneumokokkenstamm R6x sowie aus humanen BEAS-2B-Zellen DNA aufgereinigt und anschließend HEK293-Zellen mit bakterieller DNA [1 μg/ml] oder humaner DNA [1 μg/ml] für 24 Stunden stimuliert. Als Positivkontrolle für eine IL-10 Sekretion wurden Zellen parallel mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply [ $10^2$  cfu/ml] infiziert. Die IL-10 Sekretion wurde auf Proteinebene im IL-10 ELISA gemessen. In der Abbildung 18 ist zu

erkennen, dass die aufgereinigte R6x DNA im Vergleich zum unstimulierten Leerwert zu einer signifikanten Induktion der IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen führte. Dabei lag die IL-10 Konzentration im Überstand R6x DNA stimulierter Zellen leicht unter der R6xΔply stimulierten Positivkontrolle. Im Gegensatz hierzu, konnte im Zellüberstand von HEK293-Zellen, die mit methylierter humaner BEAS-2B DNA stimuliert wurden, keine IL-10 Sekretion im ELISA nachgewiesen werden.



**Abbildung 18: bakterielle DNA induziert die IL-10 Sekretion**

HEK293-Zellen wurden für 24 Stunden mit aufgereinigter bakterieller R6x DNA [1 µg/ml] und aufgereinigter humaner DNA [1 µg/ml] stimuliert. Als Positivkontrolle wurden Zellen parallel für 24 Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply [10<sup>2</sup> cfu/ml] stimuliert. Die IL-10 Sekretion in den Überständen wurde im ELISA detektiert. Signifikante Unterschiede (p< 0,05) im

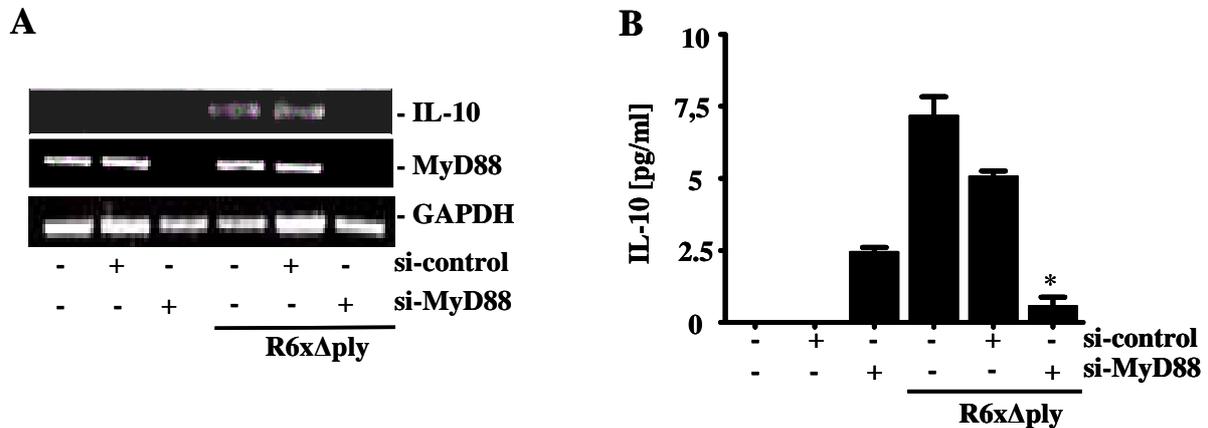
Vergleich zur unstimulierten Negativkontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Der hier gezeigte Graph wurde aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

### 5.2.5 Die *S. pneumoniae*-induzierte IL-10 Sekretion ist MyD88-abhängig

Um die Annahme zu überprüfen, dass das Adapterprotein MyD88 an der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion beteiligt ist, wurden HEK293-Zellen mit einer spezifischen siRNA gegen MyD88 (si-MyD88) für 48 Stunden transfiziert. Als Negativkontrolle wurden HEK293-Zellen mit einer Kontroll siRNA (si-control) zu den gleichen Bedingungen transfiziert. Die Zellen wurden acht Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply [10<sup>6</sup> cfu/ml] stimuliert und anschließend der Effekt der MyD88 siRNA transfizierten und stimulierten HEK293-Zellen auf die IL-10 Transkription auf mRNA Ebene in der semiquantitativen PCR untersucht. Die Abbildung 19A zeigt, dass die MyD88 siRNA sowohl in stimulierten als auch unstimulierten HEK293-Zellen zu einer Degradation der MyD88 mRNA im Vergleich zu einer eingesetzten Kontroll siRNA führte. Die IL-10 Transkription wurde in *S.p.*-stimulierten HEK293-Zellen induziert.

Um diese Beobachtung auch auf die Proteinebene zu übertragen, wurden HEK293-Zellen mit der MyD88 siRNA transfiziert, die Zellen mit dem *S.p.* Stamm R6xΔply [10<sup>2</sup> cfu/ml] für 24 Stunden

stimuliert und die IL-10 Konzentration anschließend in den Überständen im ELISA gemessen. Die Abbildung 19B bestätigt die Beobachtungen auf mRNA Ebene. So führte die Transfektion von HEK293-Zellen mit einer MyD88 siRNA im Vergleich zur eingesetzten Kontroll siRNA zu einer signifikanten Blockierung der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion auf Proteinebene.



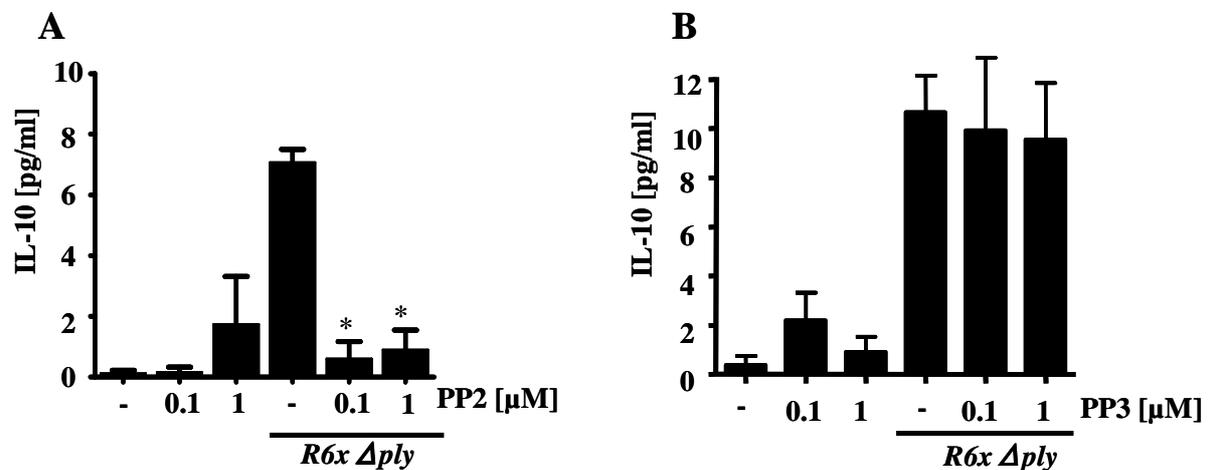
**Abbildung 19A und B: MyD88 siRNA blockiert die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen**

In Abbildung 19A wurden HEK293-Zellen mit einer spezifischen MyD88 siRNA und einer Kontroll siRNA je [1 µg/ml] transfiziert. Mittels semiquantitativer Bestimmung der IL-10 mRNA wurde die IL-10 Expression nach achtstündiger *S.p.* R6xΔply Stimulation [10<sup>2</sup> cfu/ml] erfasst. Ein erfolgreicher MyD88 *knockdown* in den für 48 Stunden transfizierten Zellen wurde mittels MyD88 Primern verifiziert. Der Einsatz gleicher mRNA Gesamtmenge wurde durch den Einsatz der GAPDH sichergestellt. In der Abbildung wird ein repräsentatives Gel aus drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt. In Abbildung 19B wurden HEK293-Zellen mit einer spezifischen MyD88 siRNA und einer Kontroll siRNA je [1 µg/ml] für 48 Stunden transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden mit *S.p.* R6xΔply [10<sup>2</sup> cfu/ml] stimuliert und im ELISA die IL-10 Konzentration in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im Vergleich zur stimulierten Kontroll siRNA wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Der hier gezeigte Graph wurde aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

### 5.2.6 Der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 blockiert die *S. pneumoniae*-induzierte IL-10 Sekretion

Im nächsten Schritt wurde gefragt, ob Src Tyrosinkinasen ebenfalls einen Einfluss auf die IL-10 Induktion haben. Dafür wurden HEK293-Zellen zwei Stunden vor der Stimulation mit dem unspezifischen Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 [0,1 µM und 1 µM ] sowie der PP2-Negativkontrolle PP3 in einer Konzentration von 0,1 µM und 1 µM vorinkubiert. Nach der Inkubationsphase wurden die Zellen mit dem Pneumokokkenstamm R6xΔply [10<sup>2</sup> cfu/ml] für 24 Stunden stimuliert und die IL-10 Sekretion anschließend auf Proteinebene im IL-10 ELISA

dokumentiert. Der Abbildung 20A ist zu entnehmen, dass der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 sowohl in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$ , als auch in der höheren Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  zu einer signifikanten Reduktion der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen führte. Die PP2-Negativkontrolle PP3 zeigte in den Experimenten keinen Effekt auf die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen und bestätigt somit die Spezifität des Tyrosinkinaseinhibitors PP2 (Abbildung 20B). In der zu Abbildung 20 korrespondierenden LDH-Messung in den Überständen konnte keine signifikante Abweichung der LDH in den unterschiedlich behandelten Zellen gemessen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Inhibition der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion nicht durch einen verstärkten Zelluntergang verursacht wurde (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 20A und B: PP2 inhibiert die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen**

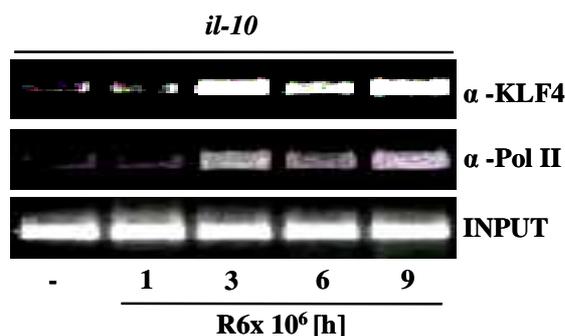
In Abbildung 20A wurden HEK293-Zellen zwei Stunden vor der Stimulation mit dem Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 [0,1 und 1  $\mu\text{M}$ ] vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit *S.p.* R6x $\Delta$ ply [ $10^2$  cfu/ml] stimuliert. Die IL-10 Konzentration in den Überständen wurde im ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den mit *S.p.* R6x $\Delta$ ply stimulierten HEK293-Zellen wurden mit einem Stern gekennzeichnet. In Abbildung 20B wurden HEK293-Zellen zwei Stunden vor der Stimulation mit PP3 [0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ ], einer Negativkontrolle für PP2, vorinkubiert und anschließend für 24 Stunden mit *S.p.* R6x $\Delta$ ply [ $10^2$  cfu/ml] stimuliert. Die IL-10 Konzentration in den Überständen wurde im ELISA bestimmt. Alle hier gezeigten Graphen wurden jeweils aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

### 5.3 Die Interaktion von KLF4 am *il-10* Promoter

Die bisher vorgestellten Ergebnisse indizieren, dass *Streptococcus pneumoniae* TLR9-abhängig sowohl den Transkriptionsfaktor KLF4, als auch IL-10 in humanen Epithelzellen induziert. Mit Hilfe von bioinformatischen Analysen konnten mehrere mutmaßliche KLF4-Bindungsstellen am *il-10* Promoter ermittelt werden, so dass im Folgenden untersucht werden sollte, ob KLF4 an den *il-10* Promoter bindet.

#### 5.3.1 Der Transkriptionsfaktor KLF4 wird an den *il-10* Promoter rekrutiert

Die Bindung des Transkriptionsfaktors KLF4 an den *il-10* Promoter wurde mittels ChIP untersucht. Dafür wurden BEAS-2B-Zellen für ein bis neun Stunden mit dem Pneumokokkenstamm R6x [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert, die DNA-Proteinkomplexe mit spezifischen Antikörpern gegen KLF4 gebunden und der *il-10* Promoter in der PCR amplifiziert. Als Nachweis stattfindender Transkription wurde die Rekrutierung der Polymerase II an den *il-10* Promoter nachgewiesen. Die Abbildung 21 zeigt, dass in unstimulierten BEAS-2B-Zellen und nach einstündiger Stimulation noch keine Transkription am *il-10* Promoter erfolgte. Ab drei Stunden *post infectionem* zeigte sich eine deutliche Bindung von KLF4 sowie parallel hierzu eine Rekrutierung der Polymerase II an den *il-10* Promoter. Die INPUT Werte zeigten eine gleichmäßige Beladung an.



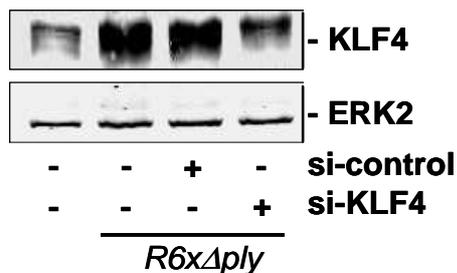
**Abbildung 21: Bindung von KLF4 an den *il-10* Promoter in *S.p.*-infizierten BEAS-2B-Zellen**

BEAS-2B-Zellen wurden für ein bis neun Stunden mit *S.p.* [ $10^6$  cfu/ml] stimuliert und DNA-Proteinkomplexe für die ChIP aufgereinigt. Für die Präzipitation wurden spezifische Antikörper für KLF4 und Pol II verwendet. Anschließend erfolgte die Amplifikation des *il-10* Promoters in der PCR. Als Positivkontrolle einer stattfindenden Transkription wurde die Rekrutierung der Polymerase II an den *il-10*

Promoter nachgewiesen. Als interne Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung ist der INPUT dargestellt. In der Abbildung werden repräsentative Gele aus drei unabhängigen Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

### 5.3.2 Der Transkriptionsfaktor KLF4 ist essentiell für die Sekretion von IL-10 in *S. pneumoniae*-infizierten humanen Bronchialepithelzellen

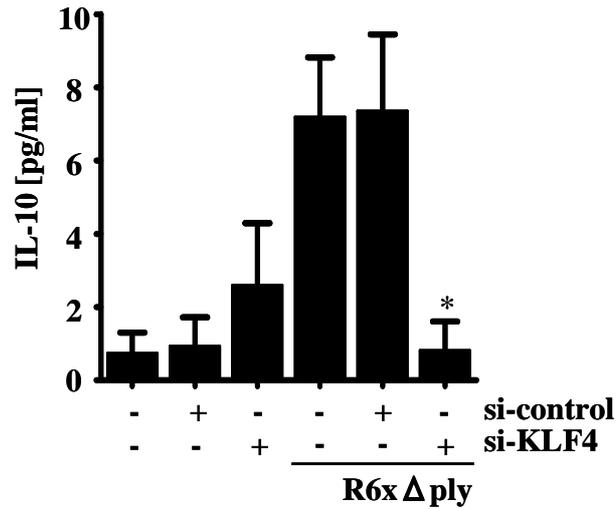
Nach der Beobachtung, dass KLF4 an den *il-10* Promoter in *S.p.*-infizierten Zellen bindet, sollte untersucht werden, welchen Stellenwert die Bindung des Transkriptionsfaktors KLF4 in der Induktion einer IL-10 Sekretion einnimmt. Dazu wurden HEK293-Zellen zunächst einer KLF4 siRNA (si-KLF4) [1 µg/ml] für 96 Stunden transfiziert, mit dem *S.p.* R6xΔply [10<sup>6</sup> cfu/ml] für acht Stunden stimuliert, und anschließend die Funktionalität der KLF4 siRNA Sequenz auf die KLF4 Expression auf Proteinebene im Western Blot untersucht. Im Vergleich zur Kontroll siRNA zeigte sich bei der KLF4 siRNA eine deutliche Inhibition der *S.p.*-induzierten KLF4 Induktion in HEK293-Zellen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: KLF4 siRNA inhibiert die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression in HEK293-Zellen**

In Abbildung 22 wurden HEK293-Zellen mit einer KLF4 siRNA [1 µg/ml] und einer Kontroll siRNA [1 µg/ml] transfiziert. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen KLF4 wurde die KLF4 Expression nach achtstündiger *S.p.* Stimulation [10<sup>6</sup> cfu/ml] im Western Blot erfasst. Als Nachweis gleicher Proteinbeladung diente das konstitutiv exprimierte Proteine ERK2. In der Abbildung wurde ein repräsentativer Blot aus mindestens drei separaten Experimenten mit gleichem Ergebnis gezeigt.

Um den Einfluss des Transkriptionsfaktors KLF4 auf die IL-10 Sekretion zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen mit der KLF4 siRNA transfiziert [1 µg/ml], anschließend die Zellen für 24 Stunden mit dem *S.p.* R6xΔply [10<sup>6</sup> cfu/ml] stimuliert und im ELISA die IL-10 Konzentration im Überstand gemessen. Der Abbildung 23 ist zu entnehmen, dass die KLF4 siRNA im Vergleich zur Kontroll siRNA zu einer signifikant geringeren *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen führte. In der zu Abbildung 23 korrespondierenden LDH-Messung in den Überständen konnte keine signifikante Abweichung der LDH in den unterschiedlich behandelten Zellen gemessen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Inhibition der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion nicht durch einen verstärkten Zelluntergang verursacht wurde (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 23: KLF4 siRNA blockiert die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen**

In Abbildung 23 wurden HEK293-Zellen der spezifischen KLF4 siRNA [1 µg/ml] und einer Kontroll si-RNA [1 µg/ml] für 96 Stunden transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden mit *S.p.* R6xΔply [10<sup>2</sup> cfu/ml] stimuliert und im ELISA die IL-10 Konzentration in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede (p < 0,05) im Vergleich zur stimulierten Kontroll siRNA wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Der hier gezeigte Graph wurde aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Stimulationen, in denen die einzelnen Werte je als Duplikate angelegt waren, zusammengefügt.

## 6. Diskussion

*Streptococcus pneumoniae* ist der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie und führt nach der Infektion zu einer Aktivierung von pulmonalen Zellen, die inflammatorische Mediatoren freisetzen und das Entzündungsgeschehen maßgeblich beeinflussen (Albiger et al., 2007; Hippenstiel et al., 2006). Dabei ist die Generierung einer Inflammation ein dynamischer und hochkomplexer Prozess, der die koordinierte Expression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen erfordert. Während einige grundlegende Mechanismen der proinflammatorischen Zytokinexpression in Bronchialepithelzellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* bereits bekannt sind (Hammerschmidt et al., 2005; N'Guessan et al., 2006; Schmeck et al., 2006a), ist wenig über die *S.p.*-vermittelte Sekretion sowie der zugrundeliegenden Regulation von antiinflammatorischen Mediatoren in Bronchialepithelzellen bekannt.

### **6.1 *S. pneumoniae* induziert TLR9-abhängig den Transkriptionsfaktor KLF4 in humanen Bronchialepithelzellen**

Die Familie der Krüppel-like Faktoren reguliert eine ganze Palette von zellulären Prozessen, wie Wachstum, Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Feinberg et al., 2005; Ghaleb et al., 2005). In der aktuellen Literatur wird der Familie der KLFs jedoch auch eine Rolle in der Initiierung und Modulation des Entzündungsgeschehens zugeschrieben (Cao et al., 2010). So wird die Transkription von KLF2 und KLF6 in humanen Zellen durch Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oder *Clostridium botulinum* induziert (O'Grady et al., 2007). Ein entsprechender Nachweis auf Proteinebene konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden. Erste Hinweise in der aktuellen Literatur legen nahe, dass auch dem Transkriptionsfaktor KLF4 eine wichtige Rolle als Regulator im Entzündungsgeschehen zukommt. So wird KLF4 durch das bakterielle Zellmembranbestandteil LPS induziert (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2007; Zhou und Amar, 2007). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Stimulation mit *S. pneumoniae* zu einer KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen führt und welche Rezeptoren an der Induktion beteiligt sind. Diese Arbeit zeigt, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* zeit- und dosisabhängig zu einer KLF4 Expression führte und der TLR9 als PRR maßgeblich an der *S. pneumoniae*-induzierten KLF4 Expression in humanen Epithelzellen beteiligt ist.

### **6.1.1 *S. pneumoniae* und KLF4 Expression**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit *S. pneumoniae* zu einer zeit- als auch dosisabhängigen KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen und in primären humanen pulmonalen Epithelzellen (SAE-Zellen) führte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Pneumokokkeninfektion in Mauslungen *in vivo* eine KLF4 Expression induzierte. KLF4 ist ein wichtiger Wachstumsregulator in Darmepithelzellen, der nach einem zellulären DNA Schaden induziert wird und über eine transkriptionale Aktivierung zu einem Zellarrest führt (Ghaleb et al., 2005). In der aktuellen Literatur finden sich jedoch Hinweise, die eine Beteiligung von KLF4 im Entzündungsgeschehen vermuten lassen. So führen zahlreiche proinflammatorische Stimuli, wie z.B. TNF $\alpha$  in humanen Endothelzellen (Hamik et al., 2007), TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  in humanen Makrophagen (Feinberg et al., 2005) sowie die Stimulation mit LPS in humanen Makrophagen (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2007; Zhou und Amar, 2007) zu einer KLF4 Induktion. Eine Induktion der KLF4 Expression nach Stimulation mit *S.p.* wurde in der aktuellen Literatur noch nicht beschrieben.

### **6.1.2 Toll-like Rezeptor-vermittelte KLF4 Expression**

Welche Rolle TLR für die Pneumokokken-induzierte KLF4 Expression spielen, war in der Literatur unbekannt. In den Studien von Liu et al. (Liu et al., 2007), Feinberg et al. (Feinberg et al., 2005) und Zhou et al. (Zhou und Amar, 2007) wurde aufgereinigtes bakterielles LPS zur Induktion einer KLF4 Expression verwendet. Somit könnte die Beteiligung der Toll-like Rezeptoren an der KLF4 Induktion angenommen werden. Bakterielles LPS wird dabei in der Regel vom TLR4 (Takeda und Akira, 2007) bzw. atypisches LPS vom TLR2 detektiert, z.B. aus *P. gingivalis* (Zhou und Amar, 2007). Auch Pneumokokken exprimieren mit Pneumolysin ein Molekül, dass vom TLR4 detektiert wird (Malley et al., 2003). Diese Arbeit ergab, dass weder die Stimulation mit dem TLR4 Ligand LPS noch rekombinantes Ply eine gesteigerte KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen bewirkte. *Vice versa* konnte durch die Stimulation mit der pneumolysinnegativen Mutante R6 $\Delta$ ply die KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen weiterhin beobachtet werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass in Bronchialepithelzellen die KLF4 Induktion durch Pneumokokken TLR4-unabhängig ist. Da die Untersuchungen mit LPS anderer Arbeitsgruppen hauptsächlich in Makrophagen (Feinberg et al., 2005; Liu et al., 2007) erfolgte, ist es jedoch grundsätzlich möglich, dass die hier beobachtete TLR4-vermittelte KLF4 Expression Zell-spezifisch ist.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem TLR2 Liganden MALP2 zu keiner KLF4 Induktion in Bronchialepithelzellen führte, so dass eine Beteiligung dieses TLR an der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen ebenfalls unwahrscheinlich ist.

Die Stimulation mit der pneumolysinnegativen Mutante R6x $\Delta$ ply in HEK293-Zellen führte ebenfalls zu einer starken KLF4 Expression. Da HEK293-Zellen jedoch keinen TLR2 und TLR4, jedoch den TLR9 exprimieren (Hornung et al., 2002), der u.a. auch in der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie beschrieben ist (Albiger et al., 2007) und es bei einer Infektion mit Pneumokokken durch Autolyse zur Freisetzung von bakterieller DNA kommt, die vom TLR9 detektiert wird (Moscoso und Claverys, 2004), sollte in den weiterführenden Experimenten die Beteiligung des TLR9 bei der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression untersucht werden: Die Stimulation mit aufgereinigter Pneumokokken DNA, als auch mit dem TLR9 Ligand CpG-DNA folgte eine gesteigerte KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen. Auf der anderen Seite war die Pneumokokken-induzierte KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen durch den Einsatz eines spezifischen TLR9 Inhibitors blockierbar. In der aktuellen Literatur zu KLF4 wurde die Rolle des TLR9 bei der KLF4 Expression bisher noch nicht beschrieben.

Als ein Adapterprotein ist MyD88 maßgeblich an der Signaltransduktion des TLR9 beteiligt (Huang und Yang, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Transfektionsversuchen mit einer MyD88 siRNA gezeigt werden, dass die *S.p.*-induzierte KLF4 Expression MyD88-abhängig ist. Zhou et al. beobachteten in ihren *in vitro* Experimenten in humanen Makrophagen hingegen eine MyD88-unabhängige Induktion von KLF4 nach Stimulation aus *P. gingivalis* aufgereinigtem LPS (Zhou und Amar, 2007). Wie in Absatz 6.1.2 beschrieben, konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Beteiligung des TLR2 nicht beobachtet werden. Desweiteren führte auch die Stimulation mit IFN $\gamma$  in humanen Makrophagen (Feinberg et al., 2005), humanen Kolonkarzinomzellen und Mausfibroblasten (Chen et al., 2002) zu einer KLF4 Expression. Da IFN $\gamma$  ein wichtiges Zielprotein des aktivierten TLR9 darstellt (Ren et al., 2008), könnte spekuliert werden, dass die in dieser Arbeit gezeigte TLR9 Aktivierung zunächst zu einer IFN $\gamma$  Induktion in Lungenepithelzellen führte, die erst in einem zweiten Schritt nach Bindung an einen IFN $\gamma$  Rezeptor zu einer Induktion von KLF4 Expression führt. Gleichfalls beschreiben Zhou and Amar, 2007 in ihrem Modell, dass die Stimulation von humanen Makrophagen mit aus *P. gingivalis* aufgereinigtem LPS zunächst u.a. TLR2 vermittelt zu einer NF- $\kappa$ B bedingten IFN $\beta$  Induktion führte, die in einem zweiten Schritt nach Bindung an den IFN $\alpha/\beta$  Rezeptor zu einer Induktion von KLF4 resultierte (Zhou und Amar, 2007). Feinberg et al. konnten in Makrophagen eine KLF4 Induktion nach einstündiger Stimulation mit ca. 5 ng/ml IFN $\gamma$  beobachten (Feinberg et al.,

2005). Laut Schmeck et al. führte die Stimulation von humanen Bronchialepithelzellen mit *S.p.* erst nach fünf Stunden zu einer maximalen und deutlich geringeren IFN $\gamma$  Sekretion mit nur ca. 0,75 ng/ml (Schmeck et al., 2006b). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Induktion der KLF4 Expression im Western Blot bereits nach vierstündiger Stimulation mit Pneumokokken beobachtet werden. Aufgrund dieser in Bronchialepithelzellen beobachteten zeitlichen Abfolge der KLF4 Expression nach vier Stunden und der durch Schmeck et al. beschriebenen IFN $\gamma$  Sekretion nach fünf Stunden (Schmeck et al., 2006b), sowie der deutlich geringeren sekretierten IFN $\gamma$  Konzentration (Schmeck et al., 2006b) im Vergleich zu den eingesetzten Konzentrationen von Feinberg et al. (Feinberg et al., 2005), erscheint eine TLR9-vermittelte IFN $\gamma$ -induzierte KLF4 Expression in Bronchialepithelzellen unwahrscheinlicher. Dennoch kann ein autokriner Loop nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen wären diesbezüglich notwendig.

Neben dem membranständigen TLR9 werden zytosolische Rezeptoren beschrieben, die an der Erkennung von bakterieller DNA beteiligt sind (Takaoka und Taniguchi, 2008). Das zytosolisch vorliegende ZBP1 (DLM-1/DAI) bindet doppelsträngige DNA Fragmente und führt zu einer TLR9/MyD88-unabhängigen Induktion von Typ I Interferon Genen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen (Stetson und Medzhitov, 2006; Takaoka et al., 2007). Sowohl synthetische DNA, als auch die Stimulation mit *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila* führen in Mausfibroblasten zu einer Aktivierung dieses zytosolischen DNA-Signalweges (Stetson und Medzhitov, 2006). Lippman et al. konnten diese Beobachtung in einer humanen Lungenepithelzelllinie nach Stimulation mit *Legionella pneumophila* jedoch nicht nachvollziehen (Lippmann et al., 2008). Da darüberhinaus die Detektion von DNA durch ZBP1 oder dem AIM2-beinhaltenden Inflammasoms zu einer MyD88-unabhängigen Induktion von Typ 1 Interferon Genen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen führt (Stetson und Medzhitov, 2006; Yanai et al., 2009), erscheint eine Beteiligung dieser DNA-erkennenden Rezeptoren an der *S.p.*-induzierten KLF4 Expression unwahrscheinlich.

Zusammengefasst deuten die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen darauf hin, der TLR9 MyD88-abhängig eine wichtige Rolle bei der *S. pneumoniae* vermittelten KLF4 Expression in Lungenepithelzellen zu spielen scheint. Eine Beteiligung der TLR2 und TLR4 konnte sich hierbei nicht bestätigen.

### **6.1.3 MAPK- und NF-κB-unabhängige KLF4 Expression**

Im Entzündungsgeschehen stellt der intrazelluläre MAPK-Signalweg ein wichtiges Bindeglied zwischen der Aktivierung von TLR und der nachfolgenden Aktivierung von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF-κB dar (Takeda und Akira, 2005). Die Aktivierung der MAPK nach Stimulation mit Pneumokokken konnte für JNK und p38 MAPK in Lungenepithelzellen (Schmeck et al., 2006b; Schmeck et al., 2004), für p38 MAPK in Mauslungen (Schmeck et al., 2004) und für ERK in humanen Epithelzellen (Ha et al., 2007) gezeigt werden. Gleichfalls konnte eine Aktivierung von NF-κB nach Stimulation mit Pneumokokken in Lungenepithelzellen gezeigt werden (Schmeck et al., 2006a).

Auch für die Familie der KLF konnte eine Beteiligung von MAPK und NF-κB im Signalweg an der Induktion einzelner KLF beobachtet werden. So führte in glatten Muskelzellen die Stimulation mit Angiotensin II zu einer ERK- und p38 MAPK-vermittelten KLF5 Expression (Liu et al., 2010). Für den Transkriptionsfaktor KLF4 konnte in Endothelzellen eine ERK5 vermittelte Induktion nach *shear stress* beschrieben werden (Ohnesorge et al., 2010). Da Zhou et al. in ihren Untersuchungen an Makrophagen ebenfalls eine p38 MAPK und NF-κB vermittelte KLF4 Expression nach Stimulation mit *P. gingivalis* aufgereinigtem LPS beschrieben (Zhou und Amar, 2007), sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob die *S.p.*-induzierte KLF4 Induktion ebenfalls MAPK- und/oder NF-κB-abhängig sind.

Eine Beteiligung des MAPK-Signalweges oder des im Entzündungsgeschehen zentralen Transkriptionsfaktors NF-κB an der Induktion von KLF4 konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die *S.p.*-induzierte KLF4 Induktion in Bronchialepithelzellen unabhängig von p38 MAPK, ERK, JNK und NF-κB sind. Eventuell muss daher davon ausgegangen werden, dass die gemachten Beobachtungen Epithelzell-spezifisch sind oder die Induktion von KLF4 über den TLR9 generell MAPK- und NF-κB-unabhängig sind. Weitere Untersuchungen wären daher diesbezüglich noch notwendig.

### **6.1.4 Src Tyrosinkinase-vermittelte KLF4 Expression**

Eine Beteiligung der Src Tyrosinkinase bei der Induktion einer KLF4 Expression ist in der aktuellen Literatur bislang noch nicht beschrieben worden. Eine koordinierte Signalübermittlung der Src PTK scheint jedoch für eine erfolgreiche Invasion von *S.p.* in die Wirtszellen unabdingbar zu sein (Agarwal et al., 2010). Gleichfalls deuten aktuelle Studien von Sanjuan et al. darauf hin, dass die frühe Aktivierung der beiden Src PTK Hck und Lyn nach Stimulation mit dem TLR9 Ligand CpG-DNA ein essentieller Bestandteil für die nachfolgende Aktivierung von

TLR9/MyD88 in Endosomen spielt (Sanjuan et al., 2006). Dieser Src PTK-Signalweg wird an der Zelloberfläche nach CpG-Stimulation initiiert. Sanjuan et al. postulieren in ihrem Modell einen unbekanntem membranständigen Rezeptor, der CpG-DNA detektiert und die beiden Src PTK Hck und Lyn aktiviert. Die nachfolgend induzierte Tyrosinphosphorylierungskaskade führt zu einer Interaktion und Aktivierung des TLR9. Erst in einem zweiten Schritt binden die in die Endosomen internalisierten CpG-DNA an den aktivierten TLR9 und initiieren die MyD88-abhängige Stimulation von Transkriptionsfaktoren und inflammatorischen Genen (Sanjuan et al., 2006). Auch Achuthan et al. beobachteten in murinen Makrophagen eine Src PTK-abhängige Tyrosinphosphorylierung von Proteinen nach Stimulation mit dem TLR9 Agonisten CpG-DNA (Achuthan et al., 2006). Der Src PTK-Signalweg kann durch die Verwendung des Src PTK Inhibitors PP2 inhibiert werden und blockiert durch fehlende TLR9-Aktivierung die MyD88-abhängige Induktion von inflammatorischen Zytokinen (Sanjuan et al., 2006). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 zu einer signifikanten Inhibition der Pneumokokken-induzierten KLF4 Expression in humanen Epithelzellen führte, wohingegen die Exposition gegenüber der chemisch inaktiven homologen Kontrolle PP3 keinen Einfluss auf die KLF4 Expression hatte. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit beobachtete Pneumokokken induzierte KLF4 Expression TLR9-abhängig ist und die Src Tyrosinkinasen eine wichtige Rolle bei der Initiierung dieses Signalweges spielen. Gemäß der Beobachtungen und der aktuellen Literaturdiskussion in dieser Arbeit kann daher angenommen werden, dass die Stimulation der Bronchialepithelzellen mit *S.p.* zu einer Freisetzung von bakterieller DNA, gefolgt von einer Src PTK-Signalweg vermittelten Aktivierung des TLR9 führte.

## **6.2 *S. pneumoniae* induziert TLR9-abhängig die Interleukin-10 Sekretion in humanen Bronchialepithelzellen**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollte die IL-10 Expression nach Stimulation mit *S. pneumoniae* sowie der an dieser Induktion beteiligten Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* zeit- und dosisabhängig zu einer IL-10 Expression und Sekretion führte und der TLR9 maßgeblich an der *S. pneumoniae* induzierten IL-10 Sekretion in humanen Epithelzellen beteiligt ist.

### **6.2.1 *S. pneumoniae* und IL-10 Expression**

Die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener entzündlich bedingter Lungenerkrankungen (Thacker, 2006). So inhibiert IL-10 die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren in alveolären Makrophagen und limitiert u.a. eine überschießende Immunantwort im Rahmen eines ARDS (Bhatia und Moochhala, 2004). Auf der anderen Seite führte eine erhöhte IL-10 Konzentration im Lungengewebe z.B. nach viraler Infektion zu bakterieller Persistenz und höherer Mortalität (van der Sluijs et al., 2004) sowie höherer Letalität bei der CAP (Martinez et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einem *in vivo* Mauspneumonie-Modell gezeigt werden, dass die intranasale Stimulation mit *S. pneumoniae* ebenfalls zu einem Anstieg der IL-10 Expression auf Proteinebene führte. Dies bestätigt die Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen, die im *in vivo* Mausversuch eine signifikante IL-10 Sekretion nach nasaler Infektion mit *S.p.* auf Transkriptions- und Expressionsebene beschrieben (McConnell et al., 2010; van der Poll et al., 1996).

Arbeiten von Moreira et al. konnten zeigen, dass auch die Stimulation mit aufgereinigten *S. pneumoniae* Zellwandbestandteilen in einer murinen Makrophagenzelllinie zu einer starken IL-10 Sekretion führte (Moreira et al., 2008). Während in der Literatur überwiegend Immunzellen, wie T-Zellen und Makrophagen als Hauptquelle für IL-10 beschrieben werden (Murray, 2006), sind auch Epithelzellen in der Lage, als Antwort auf einen entsprechenden Stimulus IL-10 zu exprimieren (Hocke et al., 2006; Moore et al., 1993; Schmeck et al., 2006a; Suzuki et al., 2008; Thacker, 2006). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von humanen Bronchialepithelzellen und primären, humanen pulmonalen Epithelzellen (SAE-Zellen) mit *S. pneumoniae* eine zeit- und dosisabhängige Sekretion und Expression von IL-10 induzierte.

Darüberhinaus konnte eine dosisabhängige IL-10 Sekretion nach Stimulation mit *S. pneumoniae* in HEK293-Zellen beobachtet werden.

Die Fähigkeit von Bronchialepithelzellen zur Sekretion von Entzündungsmediatoren nach Interaktion mit *S. pneumoniae* konnte bisher für 16 verschiedene Zytokine und Chemokine gezeigt werden (Schmeck et al., 2006a). Für das antiinflammatorische IL-10 konnte eine signifikante IL-10 Sekretion in Bronchialepithelzellen bereits nach fünfständiger Stimulation mit *S.p.* beobachtet werden (Schmeck et al., 2006b). Desweiteren konnte eine IL-10 Expression und Sekretion in humanen Lungenepithelzellen, u.a. nach Stimulation mit *Mycobacterium bovis* (Méndez-Samperio et al., 2008) und *Streptococcus agalacticae* (Mikamo et al., 2004) durch andere Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch beschrieb Hocke et al. eine moderate IL-10 Expression in unstimulierten humanen Lungenepithelzellen (Hocke et al., 2006). Insgesamt geben die gemachten Beobachtungen weitere Hinweise darauf, dass auch humane Bronchialepithelzellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* neben ihrer Barrierefunktion eine aktive Rolle im Entzündungsgeschehen einnehmen, über Oberflächenrezeptoren bakterielle Bestandteile (Suzuki et al., 2008) detektieren und als Antwort neben proinflammatorischen Zytokinen (Schmeck et al., 2006a; Schmeck et al., 2004) auch antiinflammatorische Mediatoren wie IL-10 sekretieren (Schmeck et al., 2006b). Die Rolle des epithelialen IL-10 in der Pathogenese der Pneumokokkenpneumonie ist jedoch weiterhin unbekannt.

### **6.2.2 Toll-like Rezeptor-vermittelte IL-10 Expression**

Toll-like Rezeptoren spielen eine bedeutende Rolle bei der Erkennung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern, der Initiierung einer Immunantwort und Zytokinsekretion (Takeda und Akira, 2005). In der aktuellen Literatur werden mehrere TLRs diskutiert, die an der Induktion der IL-10 Expression beteiligt sein könnten. So führte die Stimulation mit aufgereinigtem Pneumokokkenzellwandkomponenten in Makrophagen zu einer TLR2/MyD88-abhängigen IL-10 Induktion (Moreira et al., 2008). Liu et al. beobachteten eine IL-10 Expression nach Stimulation mit dem TLR4 Agonisten LPS in Mausmakrophagen (Liu et al., 2007). Gleichfalls führte die Stimulation mit TLR3- und TLR7-Liganden in Mausmilzzellen sowie in einem *in vivo* Mausmodell zu einer IL-10 Induktion (Aumeunier et al., 2010). Eine IL-10 Sekretion nach Stimulation mit TLR9-Liganden konnte in B-Zellen (Liang et al., 2010) und in einer humanen Lungentumorzelllinie (Ren et al., 2009) beobachtet werden. In kultivierten humanen Lungenepithelzellen konnte die mRNA aller zehn humaner TLR nachgewiesen werden (Greene und McElvaney, 2005), wobei funktionell aktives TLR2, TLR4 (Armstrong et al., 2004) und

TLR9 (Droemann et al., 2005) in Lungenepithelzellen exprimiert wird. Da auch Bronchialepithelzellen TLR2, TLR4 (Schmeck et al., 2006a) und TLR9 (Liu et al., 2008) exprimieren, HEK293-Zellen von diesen drei Rezeptoren jedoch nur den TLR9 exprimieren (Hornung et al., 2002) wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Hypothese formuliert, dass der TLR9 an der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion beteiligt sein könnte. In der Literatur wurde eine TLR9-induzierte Zytokinsekretion bereits nach Stimulation mit *Neisseria meningitidis* (Sjolinder et al., 2008), *Klebsiella pneumoniae* (Bhan et al., 2007) und *Mycobacterium tuberculosis* (von Meyenn et al., 2006) beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HEK293-Zellen, die den TLR9 konstitutiv exprimieren (Hornung et al., 2002), der TLR9 Ligand CpG-DNA zu einer signifikanten IL-10 Sekretion führte. Bei CpG-DNA handelt es sich um unmethylierte DNA-Abschnitte, wie sie für das bakterielle oder virale Genom typisch sind (Kumagai et al., 2008; Takeda und Akira, 2007). Bei der Infektion mit Pneumokokken kommt es durch Autolyse physiologisch zur Freisetzung von bakterieller DNA (Moscoso und Claverys, 2004). Gleichfalls konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass aufgereinigte Pneumokokken-DNA zu einer IL-10 Sekretion in humanen Epithelzellen führte, wohingegen die Stimulation mit eukaryonter DNA keinen Effekt zeigte. Auch die Vorinkubation mit einem spezifischen TLR9 Inhibitor führte zu einer signifikanten Hemmung der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion. Insgesamt deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass der TLR9 eine wichtige Rolle bei der *S.p.*-induzierten IL-10 Sekretion spielt.

*In vivo* konnte eine Beteiligung des TLR9 an der IL-10 Sekretion durch Lee et al. nach Stimulation mit hitzeinaktivierten *S. pneumoniae* in murinen TLR9-defizienten Milzzellen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Lee et al., 2007). Eine maximale IL-10 Inhibition konnte in den Versuchen von Lee et al. jedoch erst in doppelt TLR9 und TLR4 defizienten Zellen erreicht werden (Lee et al., 2007). Darüberhinaus scheint der therapeutische Einsatz von CpG-DNA *in vivo* in einem murinen Asthmamodell TLR9 vermittelt zu einer erhöhten IL-10 Expression in Mauslungen und abgeschwächtem Asthmareaktion zu führen (Ramaprakash und Hogaboam, 2010). Unterstützend implizieren Untersuchungen von Albiger et al., dass TLR9<sup>-/-</sup> Mäuse *in vivo* anfälliger für eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* sind. Im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigten TLR9-defiziente Mäuse nach nasaler Infektion mit Pneumokokken insbesondere im Frühstadium der Infektion vermehrt Bakteriemien, verbunden mit einer signifikant höheren Letalität (Albiger et al., 2007). Es könnte spekuliert werden, dass die geringere Überlebensrate durch die fehlende TLR9-vermittelte IL-10 Sekretion und einer damit verbundenen überschießenden Immunreaktion bedingt ist. *In vivo* Untersuchungen an intranasal

mit *S.p.* infizierten Mäusen zeigten andererseits jedoch auch, dass die zusätzliche parallele Gabe von IL-10 zu einer verminderten inflammatorischen Antwort führte, die effektive Clearance störte und so zu einer signifikanten Reduktion des Überlebens führte (van der Poll et al., 1996). Weitere Untersuchungen wären daher notwendig, um die klinisch relevante Frage zu klären, inwieweit eine IL-10 Gabe nach klinischer Manifestation einer Pneumokokkenpneumonie zu einem verbesserten klinischen Ergebnis führen würde.

Als ein wichtiges Adapterprotein ist MyD88 maßgeblich an der Signaltransduktion des TLR9 beteiligt (Huang und Yang, 2010). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *S.p.*-induzierte IL-10 Sekretion in HEK293-Zellen durch den Einsatz von MyD88 siRNA vollständig blockiert werden konnte. Diese Beobachtungen bestätigen die von Lee et al. und Samarasinghe et al. beschriebene MyD88-abhängige IL-10 Sekretion in MyD88-defizienten Mäusen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* (Lee et al., 2007) bzw. in MyD88-defizienten dendritischen Zellen nach Stimulation mit CpG-DNA (Samarasinghe et al., 2006). Wie in Abschnitt 6.1.2 bereits diskutiert, könnten neben dem membranständigen TLR9 auch noch weitere zytosolische DNA-erkennende Rezeptoren eine Rolle spielen. Da der DNA-erkennende Rezeptor ZBP1 und weitere DNA Rezeptoren MyD88-unabhängig sind (Stetson und Medzhitov, 2006; Yanai et al., 2009), lässt die in dieser Arbeit beobachtete MyD88-abhängige IL-10 Sekretion eine Beteiligung von ZBP1 und weiteren DNA Rezeptoren (AIM2-beinhaltenes Inflammasom) unwahrscheinlicher erscheinen.

### **6.2.3 Src Tyrosinkinase-vermittelte IL-10 Sekretion**

Die Src Protein Tyrosinkinasefamilie spielt eine essentielle Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Immun- und Lungenepithelzellen (Okutani et al., 2006) und sind insbesondere wichtige Regulatoren der TLR-vermittelten Zytokinsekretion (Kuka et al., 2010; Smolinska et al., 2008). In humanen Makrophagen führte der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 zu einer signifikanten Inhibition einer LPS induzierten IL-10 Sekretion (Smolinska et al., 2008). Gleichfalls beobachteten Kuka et al. in humanen dendritischen Zellen eine signifikante Inhibition der TLR3- und TLR8-vermittelten IL-10 Sekretion durch den Src Inhibitor PP2 (Kuka et al., 2010). In Epithelzellen führte der Einsatz des Src Tyrosinkinaseinhibitors PP2 zu einer Blockierung der TLR2/TLR9 abhängigen Aktivierung nach Stimulation mit *H. pylori* (Chang et al., 2004). Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Src Tyrosinkinaseinhibitor PP2 zu einer signifikanten Inhibition der Pneumokokken induzierten IL-10 Sekretion in humanen Epithelzellen führte, wohingegen der

Einsatz der inaktiven homologen Kontrolle PP3 keinen signifikanten Einfluss auf die IL-10 Sekretion hatte. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Untersuchungen von Sanjuan et al., dessen Arbeitsgruppe eine Beteiligung der Src PTK an der Induktion TLR9-abhängiger Zytokine nach Stimulation mit CpG beschrieb (Sanjuan et al., 2006).

### **6.3 Die Interaktion von KLF4 am *il-10* Promoter**

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte bislang gezeigt werden, dass Pneumokokken TLR9 vermittelt eine KLF4 Expression und IL-10 Sekretion in humanen Epithelzellen induzieren. Dabei konnte eine gewisse Analogie im Hinblick auf das zeitliche Expressionsmuster und der an der Induktion beteiligten Rezeptoren beobachtet werden. Aufgrund dieser Beobachtungen sowie der aktuellen Literatur, die den Transkriptionsfaktor KLF4 u.a. in der Induktion von antiinflammatorischen Faktoren wie der eNOS in Endothelzellen (Hamik et al., 2007; Shen et al., 2009) beschreiben, sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Pneumokokken induzierten IL-10 Sekretion und KLF4 Expression in humanen Epithelzellen besteht. Liu et al. konnten bereits mehrere mutmaßliche KLF4 Bindungsstellen am *il-10* Promoter identifizieren (Liu et al., 2007). Diese Beobachtungen konnten qualitativ von der Arbeitsgruppe Liu et al. bestätigt werden, die mit Hilfe eines Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) in Makrophagen die Bindung von KLF4 an ein Bindungselement im *il-10* Promoter beschrieb (Liu et al., 2007).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte in der durchgeführten Chromatin-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor KLF4 nach Stimulation mit *S. pneumoniae* an den *il-10* Promoter bindet. Parallel dazu bindet die RNA-Polymerase auch an den *il-10* Promoter, welches ein Zeichen für stattfindende Transkription ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von KLF4 siRNA in humanen Epithelzellen zu einer signifikanten Blockade der Pneumokokken-induzierten IL-10 Sekretion führte. Gleichfalls führte in Experimenten von Liu et al. die Transfektion mit einer KLF4 Antisense-RNA zu einer signifikant verminderten IL-10 Sekretion nach Stimulation mit LPS (Liu et al., 2007). Im umgekehrten Fall resultierte die experimentelle Überexpression von KLF4 zu einer signifikanten Steigerung der IL-10 Sekretion (Liu et al., 2007).

Zusammengefasst konnten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass KLF4 als Transkriptionsfaktor nach Stimulation mit Pneumokokken an den *il-10* Promoter bindet und an diesem die Transkription von IL-10 induziert. Diese Beobachtungen bestätigen, dass es sich

bei dem Transkriptionsfaktor KLF4 um einen wichtigen Regulator der IL-10 Expression in Epithelzellen handeln könnte.

## 6.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit indiziert, dass KLF4 wesentlich zur Pneumokokken-DNA-TLR9 vermittelten Expression von IL-10 in humanen Atemwegsepithelzellen beiträgt.

Weitere Untersuchungen wären jedoch notwendig, um weitere Rezeptoren, Proteine und Kinasen über- und unterhalb des TLR9 zu charakterisieren und zu beschreiben. So wären weitere *in vitro* Experimente notwendig, um die an der KLF4-induzierten IL-10 Sekretion beteiligte Src Proteintyrosinkinase zu identifizieren. Darüberhinaus müssten die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen in anderen Zelltypen wie Makrophagen oder Endothelzellen nachvollzogen werden, um eine Aussage treffen zu können, ob die *S. pneumoniae*-induzierte KLF4 Expression und IL-10 Sekretion eine rein Epithel-spezifische Beobachtung ist. Des Weiteren könnte der Einfluss von weiteren KLF an der Modulation des Entzündungsgeschehens hin untersucht werden. Für den Transkriptionsfaktor KLF2 konnte ein antiinflammatorischer Effekt in Lungenepithelzellen bereits gezeigt werden (Zahlten et al., 2010). Interessanterweise unterscheiden sich trotz der hohen phylogenetischen Verwandtschaft von KLF2 und KLF4 die beiden Signalwege hinsichtlich der beteiligten PRRs (KLF2 Induktion über TLR2 und NOD2 vs. KLF4 wie in dieser Arbeit gezeigt über TLR9) sowie die beteiligten Kinasen (PI3k bei KLF2 vs Src Kinasen bei KLF4).

Weiterführende *in vivo* Experimente wären notwendig, um den genauen Einfluss des Transkriptionsfaktors KLF4 auf die IL-10 Sekretion in einem komplexeren biologischen System untersuchen zu können. So sollte in nachfolgenden Experimenten, die genauen Auswirkungen auf die IL-10 Sekretion, Morbidität sowie Letalität in *S. pneumoniae*-infizierten KLF4-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen studiert werden. Hingewiesen sei hier jedoch darauf, dass eine homozygote KLF4-Nullmutation in Mäusen zu früher postnataler Letalität führt (Katz et al., 2002). Dieses Problem konnte bereits durch die Generierung von gewebsspezifischen KLF4 Knockout-Mäusen (Cre/loxP System) erfolgreich im gastrischen Epithel adressiert werden (Katz et al., 2005).

Im Hinblick auf eine Beteiligung des TLR9 an der *S. pneumoniae*-induzierten KLF4 Expression und IL-10 Sekretion wären darüberhinaus sicherlich auch Infektionsversuche in TLR9-defizienten Mäusen sinnvoll, um auch hier die Beteiligung der besagten Signalwege *in vivo* zu verifizieren.

Vielversprechende *in vivo* Experimente von Albiger et al. implizieren, dass TLR9-defiziente Mäuse nach Infektion mit *S. pneumoniae* im Vergleich zu Wildtypmäusen eine höhere Letalität aufwiesen (Albiger et al., 2007). Die höhere Letalität könnte durch die fehlende IL-10 Wirkung und der damit vermehrt einhergehenden letal endenden überschießenden Immunreaktionen erklärt werden. Auf der anderen Seite zeigten *in vivo* Experimente von van der Poll et al. an Mäusen jedoch, dass die immunsuppressive Wirkung von IL-10 insbesondere bei Verabreichung in der frühen Phase des Entzündungsgeschehen eher die effektive Clearance von *S. pneumoniae* stört und somit zu einem reduziertem Überleben führte (van der Poll et al., 1996). Eine spätere Verabreichung von IL-10 wäre jedoch unter Umständen bedeutend für eine Limitierung einer überschießenden Immunreaktion, z.B. im Rahmen eines ARDS.

Somit wären weitere *in vivo* Studien notwendig, um eine abschließende Bewertung bezüglich der Bedeutung von IL-10 für den Verlauf und die Letalität im Krankheitsgeschehen der Pneumonie treffen zu können.

## 7. Zusammenfassung

Die Pneumonie ist die häufigste registrierte Infektionskrankheit in Industrienationen und weltweit dritthäufigste Todesursache. Dabei ist *Streptococcus pneumoniae* der mit Abstand häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Aufgrund der in den letzten Jahren weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen ist die Pneumokokkenpneumonie eine medizinisch bedeutende Erkrankung hoher volkswirtschaftliche Relevanz. Daher ist es ein Ziel infektiologischer Grundlagenforschung, die molekulare Pathogen-Wirtszellmechanismen der Pneumonie zu erforschen, um hieraus neue Therapiestrategien ableiten zu können.

Lungenepithelzellen sind neben alveolären Makrophagen erste Zielzellen einer Pneumokokkeninfektion. Während grundlegende Mechanismen der proinflammatorischen Zytokinexpression in Lungenepithelzellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* in Teilen bekannt sind, weiß man sehr wenig über die Regulation antiinflammatorischer Mediatoren. Interleukin-10 spielt eine wichtige Rolle bei der Beendigung der Entzündung und verhindert überschießende Immunreaktionen. Daher sollte in dieser Arbeit die Regulation des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Entzündungsgeschehen der Pneumonie untersucht und beteiligte Rezeptoren, Kinasen und Transkriptionsfaktoren analysiert werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnten Hinweise dafür gefunden werden, dass der Transkriptionsfaktor KLF4 ein zentraler Regulator der IL-10 Sekretion nach Stimulation mit *S. pneumoniae* darstellt. So führte die Stimulation von Lungenepithelzellen mit *S. pneumoniae* zunächst zu einer Freisetzung von bakteriellen unmethylierten DNA-Fragmenten, die vom endosomalen TLR9 detektiert wurden. Die Aktivierung des TLR9 führte daraufhin MyD88- und Src Proteintyrosinkinase-abhängig zu einer Induktion der KLF4 Expression. Die *S. pneumoniae* induzierte KLF4 Expression konnte jeweils durch den Einsatz eines TLR9 Inhibitors, MyD88 siRNA und einem Src Tyrosinkinasehemmer signifikant inhibiert werden. Die Chromatinimmunpräzipitation wies nach, dass der durch *S. pneumoniae*-induzierte Transkriptionsfaktor KLF4 an den *il-10* Promoter bindet und zeitgleich eine Transkription am *il-10* Promoter stattfindet. Mit Hilfe von KLF4-siRNA vermittelter Gensuppression konnte die herausragende Bedeutung des Transkriptionsfaktors KLF4 für die IL-10 Sekretion nach Stimulation mit *S. pneumoniae* in Lungenepithelzellen beschrieben werden (Abbildung 24).

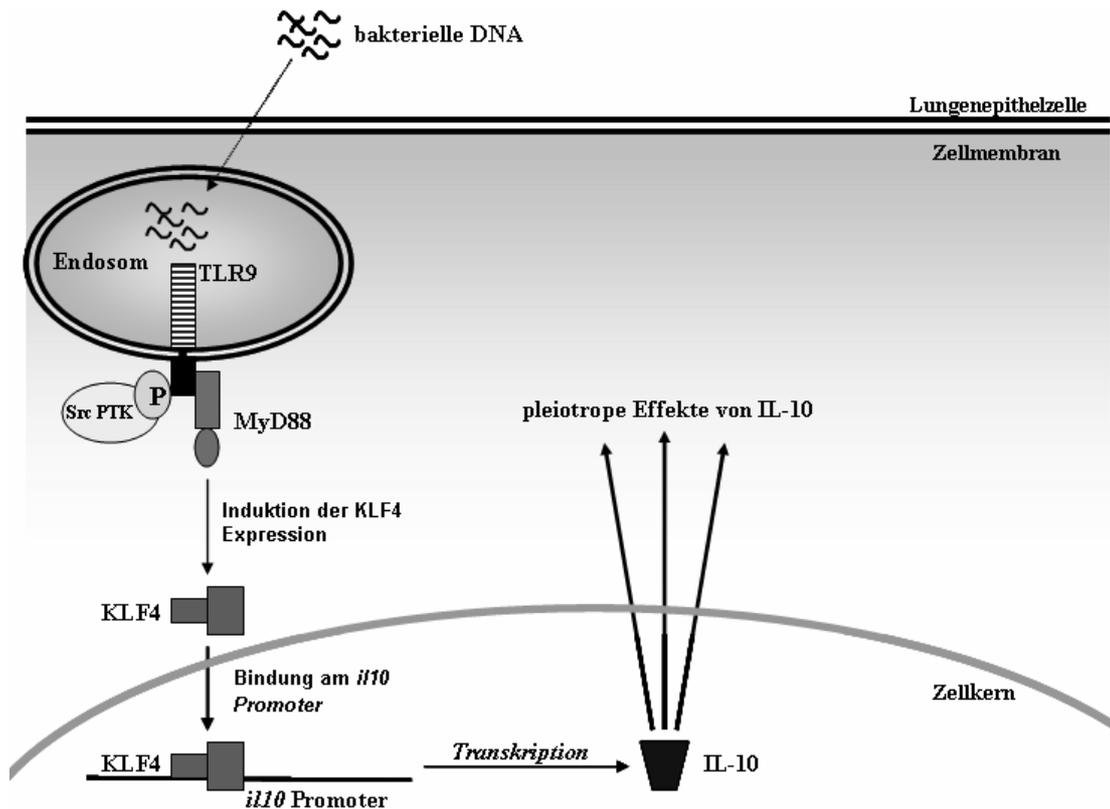


Abbildung 24: Graphische Darstellung der KLF4-abhängigen IL-10 Sekretion in humanen Lungenepithelzellen durch *S.p.*

Zusammenfassend konnte in dieser Studie der Transkriptionsfaktor KLF4 erstmalig als ein wichtiger und potenter Regulator des antiinflammatorischen Mediators IL-10 in Lungenepithelzellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* identifiziert werden. Gleichzeitig konnte eine Beteiligung des TLR9 und der Src Proteintyrosinkinasen an der *S. pneumoniae* induzierten IL-10 Sekretion herausgearbeitet werden. Diese Beobachtungen tragen somit zum besseren Verständnis der Entzündungsregulation bei der Pneumokokkenpneumonie bei.

## 8. Literaturverzeichnis

Achuthan A, Elsegood C, Masendycz P, Hamilton JA, und Scholz GM (2006). CpG DNA enhances macrophage cell spreading by promoting the Src-family kinase-mediated phosphorylation of paxillin. *Cell Signal* 18, 2252-2261.

Agarwal V, Asmat TM, Dierdorf NI, Hauck CR, und Hammerschmidt S (2010). Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of Src family of protein-tyrosine kinases, ERK and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* 285, 35615-35623.

Akira S, Uematsu S, und Takeuchi O (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, et al. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol* 9, 633-644.

Alder JK, Georgantas RW, Hildreth RL, et al. (2008). Kruppel-like factor 4 is essential for inflammatory monocyte differentiation in vivo. *J Immunol* 180, 5645-5652.

Ananda-Rajah MR, Charles PG, Melvani S, Burrell LL, Johnson PD, und Grayson ML (2008). Comparing the pneumonia severity index with CURB-65 in patients admitted with community acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 40, 293-300.

Anderson KV, Bokla L, und Nusslein-Volhard C (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791-798.

Armstrong L, Medford AR, Uppington KM, et al. (2004). Expression of functional toll-like receptor-2 and -4 on alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 241-245.

Armstrong L, und Millar AB (1997). Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 52, 442-446.

Atkins GB, und Jain MK (2007). Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res* 100, 1686-1695.

Aumeunier A, Grela F, Ramadan A, et al. (2010). Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One* 5, e11484.

Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, und Ziegler-Heitbrock HW (2000). Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 165, 1612-1617.

Bhan U, Lukacs NW, Osterholzer JJ, et al. (2007). TLR9 is required for protective innate immunity in Gram-negative bacterial pneumonia: role of dendritic cells. *J Immunol* 179, 3937-3946.

Bhatia M, und Moochhala S (2004). Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202, 145-156.

Bieker JJ (2001). Kruppel-like factors: three fingers in many pies. *J Biol Chem* 276, 34355-34358.

Boulet I, Ralph S, Stanley E, et al. (1992). Lipopolysaccharide- and interferon-gamma-induced expression of hck and lyn tyrosine kinases in murine bone marrow-derived macrophages. *Oncogene* 7, 703-710.

Buruiana FE, Sola I, und Alonso-Coello P (2010). Recombinant human interleukin 10 for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 11, CD005109.

Buttery J, und Moxon ER (2002). Capsulate bacteria and the lung: Childhood respiratory infections. *Br Med Bull* 61, 63-80.

Cao Z, Sun X, Icli B, Wara AK, und Feinberg MW (2010). Role of Kruppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* 116, 4404-4414.

Chang YJ, Wu MS, Lin JT, et al. (2004). Induction of cyclooxygenase-2 overexpression in human gastric epithelial cells by *Helicobacter pylori* involves TLR2/TLR9 and c-Src-dependent nuclear factor-kappaB activation. *Mol Pharmacol* 66, 1465-1477.

Chen ZY, Shie JL, und Tseng CC (2002). STAT1 is required for IFN-gamma-mediated gut-enriched Kruppel-like factor expression. *Exp Cell Res* 281, 19-27.

- Couper KN, Blount DG, und Riley EM (2008). IL-10: The master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180, 5771-5777.
- Dang DT, Bachman KE, Mahatan CS, Dang LH, Giardiello FM, und Yang VW (2000). Decreased expression of the gut-enriched Kruppel-like factor gene in intestinal adenomas of multiple intestinal neoplasia mice and in colonic adenomas of familial adenomatous polyposis patients. *FEBS Lett* 476, 203-207.
- de Roux A, Cavalcanti M, Marcos MA, et al. (2006). Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. *Chest* 129, 1219-1225.
- Dessing MC, Hirst RA, de Vos AF, und van der Poll T (2009). Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One* 4, e7993.
- Dogan S, Zhang Q, Pridmore AC, Mitchell TJ, Finn A, und Murdoch C (2010). Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4. *Microbes Infect* 1, 65-75.
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, et al. (2005). Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res* 6, 111-123.
- Eferl R, und Wagner EF (2003). AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 859-868.
- Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, Lebedeva MA, SenBanerjee S, und Jain MK (2005). Kruppel-like factor 4 Is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *J Biol Chem* 280, 38247-38258.
- File TM (2003). Community-acquired pneumonia. *The Lancet* 362, 1991-2001.
- Filippi CM, und von Herrath MG (2008). IL-10 and the resolution of infections. *J Pathol* 214, 224-230.
- Gallagher PM, Lowe G, Fitzgerald T, et al. (2003). Association of IL-10 polymorphism with severity of illness in community acquired pneumonia. *Thorax* 58, 154-156.

Ghaleb AM, Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, Hisamuddin IM, and Yang VW (2005). Kruppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res* 15, 92-96.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, and Nairn R (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-72.

Greene CM, and McElvaney NG (2005). Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53, 418-427.

Guan Y, Ranao DR, Jiang S, et al. (2010). Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling. *J Immunol* 184, 5094-5103.

Ha U, Lim JH, Jono H, et al. (2007). A novel role for IkappaB kinase (IKK) alpha and IKKbeta in ERK-dependent up-regulation of MUC5AC mucin transcription by *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* 178, 1736-1747.

Hamik A, Lin Z, Kumar A, et al. (2007). Kruppel-like factor 4 regulates endothelial inflammation. *J Biol Chem* 282, 13769-13779.

Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, and Rohde M (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 73, 4653-4667.

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

Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, and Suttorp N (2006). Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia-molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res* 7, 97.

Hirst K, O'Callaghan C, Andrew PW (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138, 195-201.

Hocke AC, Ermert M, Althoff A, et al. (2006). Regulation of interleukin IL-4, IL-13, IL-10, and their downstream components in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. Comparison of the constitutive expression between rats and humans. *Cytokine* 33, 199-211.

- Hof H, und Dörris R (2009). *Streptococcus pneumoniae*. In: Hof H., Dörris R., eds. Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene. Thieme, Stuttgart 4. Auflage, 326-328.
- Hoffken G, Lorenz J, Kern W, et al. (2005). [S3-guideline on ambulant acquired pneumonia and deep airway infections]. *Pneumologie* 59, 612-664.
- Hoffken G, Lorenz J, Kern W, et al. (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, e1-68.
- Hornung V, und Latz E (2010). Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol* 10, 123-130.
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-4537.
- Hu W, Hofstetter WL, Li H, et al. (2009). Putative tumor-suppressive function of Kruppel-like factor 4 in primary lung carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 5688-5695.
- Huang X, und Yang Y (2010). Targeting the TLR9-MyD88 pathway in the regulation of adaptive immune responses. *Expert Opin Ther Targets* 14, 787-796.
- Janeway CA, und Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, et al. (2007). Conventional T-bet+Foxp3- Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 204, 273-283.
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Aesif SW, et al. (2009). Nuclear factor kappaB, airway epithelium, and asthma: avenues for redox control. *Proc Am Thorac Soc* 6, 249-255.
- Jedrzejewski MJ (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65, 187-207.

Jounblat R, Kadioglu A, Mitchell TJ, and Andrew PW (2003). Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect Immun* 71, 1813-1819.

Kadioglu A, Coward W, Colston MJ, Hewitt CRA, and Andrew PW (2004). CD4-T-Lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. *Infect Immun* 72, 2689-2697.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, and Andrew PW (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Micro* 6, 288-301.

Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al. (2005). Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology* 128, 935-945.

Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 129, 2619-2628.

Kawai T, and Akira S (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13, 460-469.

Kawai T, and Akira S (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21, 317-337.

Kong L, Deng Z, Shen H, and Zhang Y (2011). Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173. *Mol Cell Biochem* 348, 11-19.

Kruger S, Pletz MW, and Rohde G (2010). Biomarkers in Community Acquired Pneumonia - What did we Learn from the CAPNETZ Study? *Pneumologie*.

Ku CL, von Bernuth H, Picard C, et al. (2007). Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J Exp Med* 204, 2407-2422.

Kuka M, Baronio R, Valentini S, et al. (2010). Src kinases are required for a balanced production of IL-12/IL-23 in human dendritic cells activated by Toll-like receptor agonists. *PLoS One* 5, e11491.

Kumagai Y, Takeuchi O, und Akira S (2008). Pathogen recognition by innate receptors. *J Infect Chemother* 14, 86-92.

Kumar H, Kawai T, und Akira S (2009). Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 420, 1-16.

Lee KS, Scanga CA, Bachelder EM, Chen Q, und Snapper CM (2007). TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. *Cellular Immunology* 245, 103-110.

Lee YL, Chen W, Chen LY, et al. (2010). Systemic and bronchoalveolar cytokines as predictors of in-hospital mortality in severe community-acquired pneumonia. *J Crit Care* 25, 176 e177-113.

Li HX, Han M, Bernier M, et al. (2010a). Kruppel-like factor 4 promotes differentiation by transforming growth factor-beta receptor-mediated Smad and p38 MAPK signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 285, 17846-17856.

Li X, Jiang S, und Tapping RI (2010b). Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49, 1-9.

Liang X, Moseman EA, Farrar MA, et al. (2010). Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 115, 5041-5052.

Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, et al. (2008). IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol*, 2579-2588.

Liu J, Zhang H, Liu Y, et al. (2007). KLF4 regulates the expression of interleukin-10 in RAW264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 575-581.

Liu K, Anderson GP, und Bozinovski S (2008). DNA vector augments inflammation in epithelial cells via EGFR-dependent regulation of TLR4 and TLR2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39, 305-311.

- Liu Y, Wen JK, Dong LH, Zheng B, and Han M (2010). Kruppel-like factor (KLF) 5 mediates cyclin D1 expression and cell proliferation via interaction with c-Jun in Ang II-induced VSMCs. *Acta Pharmacol Sin* 31, 10-18.
- Liu YW, Chen CC, Tseng HP, and Chang WC (2006). Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-kappaB-induced CCAAT/enhancer-binding protein delta in mouse macrophages. *Cell Signal* 18, 1492-1500.
- Lopez AD, and Mathers CD (2006). Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Ann Trop Med Parasitol* 100, 481-499.
- Malley R, Henneke P, Morse SC, et al. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1966-1971.
- Martin TR, and Frevert CW (2005). Innate Immunity in the Lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2, 403-411.
- Martinez R, Menendez R, Reyes S, et al. (2010). Factors associated with inflammatory cytokine patterns in community-acquired pneumonia. *Eur Respir J*, 1183-1190.
- McConnell BB, Ghaleb AM, Nandan MO, and Yang VW (2007). The diverse functions of Kruppel-like factors 4 and 5 in epithelial biology and pathobiology. *BioEssays* 29, 549-557.
- McConnell KW, McDunn JE, Clark AT, et al. (2010). *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia induce distinct host responses. *Crit Care Med* 38, 223-241.
- Mege J-L, Meghari S, Honstetter A, Capo C, and Raoult D (2006). The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6, 557-569.
- Méndez-Samperio P, Trejo A, and Pérez A (2008). *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) stimulates IL-10 production via the PI3K/Akt and p38 MAPK pathways in human lung epithelial cells. *Cell Immunol* 251, 37-42.
- Mikamo H, Johri AK, Paoletti LC, Madoff LC, and Onderdonk AB (2004). Adherence to, invasion by, and cytokine production in response to serotype VIII group B *Streptococci*. *Infect Immun* 72, 4716-4722.

- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, und O'Garra A (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, und Mosmann TR (1993). Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11, 165-190.
- Moreira LO, El Kasmi KC, Smith AM, et al. (2008). The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* 10, 2067-2077.
- Moscoso M, und Claverys JP (2004). Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol* 54, 783-794.
- Murphy KM, Travers P, und Walport M (2009). Einführung in die Immunologie und die angeborene Immunität. In: Murphy K.M., Travers P., Walport M., eds. *Janeway Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag *Auflage* 7, 1-37.
- Murray PJ (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol* 6, 379-386.
- N'Guessan PD, Hippenstiel S, Etouem MO, et al. (2006). *Streptococcus pneumoniae* induced p38 MAPK- and NF- $\kappa$ B-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L1131-1138.
- O'Brien KL, und Santosham M (2004). Potential Impact of Conjugate Pneumococcal Vaccines on Pediatric Pneumococcal Diseases. *Am J Epidemiol* 159, 634-644.
- O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374, 893-902.
- O'Grady E, Mulcahy H, Adams C, Morrissey JP, und O'Gara F (2007). Manipulation of host Kruppel-like factor (KLF) function by exotoxins from diverse bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 5, 337-341.
- Ohnesorge N, Viemann D, Schmidt N, et al. (2010). ERK5 activation elicits a vasoprotective endothelial phenotype via induction of KLF4. *J Biol Chem* 285, 26199-26210.

Okutani D, Lodyga M, Han B, und Liu M (2006). Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L129-141.

Opitz B, Hippenstiel S, Eitel J, und Suttorp N (2007). Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost* 98, 319-326.

Overturf GD (2000). Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics* 106, 367-376.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, und Fisher PB (2004). Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 22, 929-979.

Pilette C, Detry B, Guisset A, Gabriels J, und Sibille Y (2010). Induction of interleukin-10 expression through Fc $\alpha$  receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol Cell Biol* 88, 486-493.

Ramaprakash H, und Hogaboam CM (2010). Intranasal CpG therapy attenuated experimental fungal asthma in a TLR9-dependent and -independent manner. *Int Arch Allergy Immunol* 152, 98-112.

Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, et al. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res* 48, 1904-1909.

Ren T, Wen ZK, Liu ZM, et al. (2008). Targeting toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides enhances anti-tumor responses of peripheral blood mononuclear cells from human lung cancer patients. *Cancer Invest* 26, 448-455.

Ren T, Xu L, Jiao S, et al. (2009). TLR9 signaling promotes tumor progression of human lung cancer cell in vivo. *Pathol Oncol Res* 15, 623-630.

Robert-Koch-Institut (2010). Epidemiologischen Bulletin 30/2010, Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand: Juli 2010 at [www.rki.de/cln\\_169/nn\\_1493928/DE/Content/Infekt/EpidBull/archiv/2010/30\\_10,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/30\\_10.pdf](http://www.rki.de/cln_169/nn_1493928/DE/Content/Infekt/EpidBull/archiv/2010/30_10,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/30_10.pdf).

- Rothschild SI, Gautschi O, Haura EB, und Johnson FM (2010). Src inhibitors in lung cancer: current status and future directions. *Clin Lung Cancer* 11, 238-242.
- Sadikot RT, Han W, Everhart MB, et al. (2003). Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* 170, 1091-1098.
- Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S, und Ozato K (2006). Induction of an anti-inflammatory cytokine, IL-10, in dendritic cells after toll-like receptor signaling. *J Interferon Cytokine Res* 26, 893-900.
- Sanjuan MA, Rao N, Lai KT, et al. (2006). CpG-induced tyrosine phosphorylation occurs via a TLR9-independent mechanism and is required for cytokine secretion. *J Cell Biol* 172, 1057-1068.
- Santos-Sierra S, Golenbock DT, und Henneke P (2006). Toll-like receptor-dependent discrimination of streptococci. *J Endotoxin Res* 12, 307-312.
- Saraiva M, und O'Garra A (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170-181.
- Schaaf BM, Boehmke F, Esnaashari H, et al. (2003). Pneumococcal septic shock is associated with the interleukin-10-1082 gene promoter polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 476-480.
- Schmeck B, Huber S, Moog K, et al. (2006a). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L730-737.
- Schmeck B, Moog K, Zahlten J, et al. (2006b). Streptococcus pneumoniae induced c-Jun-N-terminal kinase- and AP-1 -dependent IL-8 release by lung epithelial BEAS-2B cells. *Respir Res* 7, 98.
- Schmeck B, Zahlten J, Moog K, et al. (2004). Streptococcus pneumoniae-induced p38 MAPK-dependent Phosphorylation of RelA at the Interleukin-8 Promotor. *J Biol Chem* 279, 53241-53247.
- Schröder NW, Morath S, Alexander C, et al. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of Streptococcus pneumoniae and Staphylococcus aureus activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2,

lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278, 15587-15594.

Sefton BM, and Shenolikar S (2001). Overview of protein phosphorylation. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 18*, Unit 18 11.

Sheller JR, Polosukhin VV, Mitchell D, Cheng DS, Peebles RS, and Blackwell TS (2009). Nuclear factor kappa B induction in airway epithelium increases lung inflammation in allergen-challenged mice. *Exp Lung Res* 35, 883-895.

Shen B, Smith RS, Jr., Hsu YT, Chao L, and Chao J (2009). Kruppel-like factor 4 is a novel mediator of Kallistatin in inhibiting endothelial inflammation via increased endothelial nitric-oxide synthase expression. *J Biol Chem* 284, 35471-35478.

Shields JM, Christy RJ, and Yang VW (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271, 20009-20017.

Sjolinder H, Mogensen TH, Kilian M, Jonsson AB, and Paludan SR (2008). Important role for Toll-like receptor 9 in host defense against meningococcal sepsis. *Infect Immun* 76, 5421-5428.

Skov Sorensen UB, Blom J, Birch-Andersen A, and Henrichsen J (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun* 56, 1890-1896.

Smolinska MJ, Horwood NJ, Page TH, Smallie T, and Foxwell BM (2008). Chemical inhibition of Src family kinases affects major LPS-activated pathways in primary human macrophages. *Mol Immunol* 45, 990-1000.

Stetson DB, and Medzhitov R (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.

Suzuki T, Chow CW, and Downey GP (2008). Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1348-1361.

Takaoka A, and Taniguchi T (2008). Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 60, 847-857.

- Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- Takeda K, und Akira S (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 17, 1-14.
- Takeda K, und Akira S (2007). Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol Chapter 14*, Unit 14 12.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169, 10-14.
- Tetreault MP, Wang ML, Yang Y, et al. (2010). Klf4 overexpression activates epithelial cytokines and inflammation-mediated esophageal squamous cell cancer in mice. *Gastroenterology* 139, 2124-2134.
- Thacker EL (2006). Lung inflammatory responses. *Vet Res* 37, 469-486.
- Thomas SM, und Brugge JS (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, und Waldmann H (2000). IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. *J Immunol* 165, 286-291.
- Tosi MF (2005). Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* 116, 241-249.
- van der Poll T, Marchant A, Keogh CV, Goldman M, und Lowry SF (1996). Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 174, 994-1000.
- van der Sluijs KF, van Elden LJR, Nijhuis M, et al. (2004). IL-10 Is an Important Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection. *J Immunol* 172, 7603-7609.
- von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, et al. (2006). Toll-like receptor 9 contributes to recognition of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin by Flt3-ligand generated dendritic cells. *Immunobiology* 211, 557-565.
- Welte T, und Kohnlein T (2009). Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network. *Semin Respir Crit Care Med* 30, 127-135.

Welte T, Marre R, und Suttorp N (2006). [What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?]. *Med Klin (Munich)* 101, 313-320.

Whitmarsh AJ, und Davis RJ (1999). Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. *Sci STKE* 1999, PE1.

Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, et al. (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 34, 1947-1954.

Wunderink RG, und Waterer GW (2005). Genetics of community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 26, 553-562.

Yanai H, Savitsky D, Tamura T, und Taniguchi T (2009). Regulation of the cytosolic DNA-sensing system in innate immunity: a current view. *Curr Opin Immunol* 21, 17-22.

Zahlten J, Steinicke R, Opitz B, et al. (2010). TLR2- and nucleotide-binding oligomerization domain 2-dependent Kruppel-like factor 2 expression downregulates NF-kappaB-related gene expression. *J Immunol* 185, 597-604.

Zhou Q, und Amar S (2007). Identification of signaling pathways in macrophage exposed to *Porphyromonas gingivalis* or to its purified cell wall components. *J Immunol* 179, 7777-7790.

Zhou Y, Hofstetter WL, He Y, et al. (2010). KLF4 inhibition of lung cancer cell invasion by suppression of SPARC expression. *Cancer Biol Ther* 9, 507-513.

Zimmerman RK (2005). If pneumonia is the "old man's friend", should it be prevented by vaccination? An ethical analysis. *Vaccine* 23, 3843-3849.

## **9. Anhang**

### **9.1 Veröffentlichungen**

#### **9.1.1 Originalarbeiten**

Zahlten J, Steinicke R, Opitz B, et al. (2010). TLR2- and nucleotide-binding oligomerization domain 2-dependent Kruppel-like factor 2 expression downregulates NF-kappaB-related gene expression. *J Immunol* 185, 597-604.

Zahlten J, Steinicke R, Bertrams W, et al. (2011). Bacterial DNA induced TLR9- and Src kinase-dependent expression of Kruppel-like factor 4 controlling IL-10 expression. *Status eingereicht*.

#### **9.1.2 Kongressbeiträge**

Zahlten J, Steinicke R, Hocke A, Opitz B, Schmeck M, Witzenrath M, Suttorp S, Hippenstiel S (2009). *Streptococcus pneumoniae* induced Kruppel-like Factor dependent IL-10 Expression in human Epithelial Cells. 2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology (Abstract)

Zahlten J, Hippenstiel S, Steinicke R, Witzenrath M, Opitz B, Eitel J, van Laak V, N'Guessan P, Schmeck M, Suttorp S (2009). Bakterielle DNA induziert IL-10 über TLR9 und Src-Kinasen abhängige Expression des Transkriptionsfaktors KLF4. 50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (Abstract)

Zahlten J, Hippenstiel S, Steinicke R, Vinzing M, Opitz B, Schmeck M, Witzenrath M, Suttorp S (2009). TLR2- und NOD2-vermittelte Aktivierung der PI3-Kinase reduziert durch Induktion von KLF2 Pneumokokken-assoziierte Expression pro-entzündlicher Gene. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (Abstract)

## 9.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Stefan Hippenstiel für die Bereitstellung des Themas und den zahlreichen Anregungen während meiner experimentellen Arbeit. Bei Frau Dr. med. vet. Janine Zahlten möchte ich mich ganz besonders für die stets intensive konstruktive Zusammenarbeit, hervorragende Betreuung und zügige Korrektur meiner Doktorarbeit bedanken. Ihnen beiden und vielen weiteren Mitarbeitern des Labors verdanke ich das in mir erweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Prof. Suttorp danke ich als Direktor der Medizinischen Klinik m.S. Infektiologie/Pneumologie recht herzlich in seiner Arbeitsgruppe tätig gewesen sein zu dürfen.

Den Technischen Assistentinnen Doris Stoll und Frauke Schreiber danke ich recht herzlich für die unermüdliche technische Unterstützung in meinen Experimenten. Der gesamten Arbeitsgruppe im CVK danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und für den Spaß, den wir beruflich und privat zusammen hatten.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meiner ganzen Familie für die vorbehaltlose Unterstützung. Frau Maureen Smyth bin ich für die moralische Unterstützung, ihrer Geduld und die unermüdliche Fähigkeit zur Motivation sehr dankbar.

### **9.3 Lebenslauf**

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

## 9.4 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Robert Steinicke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „KLF4-abhängige IL-10 Sekretion in humanen Lungenepithelzellen durch *Streptococcus pneumoniae*“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

18.11.2011

Robert Steinicke