

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

DISSERTATION

Die Bedeutung des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons  
für pulmonale Infektionen durch *Streptococcus pneumoniae*

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Lang

aus Waiblingen

Gutachter/in:       1. Prof. Dr. med. N. Suttorp  
                          2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. R. Bals  
                          3. Prof. Dr. med. R. R. Schumann

Datum der Promotion: 23.06.2013

# Inhaltsverzeichnis

|   |      |
|---|------|
| Inhaltsverzeichnis.....   | III  |
| Abbildungsverzeichnis.....  | VI   |
| Tabellenverzeichnis.....  | VII  |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                       | VIII |
| 1 Einleitung .....  | 1    |
| 1.1 Die Pneumonie .....   | 1    |
| 1.1.1 Definition, Einteilung und Erregerspektrum .....            | 1    |
| 1.1.2 Die ambulant erworbene Pneumonie .....                      | 2    |
| 1.1.2.1 Die Pneumonie durch <i>Streptococcus pneumoniae</i> ..... | 3    |
| 1.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                         | 4    |
| 1.2.1 Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i> .....             | 5    |
| 1.2.1.1 Die Polysaccharidkapsel.....                              | 6    |
| 1.2.1.2 Pneumolysin .....   | 7    |
| 1.2.1.3 Die Serinprotease PrtA .....                              | 7    |
| 1.2.2 Die Pneumokokken-Impfung .....                              | 8    |
| 1.3 Das Immunsystem .....   | 8    |
| 1.3.1 Immunabwehr durch das angeborene Immunsystem .....          | 8    |
| 1.3.1.1 Allgemeine Abwehrmechanismen.....                         | 8    |
| 1.3.1.2 Antimikrobielle Peptide .....                             | 9    |
| 1.3.1.3 Antimikrobielle Peptide der Lunge .....                   | 10   |
| 1.4 Das $\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon.....           | 11   |
| 1.4.1 Aufbau und Entstehung von $\alpha$ -MSH.....                | 11   |
| 1.4.2 Die Prohormon-Convertasen.....                              | 13   |
| 1.4.3 Die Melanocortin-Rezeptoren.....                            | 14   |
| 1.4.4 Antiinflammatorische Wirksamkeit von $\alpha$ -MSH.....     | 15   |
| 1.4.4.1 <i>in vitro</i> .....                                     | 15   |
| 1.4.4.2 <i>in vivo</i> .....                                      | 15   |
| 1.4.5 Antimikrobielle Eigenschaften von $\alpha$ -MSH .....       | 16   |
| 1.5 Ziel der Arbeit .....   | 18   |
| 1.5.1 Fragestellungen.....  | 19   |
| 2 Material .....  | 20   |
| 2.1 Materialien für die Zellkultur.....                           | 20   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.1.1   | Zelllinien .....                                       | 20 |
| 2.1.2   | Zellkulturflaschen und -schalen .....                  | 20 |
| 2.1.3   | Kulturmedien .....                                     | 20 |
| 2.1.4   | Weitere Substanzen für die Zellkultur.....             | 21 |
| 2.2     | Materialien für die Bakterien-Kultivierung .....       | 21 |
| 2.2.1   | <i>S. pneumoniae</i> : verschiedene Stämme.....        | 21 |
| 2.2.2   | Bakterien-Kulturmedium .....                           | 21 |
| 2.3     | Mauslungenproben .....                                 | 21 |
| 2.4     | Lösungen, Puffer und Antikörper für Western Blot ..... | 22 |
| 2.4.1   | Gele .....   | 23 |
| 2.4.1.1 | Trenngel.....  | 23 |
| 2.4.1.2 | Sammelgel .....  | 23 |
| 2.4.2   | Laufpuffer, Blotpuffer und Blockpuffer .....           | 24 |
| 2.4.3   | Antikörper .....                                       | 24 |
| 2.5     | Substanzen für ELISA .....                             | 25 |
| 2.5.1   | $\alpha$ -MSH-ELISA.....                               | 25 |
| 2.6     | Andere Chemikalien und Stimulantien.....               | 25 |
| 2.7     | Verbrauchssubstanzen .....                             | 26 |
| 2.8     | Geräte.....  | 26 |
| 3       | Methoden.....  | 27 |
| 3.1     | Kultivierung der Zellen .....                          | 27 |
| 3.2     | Kultivierung der Pneumokokken .....                    | 27 |
| 3.2.1   | Herstellung Hitze-inaktivierter Erreger.....           | 28 |
| 3.3     | Antimikrobielles Assay.....                            | 28 |
| 3.4     | Western Blot .....                                     | 29 |
| 3.4.1   | Probengewinnung für Western Blot.....                  | 29 |
| 3.4.2   | Proteinbestimmung nach Bradford .....                  | 29 |
| 3.4.3   | Gel-Elektrophorese.....                                | 30 |
| 3.4.4   | Das Blotten .....                                      | 30 |
| 3.5     | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....         | 31 |
| 3.5.1   | $\alpha$ -MSH-ELISA .....                              | 31 |
| 3.6     | Transfektion .....                                     | 32 |
| 3.7     | Aufbereitung der Mauslungenproben .....                | 32 |
| 3.8     | Statistische Auswertung .....                          | 32 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4       | Ergebnisse .....  | 33 |
| 4.1     | $\alpha$ -MSH ist gegen <i>S. pneumoniae</i> antimikrobiell wirksam .....                     | 33 |
| 4.2     | ACTH und $\alpha$ -MSH werden durch <i>S. pneumoniae</i> in pulmonalem Gewebe induziert ..... | 34 |
| 4.3     | Untersuchung verschiedener Pathogenitätsfaktoren.....   | 37 |
| 4.3.1   | Die Bedeutung von Kapsel und Pneumolysin für die $\alpha$ -MSH-Induktion .....                | 37 |
| 4.3.2   | Einsatz hitzeinaktivierter Erreger.....   | 39 |
| 4.3.3   | Die Serinprotease PrtA.....   | 40 |
| 4.3.3.1 | $\alpha$ -MSH wird durch PrtA induziert.....  | 40 |
| 4.3.3.2 | PrtA induziert die Prohormon-Convertase 2 .....   | 41 |
| 4.3.3.3 | $\alpha$ -MSH wird durch PrtA PC2-unabhängig induziert.....                                   | 42 |
| 4.4     | Untersuchung der Melanocortin-Rezeptoren MC1-R und MC5-R.....                                 | 45 |
| 5       | Diskussion .....  | 47 |
| 5.1     | Die pneumokokkenvermittelte Induktion von ACTH und $\alpha$ -MSH in pulmonalem Gewebe .....   | 47 |
| 5.2     | Vergleich verschiedener Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i> .....                       | 49 |
| 5.2.1   | Polysaccharidkapsel.....  | 49 |
| 5.2.2   | Pneumolysin und hitzeinaktivierte Erreger .....   | 50 |
| 5.2.3   | Die Serinprotease PrtA und die Prohormon-Convertase 2.....                                    | 51 |
| 5.3     | Die Melanocortin-Rezeptoren .....   | 52 |
| 5.3.1   | Der MC1-Rezeptor .....  | 52 |
| 5.3.2   | Der MC5-Rezeptor .....  | 53 |
| 5.4     | Die biologische Bedeutung von $\alpha$ -MSH .....   | 54 |
| 5.4.1   | Antimikrobielle Aktivität.....  | 54 |
| 5.4.2   | Antiinflammatorische Wirkung .....  | 56 |
| 5.5     | Ausblick .....  | 57 |
| 5.5.1   | Der therapeutische Einsatz antimikrobieller Peptide .....                                     | 58 |
| 5.5.2   | Pulmonale Pneumokokken-Infektionen und $\alpha$ -MSH.....                                     | 58 |
| 6       | Zusammenfassung .....   | 61 |
| 7       | Literaturverzeichnis.....   | 63 |
| 8       | Anhang .....  | 69 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1.1: Spektrum der isolierten Erreger bei ambulant erworbenen Pneumonien .....  | 2  |
| Abb. 1.2: Thorax-Röntgenbild einer durch <i>S. pneumoniae</i> verursachten Pneumonie .....  | 4  |
| Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines bekapselten<br><i>Streptococcus pneumoniae</i> .....                                | 5  |
| Abb. 1.4: Entstehung und Aufbau von $\alpha$ -MSH .....   | 13 |
| Abb. 4.1 A-B: $\alpha$ -MSH ist gegen <i>S. pneumoniae</i> antimikrobiell wirksam.....  | 34 |
| Abb. 4.2 A-B: ACTH und $\alpha$ -MSH werden nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in murinem<br>pulmonalem Gewebe induziert.....    | 35 |
| Abb. 4.2 C-D: ACTH und $\alpha$ -MSH werden durch eine Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> in<br>Bronchialepithelzellen induziert..... | 36 |
| Abb. 4.3.1 A-B: Auswirkung von Kapsel und Pneumolysin auf die ACTH- und $\alpha$ -MSH-<br>Induktion.....                              | 38 |
| Abb. 4.3.2 A-B: Hitzeinaktivierte Erreger bewirken keine ACTH- oder $\alpha$ -MSH-Induktion<br>.....                                  | 39 |
| Abb. 4.3.3.1: Die $\alpha$ -MSH-Induktion durch <i>S. pneu-moniae</i> in humanen<br>Bronchialepithelzellen ist PrtA-abhängig.....     | 40 |
| Abb. 4.3.3.2 A-B: Die PC2-Induktion durch <i>S. pneumoniae</i> in humanen<br>Bronchialepithelzellen ist PrtA-abhängig.....            | 41 |
| Abb. 4.3.3.3 A: <i>S. pneumoniae</i> induziert PC2-unabhängig $\alpha$ -MSH durch PrtA in<br>humanen Bronchialepithelzellen .....     | 42 |
| Abb. 4.3.3.3 B-C: <i>S. pneumoniae</i> induziert PC2-unabhängig $\alpha$ -MSH durch PrtA in<br>humanen Bronchialepithelzellen .....   | 44 |
| Abb. 4.4 A-C: <i>S. pneumoniae</i> induziert den MC1-R in pulmonalem Gewebe.....  | 46 |
| Abb. 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse .....  | 60 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tab. 2.1: Kulturmedium für BEAS-2B-Zellen.....                                      | 20 |
| Tab. 2.2: Coating-Medium zur Vorinkubation der Zellkulturflaschen und-schalen ..... | 20 |
| Tab. 2.3: Pneumokokken-Anzuchtmedium (THY).....                                     | 21 |
| Tab. 2.4: Phosphoprotein-Waschpuffer.....   | 22 |
| Tab. 2.5: Protein-Lysepuffer (1 ml).....  | 22 |
| Tab. 2.6: Proteinladepuffer 4x (Lämmli-Puffer) .....                                | 22 |
| Tab. 2.7: Trenngelpuffer (1,5M, pH 8,8).....  | 23 |
| Tab. 2.8: Trenngele .....   | 23 |
| Tab. 2.9: Sammelgelpuffer (0,5M, pH 6,8).....                                       | 23 |
| Tab. 2.10: Sammelgel .....  | 23 |
| Tab. 2.11: Laufpuffer (5x).....   | 24 |
| Tab. 2.12: Blotpuffer (10x).....  | 24 |
| Tab. 2.13: primäre Antikörper für Western Blot.....                                 | 24 |
| Tab. 2.14: Sekundäre Antikörper für Western Blot.....                               | 25 |
| Tab. 2.15: Verbrauchssubstanzen .....   | 26 |
| Tab. 2.16: Geräte .....   | 26 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| ACTH               | Adrenocorticotropes Hormon  |
| AK                 | Antikörper  |
| AKT                | Proteinkinase B   |
| ALI                | Akute Lungenverletzung ( engl.: Acute lung injury)  |
| APS                | Ammoniumpersulfat   |
| Aqua bidest.       | Aqua bidestillata   |
| BAL                | Broncho-alveoläre Lavage  |
| BEAS-2B            | Humane Bronchialepithelzelllinie  |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i>   |
| cAMP               | Cyklisches Adenosinmonophosphat   |
| CAP                | Ambulant erworbene Pneumonie (engl.: community acquired pneumonia)                            |
| CbpA               | Choline-binding protein A   |
| Cfu                | Kolonie-bildende Einheiten (engl.: colony forming units)                                      |
| CLIP               | Engl.: corticotropin-like intermediate lobe peptide   |
| COX-2              | Cyclooxygenase 2  |
| CpG                | unmethyliertes Cytosinphosphat-Guanosin   |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxiribonucleic acid)   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure (engl.: Ethylendiamintetraacid)                                  |
| ELISA              | Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest<br>(engl.: Enzyme-linked immuno sorbent assay)         |
| ERK                | Engl.: Extracellular regulated-signal kinase  |
| FCS                | Fötale Kalbserum (engl.: fetal calf serum)  |
| HAP                | Im Krankenhaus erworbene Pneumonie (engl.: Hospital acquired pneumonia)                       |
| HCAP               | Pneumonie im Zusammenhang mit Pflegeeinrichtungen<br>(engl.: Healthcare-associated pneumonia) |
| HCl                | Chlorwasserstoff (Salzsäure)  |
| HIV                | Humanes Immundefizienz-Virus  |
| IFN $\gamma$       | Interferon $\gamma$   |
| IgA                | Immunglobulin A   |
| IL                 | Interleukin   |
| kDa                | Kilodalton  |
| LPS                | Lipopolysaccharid   |
| LPXTG-Motiv        | Leu-Pro-Xaa-Thr-Gly-Motiv   |
| MALP2              | Macrophagen-aktivierendes Lipopetid 2   |
| MCR                | Melanocortin-Rezeptor   |
| MHC                | Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility Complex)                    |
| MOI                | Multiplizität der Infektion (engl.: Multiplicity of Infection)                                |
| mRNA               | Messenger-Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| MRSA                 | Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>                                     |
| MSSA                 | Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>                                       |
| NF $\kappa$ B        | Nuklearer Transkriptionsfaktor $\kappa$ B  |
| PAMP                 | Pathogen-assoziierte molekulare Muster<br>(engl.: Pathogen-associated molecular pattern) |
| PBS                  | Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: Phosphat Buffered Saline)                         |
| PC                   | Prohormon-Convertase   |
| PKC                  | Proteinkinase C  |
| <i>Ply</i>           | Pneumolysin  |
| PMA                  | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat  |
| PMSF                 | Phenylmethylsulfonylfluorid  |
| POMC                 | Proopiomelanocortin  |
| PRR                  | Muster-erkennender Rezeptor (engl.: Pattern-Recognition Receptor)                        |
| PrtA                 | Zellwand-assoziierte Serinprotease A   |
| PsaA                 | Pneumococcal surface adhesin A   |
| PspA                 | Pneumococcal surface protein A   |
| <i>S. aureus</i>     | <i>Staphylococcus aureus</i>   |
| <i>S. pneumoniae</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i>  |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat   |
| TEMED                | N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin  |
| TGF- $\beta$         | Transforming growth factor $\beta$   |
| THY                  | Todd-Hewitt-Hefeextrakt-Medium (engl.: Todd-Hewitt yeast extract)                        |
| TLR                  | Toll-like Rezeptor   |
| TNF $\alpha$         | Tumornekrosefaktor $\alpha$  |
| UV                   | Ultra-violett  |
| WHO                  | Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organisation)                           |
| wt                   | Wildtyp  |
| ZNS                  | Zentrales Nervensystem   |
| $\alpha$ -MSH        | Alpha-Melanozyten-Stimulierendes Hormon  |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Pneumonie

### 1.1.1 Definition, Einteilung und Erregerspektrum

Der Begriff „Pneumonie“ beschreibt eine entzündliche Erkrankung des Lungenparenchyms unterschiedlicher Genese. Als Ursache der Entzündung liegt häufig eine Infektion der Lunge mit pathogenen Erregern (Bakterien, Viren oder Pilzen) vor (Suttrop 2004); eine Pneumonie kann jedoch beispielsweise auch durch physikalische oder chemische Noxen sowie Kreislaufstörungen verursacht werden (Herold 2005). Nachfolgend wird der Begriff Pneumonie nur für Lungenentzündungen infektiöser Genese genutzt.

Klinisch werden Pneumonien in ambulant erworbene (engl.: CAP = „community acquired pneumonia“) oder nosokomial erworbene (engl.: HAP = „hospital acquired pneumonia“) eingeteilt. Eine ambulant erworbene Pneumonie liegt vor, wenn diese außerhalb des Krankenhauses erworben wurde. Als nosokomial erworben gelten Pneumonien, die zum Zeitpunkt einer Hospitalisierung noch nicht bestehen und frühestens nach 48 Stunden auftreten (Herold 2005). Als dritte Kategorie ist zusätzlich die sogenannte HCAP (engl.: „healthcare-associated pneumonia“) zu nennen, die im Zusammenhang mit dem Kontakt zu Pflegeeinrichtungen oder einer vorangegangenen Hospitalisierung steht (Zilberberg and Shorr 2009).

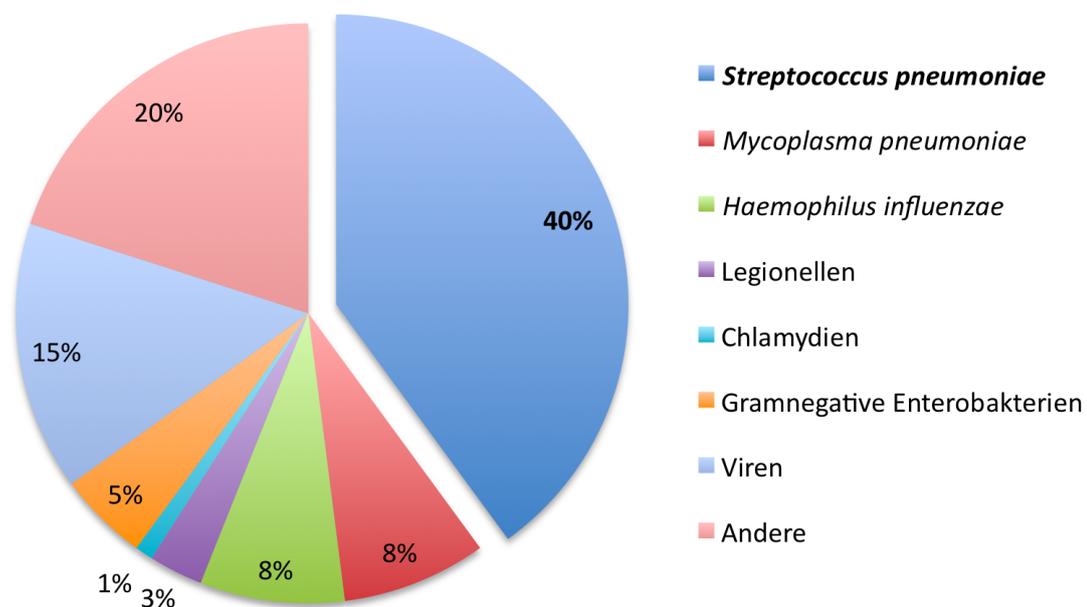
CAP und HAP unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihres Erregerspektrums. Bei ambulant erworbenen Pneumonien kann dieses nach Komorbidität und Alter weiter unterteilt werden. Bei jungen Patienten ( $\leq 65$  Jahre) ohne Vorerkrankungen liegt meist eine Infektion mit den Erregern *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oder Viren zu Grunde; bei Patienten mit zusätzlichen Erkrankungen und einem höheren Lebensalter dominieren *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, gramnegative Stäbchen und *Staphylococcus aureus* (Herold and Sailer 2004).

Das Erregerspektrum der HAP wird von gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Serratia* oder *Pro-*

*teus* dominiert (Herold and Sailer 2004) und ist dem der HCAP vergleichbar (Zilberberg and Shorr 2009).

### 1.1.2 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie besitzt weltweit eine hohe Morbidität und Mortalität und ist damit ein bedeutender volkswirtschaftlicher Kostenfaktor. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei 3 bis 10 Fällen auf 1000 Erwachsene pro Jahr. Die meisten CAP-Patienten (60-80%) können gut ambulant behandelt werden; die Letalität ist in diesem Falle mit maximal 2% niedrig. Es kommt jedoch zum sprunghaften Anstieg der Letalität bei Hospitalisation (10-15%) oder gar Aufnahme auf eine Intensivstation. In diesem Fall wurde eine Letalitätsrate von bis zu 50% beschrieben (Welte and Kohnlein 2009).



**Abb. 1.1: Spektrum der isolierten Erreger bei ambulant erworbenen Pneumonien**

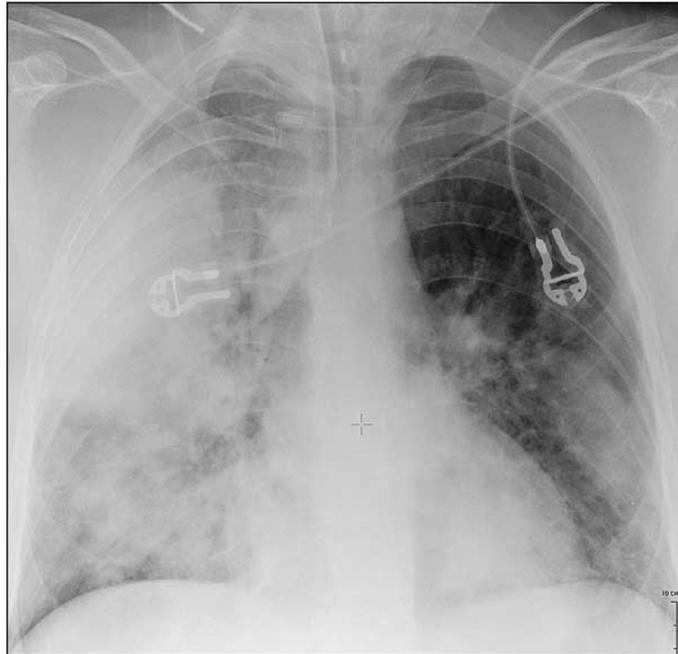
(modifiziert nach (Welte, Marre et al. 2006))

### 1.1.2.1 Die Pneumonie durch *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) ist der bei ambulant erworbenen Pneumonien am häufigsten isolierte Erreger; in der aktuellen Literatur variieren die genauen Zahlenangaben zwischen etwa 15% (Berjahn, Fishman et al. 2008) und bis zu mehr als 50% (Welte and Kohnlein 2009). Klinisch äußert sich die Pneumokokken-Pneumonie durch hohes Fieber mit starkem Krankheitsgefühl, Husten mit rotbraunem Sputum, klingenden Rasselgeräuschen in der Auskultation und ansteigenden Entzündungsparametern (Herold 2005). Bei etwa 20% der Fälle kommt es zu einer invasiven Pneumokokken-Erkrankung. Diese wird definiert durch das Auftreten von *S. pneumoniae* in Körperflüssigkeiten, die unter normalen Bedingungen als steril gelten, wie z.B. Blut, Liquor, Pleuraflüssigkeit oder Aszites (Pletz, Maus et al. 2008). Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten ist die invasive Pneumokokken-Pneumonie weiterhin mit einer hohen Letalität von 15-36% behaftet (Berjahn, Fishman et al. 2008). Neben alten Menschen und multimorbiden Patienten sind vor allem Kinder unter fünf Jahren betroffen.

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte kam es zu einem besorgniserregenden Anstieg der mono- und multiresistenten Pneumokokken. Der Anteil der Penicillin-resistenten Erreger in den USA wird derzeit auf 22-29% geschätzt; die Makrolid-Resistenzen korrelieren mit diesen Werten (Berjahn, Fishman et al. 2008). In Europa konnten durch das „European Antimicrobial Resistance Surveillance System“ (EARSS) ähnliche Daten erhoben werden: der Anteil der Penicillin-resistenten *S. pneumoniae* an den durch Pneumokokken verursachten Pneumonien schwankt je nach Land zwischen ca. 5% und 40% (Lode 2007).

Vor allem die zunehmende Resistenz gegen Makrolide stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar, da diese zu den meist verordneten Antibiotika bei ambulant erworbenen Pneumonien zählen (Metlay, Fishman et al. 2006).



**Abb. 1.2: Thorax-Röntgenbild einer durch *S. pneumoniae* verursachten Pneumonie**  
(mit Genehmigung von Professor Dr. med. H.-H. Jend ([www.jend.de](http://www.jend.de)))

## 1.2 *Streptococcus pneumoniae*

Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* wurde erstmalig 1881 unabhängig voneinander von Louis Pasteur und George Sternberg isoliert (Austrian 1981). Die Pneumokokken bilden eine  $\alpha$ -hämolyisierende Untergruppe der grampositiven Streptokokken. Der 0,5 bis 1,25  $\mu\text{m}$  große Erreger liegt meist in Form ovoid- oder lanzettförmiger Diplokokken vor. Er unterscheidet sich von anderen  $\alpha$ -hämolyisierenden Streptokokken-Spezies durch seine Empfindlichkeit gegen Optochin (Robson, Essengue et al. 2007).

Pneumokokken besiedeln den Nasen-Rachen-Raum von bis zu 50% der gesunden Kinder und etwa 2,5% der Erwachsenen (Pletz, Maus et al. 2008). Die Infektion erfolgt häufig endogen durch eine vorübergehende Schwächung des Immunsystems; eine aerogene Transmission ist jedoch ebenfalls möglich. Virulente Pneumokokkenstämme besitzen eine Kapsel aus Polysaccharid, die phagozytosehemmend wirkt. Derzeit sind 91 verschiedene Pneumokokken-Kapselantigene bekannt. Nach diesen verschiedenen Kapselantigenen erfolgt die Einteilung in Serotypen, eine weitere Einteilung in Serogruppen erfolgt durch kreuzreagierende Antikörper.

Pneumokokken sind nach wie vor die bei ambulant erworbenen Pneumonien am häufigsten isolierten Erreger. Sie sind zudem Verursacher von anderen, mitunter schweren

Infektionen, wie beispielsweise der Otitis media, Meningitis oder Sepsis. Besonders die Sepsis durch *S. pneumoniae* ist mit einer hohen Komplikationsrate assoziiert (Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch Instituts Nr. 31, 4.8.2006). Nach Angaben der WHO sterben weltweit etwa zwei Millionen Menschen an Erkrankungen, die durch *S. pneumoniae* verursacht werden. Allein in Deutschland betrifft dies etwa 12000 Menschen jährlich (Reinert 2002).



**Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines bekapselten *Streptococcus pneumoniae***  
(mit Genehmigung von Professor Dr. med. B. Gray, University of Illinois, Peoria, USA)

### 1.2.1 Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Pneumokokken besitzen eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die für die Anheftung an die Wirtszellen und deren Schädigung essentiell sind. Wichtige Rollen spielen hierbei vor allem die Polysaccharidkapsel und das zytolysierende Pneumolysin. Weiterhin besitzt *S. pneumoniae* eine große Anzahl von Enzymen und Oberflächenproteinen, die zur Virulenz des Erregers beitragen. Auf diese soll in diesem Rahmen jedoch nur oberflächlich eingegangen werden, da sie nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

Zu den Enzymen gehört die Gruppe der Autolysine (führen zur Autolyse der bakteriellen Zellwand), Hyaluronidase (erleichtert den Eintritt des Erregers ins Gewebe durch den Abbau von Hyaluronsäure), sowie Neuraminidasen (führen zur Abspaltung von Sialinsäuren von Amino-Glykoproteinen) und Superoxid-Dismutasen (wandeln Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid um), für die im Tiermodell ebenfalls eine Bedeutung für die Virulenz von *S. pneumoniae* nachgewiesen werden konnte (Mitchell 2000).

Die Oberflächenproteine können in drei große Gruppen eingeteilt werden:

- Cholin-bindende Proteine (z.B. PspA, CbpA)
- Lipoproteine (z.B. PsaA)
- Proteine mit einem LPXTG-Motiv (z.B. Hyaluronidase, Neuraminidasen)

Sie erleichtern durch ihre Strukturen die Adhäsion bzw. die Aufnahme des Erregers in die Wirtszelle und spielen so eine bedeutende Rolle für die Pathogenese pneumokokken-bedingter Erkrankungen (Hammerschmidt 2006). Durch ihre antigenen Eigenschaften und somit Stimulation der Antikörper-Bildung kommt ihnen zudem große Bedeutung für die Weiterentwicklung von Impfstoffen zu (Kadioglu, Weiser et al. 2008).

Die Funktion einer Vielzahl der verschiedenen Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* ist derzeit nur teilweise geklärt und ist Gegenstand intensiver Forschung. Im Folgenden soll nun auf diejenigen Virulenzfaktoren näher eingegangen werden, die im Zusammenhang mit dieser Studie stehen.

#### **1.2.1.1 Die Polysaccharidkapsel**

Für die Virulenz von besonderer Relevanz ist die Polysaccharidkapsel, die bei den verschiedenen Serotypen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Dicke der Kapsel variiert zwischen 200 und 400 nm. Durch die Polysaccharidkapsel wird die Adhärenz an die Wirtszelle bestimmt: Die in der Bakterienzellwand verankerten Oponine werden verdeckt, so dass die Anhaftung an Atemwegsepithelien im Vergleich zu nichtbekapselten Erregern reduziert ist. Der Erreger kann so der komplement-vermittelten Phagozytose entgehen (Melin, Jarva et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass durch bekapselte Erreger – im Vergleich zu unbekapselten Pneumokokken – signifikant weniger phagozyten-aktivierende Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induziert werden (Martner, Skovbjerg et al. 2009). Auch die serotypspezifische Dicke der Polysaccharidkapsel scheint für die Virulenz von Bedeutung zu sein: Je dicker die Kapsel, desto virulenter ist der Erreger.

Es ist bekannt, dass eine reduzierte Kapselexpression die Adhärenz der Pneumokokken an die Zellen und die effiziente Kolonisation begünstigt. Interessanterweise scheinen bekapselte Erreger beim engen Kontakt zu respiratorischen Epithelzellen die Expression ihrer Kapsel zu reduzieren (Kadioglu, Weiser et al. 2008). Ohne Kapsel scheint eine Kolonisation jedoch nicht möglich zu sein (Magee and Yother 2001).

### 1.2.1.2 Pneumolysin

Das porenbildende Toxin Pneumolysin ist ebenfalls ein bedeutender Virulenzfaktor, der bei allen klinisch relevanten Pneumokokkenisolaten zu finden ist. Es gehört zur Familie der Cholesterol-abhängigen Zytolysine und befindet sich im Zytoplasma der Erreger. Nach Autolyse der Pneumokokken wird das Pneumolysin freigesetzt. In hohen Konzentrationen wirkt Pneumolysin zytolytisch: Etwa 40 der 53 kDa schweren Proteine oligomerisieren in der Zellwand der Wirtszelle zu transmembranen Poren, die zum Zusammenbruch des Membranpotentials, damit Verlust des inneren Ionenmilieus und nachfolgender Lyse der Zelle führen (Kadioglu, Weiser et al. 2008). In niedrigeren Konzentrationen, die möglicherweise in der frühen Phase der Infektion vorherrschen, ist weiterhin ein breites Spektrum an Effekten, wie z.B. Apoptoseinduktion, Komplementaktivierung oder die Induktion proinflammatorischer Reaktionen von Immunzellen durch Pneumolysin bedingt (Hirst, Kadioglu et al. 2004). Außerdem vermittelt Pneumolysin eine inhibitorische Wirkung auf den Zilienschlag des respiratorischen Flimmerepithels, die Induktion von Zytokinen sowie Chemotaxis und T-Zell-Aktivierung (Kadioglu, Weiser et al. 2008).

Eine Inaktivierung des Pneumolysin-Gens führt zu einer reduzierten Virulenz der Erreger. Pneumolysin-defiziente Mutanten des *S. pneumoniae*-Wildtyps D39 führten in einem Maus-Sepsis-Modell nicht wie der Wildtyp zur akuten Sepsis, sondern zur chronischen Bakteriämie. Pneumolysin schien also die Immunantwort des Wirts zu verzögern, wodurch sich der Erreger ungestört vermehren und so die stärker invasive Erkrankung hervorrufen konnte (Benton, Everson et al. 1995).

### 1.2.1.3 Die Serinprotease PrtA

Die Serinprotease PrtA ist ein Oberflächenprotein der Pneumokokken und wurde erstmals 2001 von Bethe und Kollegen beschrieben. Es konnte nachgewiesen werden, dass sie der Familie der Subtilisin-ähnlichen Proteasen (auch Subtilasen genannt) angehört. Sie ist mit Proteasen, die in Laktokokken, Laktobazillen und Streptokokken mit einer Endopeptidase-Aktivität beschrieben wurden, verwandt. Proteasen können zur Virulenz der Erreger durch Spaltung von Wirtsproteinen, wie z.B. von Immunglobulinen oder Komplementfaktoren, beitragen. PrtA wird als Precursor-Protein gebildet und unterliegt dann einem Reifungsprozess. Die Tatsache, dass Patienten Antikörper gegen PrtA bilden, gibt Hinweise darauf, dass dieses Protein immunogen wirkt und eine wichtige Rolle bei Pneumokokken-Infektionen spielen könnte (Bethe, Nau et al. 2001).

## **1.2.2 Die Pneumokokken-Impfung**

In Deutschland gibt es derzeit eine Zulassung für zwei Pneumokokken-Impfstoffe. Seit Mitte der 80er Jahre existiert eine 23-valente Impfung, die eine Infektion mit den 23 häufigsten Serotypen – die etwa 80% der Erkrankungen beim Erwachsenen verursachen – verhindert. Seit 2001 ist zudem ein 7-valenter Konjugate-Impfstoff für Kinder erhältlich, bei dem die Kapselpolysaccharide mit hochimmunogenem nicht-toxischem Diphtherietoxin konjugiert wurden (Reinert 2006). Die Impfung wird von der ständigen Impfkommission des Robert-Koch-Instituts (STIKO) für Kinder unter fünf Jahren, Erwachsene ab 60 Jahren sowie für immunsupprimierte Menschen empfohlen. Die Inzidenz der Pneumokokkenerkrankungen konnte so deutlich reduziert werden (Pilishvili, Lexau et al.).

## **1.3 Das Immunsystem**

Das Immunsystem schützt den Menschen vor Infektionen mit verschiedenen Pathogenen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) und besitzt zudem die Fähigkeit, fremde Zellen von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Außerdem detektiert und bekämpft es veränderte körpereigene Zellen. Eine Unterteilung des Immunsystems kann in humorale und zelluläre Bestandteile sowie in angeborenes und adaptives Immunsystem erfolgen. Nach Eindringen eines Pathogens in den Organismus erfolgt zunächst die schnelle Immunantwort durch das unspezifische angeborene Immunsystem, verzögert erfolgt die spezifische Abwehrreaktion der adaptiven Immunität, an welcher unter anderem B- und T-Lymphozyten beteiligt sind. Die angeborene Immunität aktiviert die adaptive Immunität des Organismus und wird zusätzlich durch Faktoren der spezifischen Immunität verstärkt und reguliert, so dass eine kontrollierte und gezielte Erregerabwehr gewährleistet werden kann (Hahn 2001; Kumagai, Takeuchi et al. 2008).

Aufgrund des Fokus dieser Arbeit soll im Weiteren nur auf die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems näher eingegangen werden.

### **1.3.1 Immunabwehr durch das angeborene Immunsystem**

#### **1.3.1.1 Allgemeine Abwehrmechanismen**

Das angeborene Immunsystem verteidigt den Organismus schnell und unspezifisch gegen ein breites Spektrum von Erregern. Zu seinen Bestandteilen gehören unter anderem der mukoziliäre Apparat des Respirationstrakts, das Komplement-System, Zytoki-

ne, phagozytierende Zellen, wie z.B. neutrophile Granulozyten und Makrophagen, sowie die Gruppe der antimikrobielle Peptide, zu denen auch  $\alpha$ -MSH gezählt wird. Auf diese Gruppe soll im Folgenden gesondert eingegangen werden.

Durch Muster-Erkennungsrezeptoren („pattern recognition receptors“ = PRR) werden bestimmte Bestandteile der Pathogene vom angeborenen Immunsystem des Wirtsorganismus erkannt. Diese Bestandteile werden „pathogen-assoziierte molekulare Muster“ genannt („pathogen-associated molecular patterns“ = PAMP). Nachfolgend kommt es zur Produktion proinflammatorischer Zytokine, zur Phagozytose und zur Antigen-Präsentation. Innerhalb der Gruppe der PRR nehmen die Toll-like Rezeptoren (TLR) eine wichtige Stellung ein und sind für die Abwehr von *S. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem bedeutsam.

Die TLR können sowohl auf den Oberflächen der Wirtszellen als auch intrazellulär vorliegen oder aber sezerniert werden und erkennen ein breites Spektrum an für den Wirt potentiell pathogenen Mikroorganismen. Zu den Erregerbestandteilen, die durch diese Rezeptoren erkannt werden, gehören beispielsweise Lipopolysaccharid, bakterielles Peptidoglykan, Doppelstrang-RNA von bestimmten Viren oder Mannose von Pilzen (Krishnan, Selvarajoo et al. 2007). Die Hauptaufgabe der TLR besteht darin, eingedrungene Pathogene zu erkennen und eine Immunantwort des angeborenen und adaptiven Immunsystems zur Bekämpfung dieser und der eventuell entstandenen Infektion einzuleiten (Paterson and Mitchell 2006).

Durch Bindung von Liganden an die Toll-like Rezeptoren werden Signalkaskaden ausgelöst, die durch die Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur nachfolgenden Bildung proinflammatorischer Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Proteine des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC), antiapoptotischer Proteine und zur Induktion von antimikrobiellen Peptiden führen (Hertz, Wu et al. 2003; Mogensen, Paludan et al. 2006). Auch gibt es Hinweise, dass es TLR-vermittelt zur vermehrten Bildung des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 kommen kann (Adib-Conquy, Moine et al. 2003).

### **1.3.1.2 Antimikrobielle Peptide**

Antimikrobielle Peptide (AMP) besitzen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems ebenfalls eine hohen Stellenwert für die Immunabwehr. Gemein ist dieser heterogenen Gruppe das Vorkommen in Vertebraten, Pflanzen und Bakterien. Über 700 antimikrobielle Peptide konnten derzeit beschrieben werden (Rossi, Rangasamy et al.

2008). Es handelt sich hierbei um Peptide mit relativ geringem Molekulargewicht (per definitionem weniger als 100 Aminosäuren), die ein breites Spektrum an eindringenden Mikroorganismen erkennen und bekämpfen können. Zusätzlich kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen. Ihre Bildung erfolgt in verschiedenen Zelltypen, unter anderem in Abwehrzellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Keratinozyten, Atemwegsepithelzellen und im Verdauungstrakt.

Auf Grund ihrer unterschiedlichen Strukturen kann eine grobe Unterteilung der beim Menschen gebildeten antimikrobiellen Peptide in vier große Gruppen erfolgen: Unterschieden werden Defensine, Cathelicidin, S100-Proteine und Ribonukleasen (Harder, Glaser et al. 2007).

Der antimikrobielle Wirkmechanismus dieser Peptide beruht auf deren positiver Ladung. Da die Oberflächen der eindringenden Mikroorganismen meist negativ geladen sind, kommt es zur Anziehung, Bindung und Einlagerung der antimikrobiellen Peptide an bzw. in die Bakterienmembran. Die Membran verliert dadurch an Stabilität, es kommt zur Porenbildung und zum Verlust intrazellulär gelegener Zellbestandteile mit nachfolgender Lyse (Harder, Glaser et al. 2007). Auch kommt es zur Bindung an proinflammatorische Stoffe wie LPS, Lipoteichonsäure oder DNA, die von den Mikroorganismen freigesetzt werden. Durch diesen Effekt wird eine unerwünschte überschießende Immunantwort durch die Wirtszellen verhindert (Devine 2003).

### **1.3.1.3 Antimikrobielle Peptide der Lunge**

Die Lunge zählt neben Haut und Darm zu den „Barriereorganen“, die täglich einer Vielzahl von pathogenen Erregern ausgesetzt sind und somit in besonderem Maße durch Infektionen bedroht werden. Dazu beitragende Faktoren sind die ausgesprochen große Oberfläche von ca. 150 m<sup>2</sup>, eine dünne Epithelschicht und eine sehr gute Durchblutung (Rogan, Geraghty et al. 2006). Die schnelle, unspezifische Verteidigung gegen eingedrungene Pathogene durch das angeborene Immunsystem ist für die Abwehr von pulmonalen Infektionen von herausragender Bedeutung.

Neben dem speziellen anatomischen Aufbau der oberen Atemwege, durch den gröbere Partikel (> 5 µm) bereits von der Nasenschleimhaut und durch mukoziliäre Clearance des respiratorischen Flimmerepithels vom Eindringen in die tieferen Atemwege abgehalten werden, sowie der zellulären Abwehr durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen, tragen hierzu auch eine Vielzahl antimikrobiell wirksamer Stoffe bei (Tsai and

Grayson 2008). Dazu zählen neben Lactoferrin, IgA, Lysozyme, Phospholipase A<sub>2</sub> etc. auch die antimikrobiellen Peptide  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensin sowie Cathelicidin, die von neutrophilen Granulozyten und Atemwegsepithelien gebildet werden. Sie werden teils dauerhaft exprimiert, teilweise wird ihre Bildung durch verschiedene Stimuli induziert. Die antimikrobiellen Peptide sind in vielen Fällen in der Lage, eingedrungene Mikroorganismen direkt durch die Depolarisation und Zerstörung ihrer Zellmembranen zu eliminieren (Devine 2003).

## 1.4 Das $\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon

Das  $\alpha$ -Melanozyten stimulierende Hormon ( $\alpha$ -MSH), ein 13 Aminosäuren-Polypeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 1,6 kDa, gehört neben dem adrenocortikotropen Hormon (ACTH),  $\beta$ -MSH und  $\gamma$ -MSH zur Gruppe der Melanocortine. Dieser Name leitet sich von der Eigenschaft der Melanocortine ab, sowohl Pigmentbildung als auch Steroidbiosynthese in der Zona glomerulosa und Zona fasciculata in der Nebennierenrinde zu stimulieren (Bohm and Luger 2004). Alle Melanocortine gehen aus dem Prohormon Proopiomelanocortin (POMC) durch posttranslationale Veränderungen hervor; sie teilen sich eine gemeinsame Aminosäuresequenz (siehe Abb. 1.4) (Tatro 2000).

Für alle Melanocortine konnten antipyretische Eigenschaften nachgewiesen werden, die sie über die Bindung an die Melanocortin-Rezeptoren vermitteln. Meist konzentriert man sich jedoch auf das antipyretische und antiinflammatorische Potential von  $\alpha$ -MSH (Roth 2006).

Neben der Pigmentregulation und einer Beteiligung an der Regulierung des Energiestoffwechsels wurden für  $\alpha$ -MSH in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten eine Vielzahl von antiinflammatorischen und antimikrobiellen Effekten beschrieben, so dass es zu den antimikrobiellen Peptiden gezählt wird.

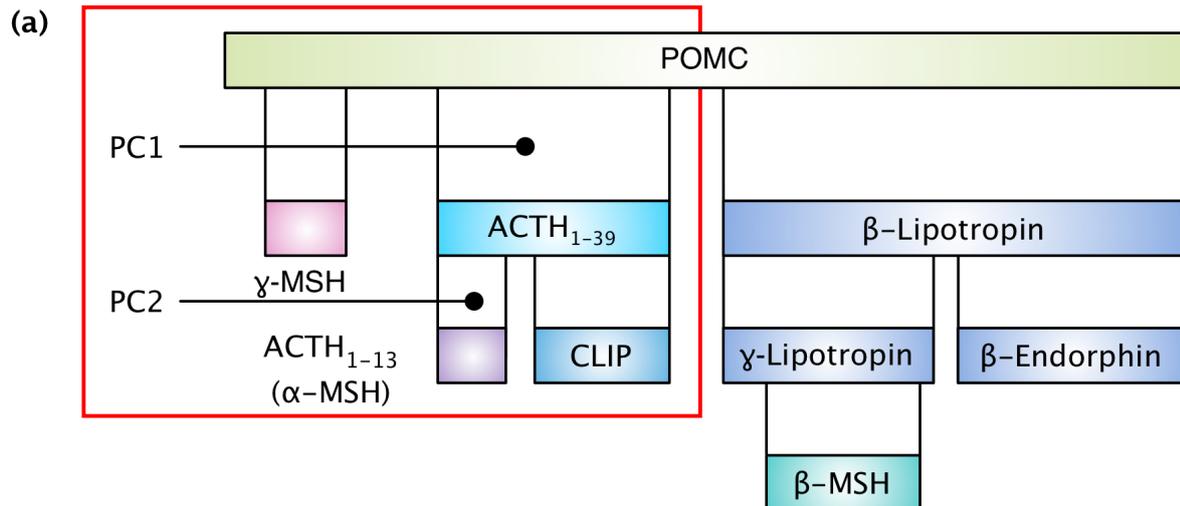
Die Expression von  $\alpha$ -MSH in Haut, Lunge und Darm – drei Organsysteme mit Barrierefunktion und direktem Kontakt zur Umwelt – lässt darauf schließen, dass  $\alpha$ -MSH ein bedeutender Bestandteil der angeborenen Immunabwehr ist (Maaser, Kannengiesser et al. 2006).

### 1.4.1 Aufbau und Entstehung von $\alpha$ -MSH

Alle Melanocortine gehen durch posttranslationale Veränderungen aus dem etwa 32 kDa schweren POMC hervor. Dieses Prohormon wird von vielen verschiedenen Gewe-

ben und Zelltypen exprimiert, hauptsächlich jedoch in Hypophyse, Haut und Hypothalamus (Pritchard and White 2007). POMC wird durch die Prohormon-Convertasen (PC) 1 bzw. 2 proteolytisch gespalten (Brzoska, Luger et al. 2008). Neben den bereits erwähnten Melanocortinen entstehen aus POMC zusätzlich Lipotropine und Endorphine, welche jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren und auf die daher in diesem Zusammenhang nicht näher eingegangen werden soll.

Durch die Spaltung von POMC entstehen Pro-ACTH und ACTH. Das 4,5 kDa große ACTH wird durch die PC2 weiter in CLIP (corticotropin-like intermediate lobe peptide) und  $\alpha$ -MSH gespalten.  $\alpha$ -MSH entspricht den ersten 13 Aminosäuren von ACTH (Pritchard and White 2007). Von besonderer Bedeutung ist zusätzlich das C-terminale Tripeptid KPV (Lys-Pro-Val) von  $\alpha$ -MSH, dem eine eigene antimikrobielle Wirkung zugesprochen wird (Cutuli, Cristiani et al. 2000).



**Abb. 1.4: Entstehung und Aufbau von α-MSH**

(a): α-MSH und die anderen Melanocortine entstehen durch posttranslationale endoproteolytische Spaltung durch die PC1 und PC2 aus POMC

(b): Die Melanocortine teilen sich eine gemeinsame Aminosäuresequenz HFRW = His-Phe-Arg-Trp (modifiziert nach (Getting 2002))

### 1.4.2 Die Prohormon-Convertasen

Neuropeptide und Peptidhormone, zu denen auch POMC zählt, werden als inaktive Propeptide synthetisiert und durchlaufen verschiedene Modifikationen, bevor sie gewebsspezifisch als aktive Peptide freigesetzt werden. An diesen Vorgängen sind verschiedene Enzyme beteiligt, unter anderem die Subtilisin/Kexin-ähnlichen Pro-Proteine, zu denen Furin und die Prohormon-Convertasen PC1, PC2, PACE4, PC4, PC5/6 und PC7/8 zählen.

Die endoproteolytische Spaltung von POMC zu ACTH und α-MSH wird von der PC1 (die früher auch als PC3 bekannt war) und der PC2 katalysiert (Berman, Mzhavia et al. 2001). Ihre Expression konnte außer in neuroendokrinen aktiven Zellen in verschiedenen Zelltypen der Haut nachgewiesen werden (Bohm and Luger 2004).

### 1.4.3 Die Melanocortin-Rezeptoren

$\alpha$ -MSH und die anderen Melanocortine vermitteln ihre biologischen Effekte durch Bindung an sogenannte Melanocortin-Rezeptoren. Fünf Subtypen dieser Rezeptoren sind derzeit bekannt; sie werden MC1-Rezeptor bis MC5-Rezeptor genannt (Getting 2006). Es handelt sich hierbei um transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die über die Aktivierung der Adenylatzyklase zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen (Getting 2006). Die verschiedenen natürlichen und synthetisch produzierten Melanocortine binden mit unterschiedlicher Affinität an die unterschiedlichen Melanocortin-Rezeptoren. An den MC1-Rezeptor bindet  $\alpha$ -MSH mit höchster Affinität, gefolgt von ACTH und  $\gamma$ -MSH. Der MC2-Rezeptor wird durch ACTH aktiviert; an den MC3-Rezeptor binden  $\gamma$ -MSH und ACTH mit etwa gleicher Affinität; der MC4 und der MC5-Rezeptor werden bevorzugt von  $\alpha$ -MSH und ACTH aktiviert (Brzoska, Luger et al. 2008). Nachfolgend soll kurz auf die einzelnen Rezeptoren eingegangen werden.

- **MC1-R:** Es sind verschiedenste Zellarten bekannt, hauptsächlich peripherer Art, die diesen Rezeptor exprimieren. Dazu gehören u.a. Melanozyten, Monozyten, neutrophile Granulozyten, Epithelzellen, Endothelzellen und Lymphozyten. Die Hauptaufgaben dieses Rezeptors scheinen neben der Pigmentierung der Haut antipyretische und antiinflammatorische Funktionen zu sein (Getting 2006).
- **MC2-R:** Dieser Rezeptor reguliert über die Proteinkinase A die Steroidfreigabe in der Nebennierenrinde.
- **MC3-R:** Der MC3-R wird in Zellen des zentralen Nervensystems sowie Immunzellen und Zellen peripherer Gewebe exprimiert, nicht jedoch in Melanozyten.
- **MC4-R:** Die Expression des MC4-R erfolgt nur im zentralen Nervensystem. Er spielt eine Rolle bei der Regulation der Nahrungseinnahme und könnte für die Therapie von Fettleibigkeit von Bedeutung sein (Adan, Hillebrand et al. 2003).
- **MC5-R:** Das Vorkommen dieses Rezeptors ist auf periphere Gewebe beschränkt. Er wird in verschiedenen Organen, u.a. Lunge, Leber, Thymus, Knochenmark und Haut exprimiert (Catania, Gatti et al. 2004). Da er auch in B- und T-Lymphozyten zu finden ist, wird eine immunregulatorische Funktion vermutet (Taylor and Namba 2001).

#### **1.4.4 Antiinflammatorische Wirksamkeit von $\alpha$ -MSH**

Die vielfältigen antiinflammatorischen und antipyretischen Effekte von  $\alpha$ -MSH konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits vielfach nachgewiesen werden. Auf Grund der zahlreichen Untersuchungen können nachfolgend nicht alle bisherigen Ergebnisse vorgestellt werden. Es soll daher nur auf einige wichtige Erkenntnisse exemplarisch eingegangen werden.

##### **1.4.4.1 *in vitro***

In verschiedenen *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 und IL-6 als auch die Bildung anderer proinflammatorischer Mediatoren wie der Prostaglandine reduziert (Brzoska, Luger et al. 2008). Auch die Aktivität des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors Nuklear Factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), welcher eine Schlüsselrolle in der Regulation der Inflammation einnimmt, wird durch  $\alpha$ -MSH gehemmt. In pulmonalen Epithelzellen der Linie A549, die mit einem  $\alpha$ -MSH-Vektor transfiziert wurden, konnte die Hemmung von NF $\kappa$ B nachgewiesen werden (Ichiyama, Okada et al. 2000). In Kontrast zu den hemmenden Effekten von  $\alpha$ -MSH auf verschiedene proinflammatorische Mediatoren konnte gezeigt werden, dass das immunsuppressiv wirksame Zytokin IL-10 durch  $\alpha$ -MSH induziert wird (Bhardwaj, Schwarz et al. 1996). Auch konnte in Studien mit verschiedenen Hautzelltypen eine  $\alpha$ -MSH-vermittelte Hemmung der durch proinflammatorische Stimuli induzierten Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1; ICAM-1) nachgewiesen werden (Brzoska, Luger et al. 2008).

##### **1.4.4.2 *in vivo***

Auch *in vivo* konnte die antiinflammatorische Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH in einer Reihe von Krankheitsmodellen im Tierversuch, meist an Mäusen, nachgewiesen werden. In verschiedenen Sepsis-Modellen kam es nach  $\alpha$ -MSH-Gabe zur Reduktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$  und TNF- $\alpha$  (Brzoska, Luger et al. 2008).

In einem Maus-Modell zeigte sich, dass  $\alpha$ -MSH durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren und Stressgenen die Nieren- und Lungenschädigung nach renaler Ischämie deutlich senken konnte (Deng, Hu et al. 2004).

In Darmmukosa-Proben von Patienten, die an Zöliakie litten, konnten  $\alpha$ -MSH sowie die Expression zweier Melanocortin-Rezeptoren – MC1-R und MC5-R – nachgewiesen werden. Möglicherweise soll dadurch die lokale Entzündungsreaktion kontrolliert werden (Colombo, Buffa et al. 2002).

Bei Ratten, bei denen durch Bleomycin-Gabe eine akute Lungenschädigung hervorgerufen wurde, kam es zur  $\alpha$ -MSH-Induktion. Durch Gabe von NDP- $\alpha$ -MSH kam es zur signifikanten Reduktion proinflammatorisch und profibrotisch wirksamer Faktoren wie IL-6, TNF- $\alpha$  oder TGF- $\beta$ 1. Es kann daher vermutet werden, dass Patienten von einer Behandlung mit  $\alpha$ -MSH-verwandten Agenzien bei akuter Lungenschädigung profitieren (Colombo, Gatti et al. 2007).

In einem Mausmodell zur allergischen Atemwegsinflammation konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit  $\alpha$ -MSH zur Hemmung der Inflammation führt. Der beobachtete antiinflammatorische Effekt war von der Anwesenheit des immunsuppressiv wirksamen IL-10 abhängig; IL-10-Knockout-Mäuse zeigten keine Reaktion auf eine  $\alpha$ -MSH-Therapie (Raap, Brzoska et al. 2003).

#### **1.4.5 Antimikrobielle Eigenschaften von $\alpha$ -MSH**

Für  $\alpha$ -MSH wurden antimikrobielle Eigenschaften gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* und den Hefepilz *Candida albicans* beschrieben. Die Abtötung der Erreger konnte schon bei Konzentrationen im picomolaren Bereich nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass die antimikrobielle Funktion von  $\alpha$ -MSH auch physiologischerweise eine Rolle spielt (Cutuli, Cristiani et al. 2000).

Der Mechanismus, durch den  $\alpha$ -MSH die antimikrobielle Wirkung gegen *C. albicans* vermittelt, scheint sich dieser Studie nach vom Wirkmechanismus der klassischen antimikrobiellen Peptide zu unterscheiden. Die meist kationischen antimikrobiellen Peptide, wie z.B. die Defensine, binden an die negativ geladene Zellwand des Erregers. Durch Zusammenlagerung mehrerer Peptide werden transmembrane Poren geformt, die zum Zusammenbruch des Membranpotentials mit nachfolgender Lyse der Zelle führen (Harder, Glaser et al. 2007).

Es konnte bisher jedoch kein Anhaltspunkt dafür gefunden werden, dass der antimikrobielle Effekt von  $\alpha$ -MSH ebenfalls auf diesem Mechanismus beruht. Hingegen wurde gezeigt, dass es in *C. albicans* zur cAMP-Induktion durch Aktivierung der Adenylatcyclase kam. Durch Hemmung der Adenylatcyclase mit ddADo (2',3'-Dideoxyadenosin)

wurde der antimikrobielle Effekt abgeschwächt. Änderungen der intrazellulären cAMP-Konzentration scheinen also für die antimikrobielle Wirksamkeit von Bedeutung zu sein (Cutuli, Cristiani et al. 2000).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Bis zu 50% der ambulant erworbenen Pneumonien werden durch den Erreger *Streptococcus pneumoniae* verursacht. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten und der seit einigen Jahren angebotenen Schutzimpfung ist eine Pneumokokken-Pneumonie insbesondere bei Kindern und immunsupprimierten oder älteren Patienten auch heutzutage noch eine ernst zu nehmende Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität. Vor allem auf Grund der zunehmenden Resistenzbildung gegen Penicilline und Makrolide wird intensiv nach neuen, alternativen Behandlungsstrategien geforscht. Die gezielte Steuerung des angeborenen Immunsystems könnte einen neuen Ansatz zur Therapie der Pneumokokken-Pneumonie darstellen. Dies kann möglicherweise durch die Therapie mit – oder durch Induktion von – körpereigenen antimikrobiellen Peptiden erfolgen, zu denen das Peptidhormon  $\alpha$ -MSH gezählt wird. Neben seiner antimikrobiellen Eigenschaft vermittelt  $\alpha$ -MSH zudem antiinflammatorische Effekte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von  $\alpha$ -MSH – als wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems – für pulmonale Infektionen durch *S. pneumoniae* zu ermitteln.

Zunächst sollte die antimikrobielle Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH gegenüber dem Erreger *S. pneumoniae* nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde untersucht, ob  $\alpha$ -MSH grundsätzlich im Rahmen einer Pneumokokken-Pneumonie gebildet wird.

Weiterhin sollten die molekularen Mechanismen einer  $\alpha$ -MSH-Induktion durch *S. pneumoniae* am Beispiel von humanen Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B näher erforscht werden. Dies erfolgte durch die Untersuchung verschiedener wichtiger Pneumokokken-Virulenzfaktoren (Polysaccharidkapsel, Pneumolysin, Serinprotease PrtA).

Um eine mögliche Regulation von  $\alpha$ -MSH durch die Prohormon-Convertase 2 zu analysieren, wurde die Expression der PC2 nach *S. pneumoniae*-Infektion der Zellen untersucht.

Zudem wurde die Expression zweier Melanocortin-Rezeptoren in pulmonalem Gewebe vor und nach *S. pneumoniae*-Infektion untersucht.

### 1.5.1 Fragestellungen

1. Besitzt  $\alpha$ -MSH antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber dem Erreger *S. pneumoniae*?
2. Führt eine Infektion von pulmonalem Gewebe mit *S. pneumoniae* (Untersuchung von Mauslungenlysaten und humanen Bronchialepithelzellen) zur Induktion von ACTH und  $\alpha$ -MSH?
3. Welche Rolle spielen verschiedene Pneumokokken-Virulenzfaktoren (Polysaccharidkapsel, Pneumolysin, Serinprotease PrtA) für die beobachteten Effekte?
4. Welche Rolle spielt die Prohormon-Convertase 2 für die  $\alpha$ -MSH-Induktion in mit *S. pneumoniae* infizierten humanen Bronchialepithelzellen?
5. Kommt es nach *S. pneumoniae*-Infektion zu Änderungen hinsichtlich der Expression der Melanocortin-Rezeptoren 1 und 5?

## 2 Material

### 2.1 Materialien für die Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinien

Es wurden humane Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B verwendet.

#### 2.1.2 Zellkulturflaschen und -schalen

Die humanen Bronchialepithelzellen wurden in T<sub>75</sub>-Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) kultiviert. Für die Stimulationen wurden 6-Well-Platten oder 24-Wellplatten (Falcon, Heidelberg) verwendet.

#### 2.1.3 Kulturmedien

|                                  |        |                  |
|----------------------------------|--------|------------------|
| Keratinocyte SFM                 | 500 ml | Gibco, Karlsruhe |
| Glutamin 200 mM                  | 5 ml   | Gibco, Karlsruhe |
| Penicillin / Streptomycin        | 7 ml   | PAA, Cölbe       |
| Amphotericin B                   | 200 µl | Roche, Mannheim  |
| Epinephrin-Hydrochlorid (1mg/ml) | 250 µl | Sigma, München   |
| Epithelial Growth Factor         | 2,5 µg | Gibco, Karlsruhe |
| Bovine pituary extract           | 25 mg  | Gibco, Karlsruhe |
| Retinolsäure (1mg/ml)            | 50 µl  | Sigma, München   |

**Tab. 2.1: Kulturmedium für BEAS-2B-Zellen**

Zur Stimulation der BEAS-2B-Zellen wurde das Keratinocyte SFM ohne weitere Zusätze verwendet.

|                                      |        |                  |
|--------------------------------------|--------|------------------|
| Keratinocyte SFM                     | 100 ml | Gibco, Karlsruhe |
| Bovines Serumalbumin (BSA) 100 mg/ml | 1 ml   | Sigma, München   |
| Fibronectin (1mg/ml)                 | 1ml    | Sigma, München   |
| Vitronectin (50µg/ml)                | 100 µl | Sigma, München   |

**Tab. 2.2: Coating-Medium zur Vorinkubation der Zellkulturflaschen und-schalen**

### 2.1.4 Weitere Substanzen für die Zellkultur

|                   |                  |
|-------------------|------------------|
| Trypsin           | Gibco, Karlsruhe |
| Trypsin-Inhibitor | Roche            |
| PBS -/-           | PAA, Cölbe       |

## 2.2 Materialien für die Bakterien-Kultivierung

### 2.2.1 *S. pneumoniae*: verschiedene Stämme

Alle verwendeten *S. pneumoniae*-Stämme wurden freundlicherweise von Herrn Professor Dr. rer. nat. S. Hammerschmidt, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald), Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 15a, 17487 Greifswald, zur Verfügung gestellt.

|                    |  |
|--------------------|--|
| D39:               | bekapselte Wildtyp (Serotyp 2)         |
| R6x:               | nicht-bekapseltes Derivat von D39      |
| R6x $\Delta$ ply:  | Pneumolysin-defiziente Mutante von R6x |
| R6x $\Delta$ prtA: | PrtA-defiziente Mutante von R6x        |

### 2.2.2 Bakterien-Kulturmedium

|                   |            |                              |
|-------------------|------------|------------------------------|
| Todd Hewitt Broth | 30 g       | BD Mikrobiologie, Heidelberg |
| Hefeextrakt       | 5 g        | Sigma, München               |
| Aqua bidest.      | Ad 1000 ml |                              |

Tab. 2.3: Pneumokokken-Anzuchtmedium (THY)

## 2.3 Mauslungenproben

Die gezeigten Western-Blot-Untersuchungen aus einem *in vivo* Maus-Pneumonie-Modell wurden mit Gesamtmauslungenlysaten durchgeführt. Die fertig aufbereiteten Proben, wie auch die Maus-BAL-Proben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. H. Müller, Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charité-Platz 1, 10117 Berlin, zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Proben wurden 10 Wochen alte, 19-21 g schwere weibliche C57BL/6-Mäuse unter einer leichten intraperitonealen Ketamin/Xylacin-Anästhesie intranasal mit 20  $\mu$ l des bekapselten *S. pneumoniae* Serotyp 3 NCTC7978 ( $5 \times 10^6$  cfu/ml) infiziert und

nach 24 Stunden euthanasiert. Aus den steril entnommenen Lungen wurden bronchoalveoläre Lavages entnommen und dann bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Den zur Negativkontrolle dienenden Tieren wurden 20 µl PBS intranasal appliziert. Die Lungen der Kontrolltiere wurden ebenfalls nach 24 Stunden entnommen.

## 2.4 Lösungen, Puffer und Antikörper für Western Blot

|                           |        |                |
|---------------------------|--------|----------------|
| Dulbeccos PBS             | 1x     | PAA, Cölbe     |
| Natriumfluorid 99%ig      | 1 M    | Sigma, München |
| Natriumorthovanadat 98%ig | 200 mM | Sigma, München |
| Natriumpyrophosphat       | 150 mM | Sigma, München |

**Tab. 2.4: Phosphoprotein-Waschpuffer**

|                            |                |                      |
|----------------------------|----------------|----------------------|
| Phosphoprotein-Waschpuffer | 824 µl         | s.o.                 |
| Tris-HCl pH 7,4            | 50 mM, 100 µl  | Sigma, München       |
| EDTA                       | 250 mM, 1 µl   | Roth, Karlsruhe      |
| NP-40                      | 1%, 50 µl      | BioChemika, Duisburg |
| PMSF                       | 1 mM, 10 µl    | Sigma, München       |
| Antipain                   | 10 µg/ml, 5 µl | Sigma, München       |
| Leustatin                  | 10 µg/ml, 5 µl | Sigma, München       |
| Pepstatin                  | 10 µg/ml, 5 µl | Sigma, München       |

**Tab. 2.5: Protein-Lysepuffer (1 ml)**

|                   |      |                               |
|-------------------|------|-------------------------------|
| Glycerol          |      | Merck, Darmstadt              |
| Tris-HCl pH 8,3   | 0,5M | Sigma, München                |
| SDS               | 10%  | Serva, Heidelberg             |
| Bromphenolblau    | 1%   | Pharmacia Biotech AB, Uppsala |
| Aqua bidest.      |      |                               |
| β-Mercaptoethanol | 1%   | Serva, Heidelberg             |

**Tab. 2.6: Proteinladepuffer 4x (Lämmli-Puffer)**

## 2.4.1 Gele

### 2.4.1.1 Trenngel

|              |            |                |
|--------------|------------|----------------|
| Trizma-Base  | 18,15 g    | Sigma, München |
| Aqua bidest. | Ad 1000 ml |                |

**Tab. 2.7: Trenngelpuffer (1,5M, pH 8,8)**

|                |      | <b>13%ig</b> | <b>7%ig</b> |                        |
|----------------|------|--------------|-------------|------------------------|
| Trenngelpuffer | s.o. | 2,5 ml       | 2,5 ml      | s.o.                   |
| Acrylamid      | 40%  | 3,25 ml      | 1,65 ml     | Serva, Heidelberg      |
| SDS            | 10%  | 100 µl       | 100 µl      | Serva, Heidelberg      |
| APS            |      | 50 µl        | 50 µl       | Serva, Heidelberg      |
| Aqua bidest.   |      | 4,1 ml       | 5,7 ml      |                        |
| TEMED          |      | 5 µl         | 5 µl        | R&D Systems, Wiesbaden |

**Tab. 2.8: Trenngele**

### 2.4.1.2 Sammelgel

|             |           |                |
|-------------|-----------|----------------|
| Trizma-Base | 6 g       | Sigma, München |
| Aqua bidest | Ad 1000ml |                |

**Tab. 2.9: Sammelgelpuffer (0,5M, pH 6,8)**

|                 |      |          |                        |
|-----------------|------|----------|------------------------|
| Sammelgelpuffer | s.o. | 1 ml     | s.o.                   |
| Acrylamid       | 40%  | 534 µl   | Serva, Heidelberg      |
| SDS             | 10%  | 40 µl    | Serva, Heidelberg      |
| APS             |      | 40 µl    | Serva, Heidelberg      |
| Aqua bidest.    |      | 2,426 ml |                        |
| TEMED           |      | 10µl     | R&D Systems, Wiesbaden |

**Tab. 2.10: Sammelgel**

## 2.4.2 Laufpuffer, Blotpuffer und Blockpuffer

|              |            |                   |
|--------------|------------|-------------------|
| Trizma Base  | 15 g       | Sigma, München    |
| Glycin       | 72 g       | Serva, Heidelberg |
| SDS          | 5 g        | Sigma, München    |
| Aqua bidest. | Ad 1000 ml |                   |

Tab. 2.11: Laufpuffer (5x)

**Laufpuffer (1x):** 200 ml Laufpuffer (5x) in 800 ml Aqua bidest.

|              |            |                   |
|--------------|------------|-------------------|
| Trizma Base  | 30 g       | Sigma, München    |
| Glycin       | 144 g      | Serva, Heidelberg |
| Aqua bidest. | Ad 1000 ml |                   |

Tab. 2.12: Blotpuffer (10x)

**Blotpuffer (1x):** 80 ml Blotpuffer (10x), 200 ml Methanol (Merck, Darmstadt) in 720 ml Aqua bidest.

### Blockpuffer

Der Odyssey-Blockpuffer (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) wurde im Verhältnis 1:1 mit Dulbeccos PBS verdünnt. Diese Mischung wurde auch zum Ansetzen der primären und sekundären Antikörper für Western Blot-Versuche verwendet.

## 2.4.3 Antikörper

| Antigen          | Tier      | Verdünnung | Firma                          |
|------------------|-----------|------------|--------------------------------|
| Akt              | Kaninchen | 1:500      | Cell signaling                 |
| ACTH/CLIP (E-15) | Ziege     | 1:500      | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| MC1-R            | Kaninchen | 1:500      | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| MC5-R            | Ziege     | 1:500      | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| PC2 (H-20)       | Ziege     | 1:500      | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| ERK-2            | Maus      | 1:1000     | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| COX-2            | Maus      | 1:500      | BD Biosciences                 |

Tab. 2.13: primäre Antikörper für Western Blot

| Ziel               | Tier  | Verdünnung | Firma                           |
|--------------------|-------|------------|---------------------------------|
| Anti-Kaninchen IgG | Ziege | 1:2000     | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| Anti-Maus          | Ziege | 1:2000     | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| Anti-Ziege         | Esel  | 1:2000     | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |

Tab. 2.14: Sekundäre Antikörper für Western Blot

## 2.5 Substanzen für ELISA

### 2.5.1 $\alpha$ -MSH-ELISA

Zur Durchführung des  $\alpha$ -MSH-ELISAs verwendeten wir das  $\alpha$ -MSH-EIA-Set von Phoenix Pharmaceuticals.

## 2.6 Andere Chemikalien und Stimulantien

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| $\alpha$ -MSH    | Sigma, München               |
| Ponceau S        | Sigma, München               |
| Bradford-Reagenz | Biorad, München              |
| PMA              | Calbiochem, Merck, Darmstadt |
| Aprotinin        | Calbiochem, Merck, Darmstadt |

## 2.7 Verbrauchssubstanzen

|   |                                     |
|---|-------------------------------------|
| Reaktionsgefäße                             | Eppendorf, Hamburg                  |
| Pipetten                                    | Eppendorf, Hamburg                  |
| Pipettenspitzen                             | Sarstedt, Hannover                  |
| Multipipetten                               | Eppendorf, Hamburg                  |
| Cell-Scraper                                | Costar, Cambridge                   |
| Urinbecher (100 ml)                         | Sarstedt, Hannover                  |
| Röhrchen (12 und 50 ml)                     | Falcon, Heidelberg                  |
| Whatman-Filterpapier                        | Whatman                             |
| Einmal-Küvetten                             | Sarstedt, Hannover                  |
| Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)            | Eppendorf, Hamburg                  |
| Blotmembran Hybond-ECL                      | Amersham life science, Braunschweig |
| Einmal-Impfösen                             | VWR, Darmstadt                      |
| Columbia Agar Platten                       | BD Mikrobiologie                    |
| Recombinant Protein molecular weight marker | Amersham life science, Braunschweig |

**Tab. 2.15: Verbrauchssubstanzen**

## 2.8 Geräte

Standardmäßig eingesetzte Geräte wie Sterilbänke, Kühlschränke etc. werden hier nicht extra aufgeführt.

|                                  |                                 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Bio Rad Gelelektrophorese-System | BIO-RAD, München                |
| ELISA-Plattenlesegerät           | Dynatech, Guernsey, England     |
| Odyssey Infrared Imaging System  | LI-COR Biosciences, Bad Homburg |
| Spektralphotometer               | UVIKON, Kontron, Basel          |
| Blot-Apparatur                   | BIO-RAD, München                |
| Thermomixer                      | Eppendorf, Hamburg              |
| Vortexer                         | IKA, Staufen                    |

**Tab. 2.16: Geräte**

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung der Zellen

Die humanen Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B wurden in Zellkulturflaschen (T<sub>75</sub>), Zellkulturschalen oder Multiwell-Platten in einem Brutschrank bei 37 °C mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage erneuert. Vor der Aussaat der Zellen in die entsprechenden Gefäße wurden diese mit dem Coating-Medium bei Raumtemperatur vorinkubiert. Hierfür wurde jeweils eine geringe Menge Coating-Medium in die Flaschen oder Schalen gegeben und diese auf dem Boden verteilt; nach 30 min wurde die überschüssige Flüssigkeit abpipettiert.

Nach Ausbildung eines Monolayers in den T<sub>75</sub>-Flaschen erfolgte die Subkultivierung der Zellen je nach Versuchsaufbau in Zellkulturschalen oder Multiwell-Platten. Zunächst wurden alle benötigten Kulturmedien und Flüssigkeiten in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das Kulturmedium der Zellen wurde entfernt, der Monolayer wurde einmalig mit 10 ml PBS -/- gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen für fünf Minuten mit 3 ml Trypsin bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen konnten die Zellen nun leicht gelöst werden und wurden in 10 ml Kulturmedium aufgenommen, in ein 50 ml Zellkulturröhrchen gegeben und bei 1000 U/min für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Das überschüssige Medium wurde nun vorsichtig abpipettiert, um das entstandene Pellet zu erhalten. Nach Zugabe von 200 µl Trypsin-Inhibitor und vorsichtigem Resuspendieren des Pellets wurden nun 30 ml Kulturmedium hinzugegeben, die daraufhin in die vorbereiteten Zellkulturschalen oder Multiwell-Platten im Verhältnis 1:3 verteilt wurden. Die nach etwa drei Tagen konfluenten Zellen konnten dann für Versuche eingesetzt werden.

### 3.2 Kultivierung der Pneumokokken

Die *S. pneumoniae*-Stock-Lösungen wurden bei -80 °C gelagert und bei Gebrauch gekühlt zum Arbeitsplatz transportiert.

Für die Kultivierung der Pneumokokken wurde am Versuchsvorabend eine kleine Menge des benötigten *S. pneumoniae*-Stamms mit einer Einmal-Öse auf eine Agarplatte mit

5% Schafsblut ausgestrichen. Für den pneumolysin-defizienten Stamm musste diese zuvor mit einem Selektionsantibiotikum (40 µl Erythromycin in einer Konzentration von 1 mg/ml) bestrichen werden. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C mit einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% inkubiert. Am nächsten Morgen waren deutliche Kolonien des Erregers sichtbar.

Die Einzelkolonien wurden nun mit einem Wattestäbchen abgenommen, in ein Falcon-Röhrchen mit 20 ml angewärmtem THY gegeben und im Brutschrank weiter inkubiert, bis spektralphotometrisch eine OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Dies entspricht einer Konzentration von 3 bzw. 4×10<sup>8</sup> cfu/ml. Nachfolgend wurden die Erreger im Falcon-Röhrchen bei 3600 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das entstandene Pellet in derselben Menge Zellkulturmedium resuspendiert.

Für die Infektion der Zellen musste die entstandene Pneumokokkensuspension je nach Versuchsaufbau weiter auf eine Konzentration von 1×10<sup>8</sup> bzw. 1×10<sup>7</sup> cfu/ml verdünnt werden.

### 3.2.1 Herstellung Hitze-inaktivierter Erreger

Die Erreger (*S. pneumoniae* R6x) wurden wie oben beschrieben kultiviert und auf eine Konzentration von 10<sup>9</sup> cfu/ml eingestellt. Die Inaktivierung erfolgte im Wasserbad bei 56 °C für eine Stunde. Die abgetöteten Bakterien wurden dann zweifach zentrifugiert und jeweils wieder mit PBS resuspendiert; es wurden dann Aliquot von je 1 ml angefertigt und diese bei -80 °C gelagert. Die Erfolgskontrolle erfolgte durch Ausstreichen der abgetöteten Erreger auf Agar-Platten.

### 3.3 Antimikrobielles Assay

*S. pneumoniae* R6x wurden in einer Konzentration von 10<sup>6</sup> cfu/ml angezüchtet. Für die Zeitreihe wurden die Erreger mit 10<sup>-6</sup> M α-MSH für zwei bzw. vier Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Für die Konzentrationsreihe wurden die Pneumokokken mit unterschiedlichen α-MSH-Konzentrationen (10<sup>-15</sup>, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>) für vier Stunden inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben auf eine Bakterienkonzentration von 100 cfu/ml verdünnt.

Es wurde jeweils 1 ml der verdünnten Proben auf Schafsblut-Agarplatten ausgestrichen und diese für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit konnten die sichtbaren Bakterienkolonien ausgezählt werden.

Als Positivkontrolle wurde Penicillin in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

### **3.4 Western Blot**

#### **3.4.1 Probengewinnung für Western Blot**

Die BEAS-2B-Zellen wurden in 6-Well-Platten kultiviert. Nach Infektion der Zellen mit dem Erreger konnten die Proben nach der dem jeweiligen Versuchsaufbau entsprechenden Zeit geerntet werden.

Hierfür wurden zunächst das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit eiskaltem Phosphoprotein-Waschpuffer gewaschen. Dann wurden pro Well 50 µl eiskalter Lysepuffer hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgekratzt. Die lysierten Zellen konnten nun mit einer Pipette aufgenommen und in vorbereitete Reaktionsgefäße überführt werden. Es wurden immer die Zellen von jeweils zwei Wells in einem Reaktionsgefäß gesammelt.

Dann wurden die Reaktionsgefäße bei 13000 U/min für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, das Pellet verworfen. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### **3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Ermittlung des Proteingehalts der Proben wurde eine Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode durchgeführt.

Zunächst musste das Bradford-Reagenz vorbereitet werden: Hierfür wurde Coomassie Brilliant Blue mit Aqua dest. im Verhältnis 1:5 verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 995 µl in Einmal-Küvetten pipettiert und 5 µl der vorbereiteten, eisgekühlten Proben hinzugegeben. Die anfangs bräunliche Lösung färbt sich nach Proteinzugabe blau, eine stärkere/dunklere Blaufärbung entspricht einer höheren Proteinkonzentration. Photometrisch wurde die optische Dichte bei 595 nm gemessen. Dem für jede Probe erhaltenen Zahlenwert konnte mittels einer Albumin-Eichkurve die genaue Proteinkonzentration zugeordnet werden.

### 3.4.3 Gel-Elektrophorese

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben mit Lämmli-Puffer im Verhältnis 4:1 verdünnt und für 5 min unter Schütteln auf 95 °C erhitzt. Meist wurde eine 80 µg Protein entsprechende Menge jeder Probe auf ein Acrylamid-Gel aufgetragen. Es wurden 7%- und 13%-ige Acrylamidgele eingesetzt (7%-iges Gel für größere Proteine, 13%-iges Gel für kleinere Proteine).

Die Bio Rad Mini-Gel-Kammer wurde mit Running-Puffer aufgefüllt und eine Spannung von 100 V angelegt. Nachdem die Proben ins Trenngel eingetreten waren, wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Nach etwa 90 min hatten die Proben das Gel durchlaufen, sodass die Gele aus der Kammer entnommen werden konnten.

### 3.4.4 Das Blotten

Zum Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran wurde ein Sandwich bestehend aus der Blotvorrichtung, 2 Scheiben Whatman-Filterpapier je Seite, 1 Blotschwamm je Seite, 1 Hybond-Membran und dem Gel gebildet und diese gemäß Herstellerangaben in die Blotkammer eingesetzt, mit eiskaltem Blotpuffer getränkt und für 1 h an eine Spannung von 100 V angeschlossen. Nach dieser Zeit konnten die Proteinbanden auf der Membran durch kurze Zugabe von Ponceau-S-Lösung sichtbar gemacht werden. Durch Schwenken der Membran in destilliertem Wasser verschwanden die roten Banden wieder. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde der Blot dann für 1 h in Blockpuffer eingelegt.

Nun erfolgte die Zugabe der gewünschten Primär-Antikörper-Mischung, mit welcher die Membran für 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert wurde. Danach wurde die Membran 3-mal für jeweils 5 min mit PBS + 5% Tween 20 gewaschen, um überschüssige Antikörper, die nicht an das Zielprotein gebunden hatten, zu entfernen.

Der sekundäre Antikörper wurde auf die Membran gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte das Waschen der Membran mit PBS + 5% Tween (3-mal je 5 Minuten) und destilliertem Wasser (3-mal, je 5 Minuten). Jetzt konnte der Blot in den Odyssey-Scanner eingelesen und am Computer ausgewertet werden.

### 3.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik ist ein Immunassay-Verfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Hierbei werden spezifische Antikörper genutzt, die ein bestimmtes Antigen binden. An diesen Antigen-Antikörper-Komplex bindet ein Enzym, welches nach Zugabe eines Substrates eine Reaktion katalysiert, die durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Dieser Farbumschlag ist gegenüber der Antigen-Konzentration proportional, so dass eine quantitative Bestimmung des Antigens erfolgen kann.

Für die Auswertung aller ELISAs wurde das Computerprogramm Graphpad Prism 5.0 genutzt.

#### 3.5.1 $\alpha$ -MSH-ELISA

Für den  $\alpha$ -MSH-ELISA wurde ein kommerziell erhältliches  $\alpha$ -MSH-ELISA-Kit der Firma Phoenix pharmaceuticals, inc. eingesetzt. Die Zellen wurden je nach Versuchsschema mit den Erregern infiziert und die Überstände der Wells abgenommen. Um Doppelwerte zu erhalten, wurde jede zu untersuchende Probe im Versuchsaufbau doppelt angelegt.

Zunächst wurde am Versuchstag eine  $\alpha$ -MSH-Standard-Reihe angefertigt. Hierfür wurde die im Kit enthaltene Standard-Lösung mit Assay-Buffer verdünnt. Dann konnten die unverdünnten Proben und die vorbereitete  $\alpha$ -MSH-Standard-Reihe (jeweils 50  $\mu$ l) auf die vorgecoatete ELISA-Platte pipettiert werden. In jedes Well wurden zusätzlich jeweils 25  $\mu$ l primäres Antiserum und biotinyliertes Peptid gegeben.

Die Platte wurde nun für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann viermal mit je 350  $\mu$ l Assay-Buffer je Well gewaschen. Die Platte wurde für eine weitere Stunde mit Meerrettichperoxidase (100  $\mu$ l/Well) dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und wieder vier Mal wie oben beschrieben gewaschen.

Danach wurden je 100  $\mu$ l/Well Substanzlösung hinzugegeben, die Platte erneut für eine Stunde dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde dann mit 100  $\mu$ l/Well 2N HCl abgestoppt. Die Auswertung erfolgte in einem Plattenlesegerät bei einer optischen Dichte von 450 nm. Die für die Proben ermittelten optischen Dichten konnten nun anhand der Standardkurve quantifiziert werden.

### 3.6 Transfektion

Die Transfektion der Bronchialepithelzelllinie BEAS-2B erfolgte mittels AtuFECT01 (Silence Therapeutics AG, Berlin, Germany). Bei dieser Methode handelt es sich um eine Lipofektion, bei der es zur Bildung von positiv geladenen Lipid-RNA-Komplexen kommt. Diese binden an die negative geladene eukaryotische Zellmembran und werden dort durch Endozytose aufgenommen.

Für die Transfektion wurden 2 µg siRNA je 10<sup>6</sup> BEAS-2B-Zellen eingesetzt. Die non-silencing Kontroll-siRNA (sense UUCUCCGAACGUGUCACGUtt, antisense ACGUGACACGUUCGGAGAAtt), sowie die vorgefertigte und getestete PC2-siRNA wurden von Ambion Ltd. (Huntingdon, Cambridge, UK) erworben.

### 3.7 Aufbereitung der Mauslungenproben

Die Mauslungen wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Dann wurden sie zur weiteren Aufbereitung mechanisch homogenisiert und in Lysepuffer zur Proteinextraktion suspendiert. Um gröbere Zellstrukturen aufzubrechen, wurden die Lysate zusätzlich 3×6 Sekunden mit Ultraschall behandelt.

### 3.8 Statistische Auswertung

Alle abgebildeten Versuche wurden mehrfach und unabhängig voneinander erfolgreich durchgeführt. Für die statistische Auswertung der ELISAs und der antimikrobiellen Assays wurde das Programm GraphPad Prism, Version 5.0 genutzt. Es wurden Einweg-Varianzanalysen (one-way-ANOVA) durchgeführt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ( $p < 0.05$ ) wurde als signifikant gewertet.

Die Abbildungen der Western Blots zeigen einen repräsentativen Blot bei mindestens drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit gleichem Ergebnis.

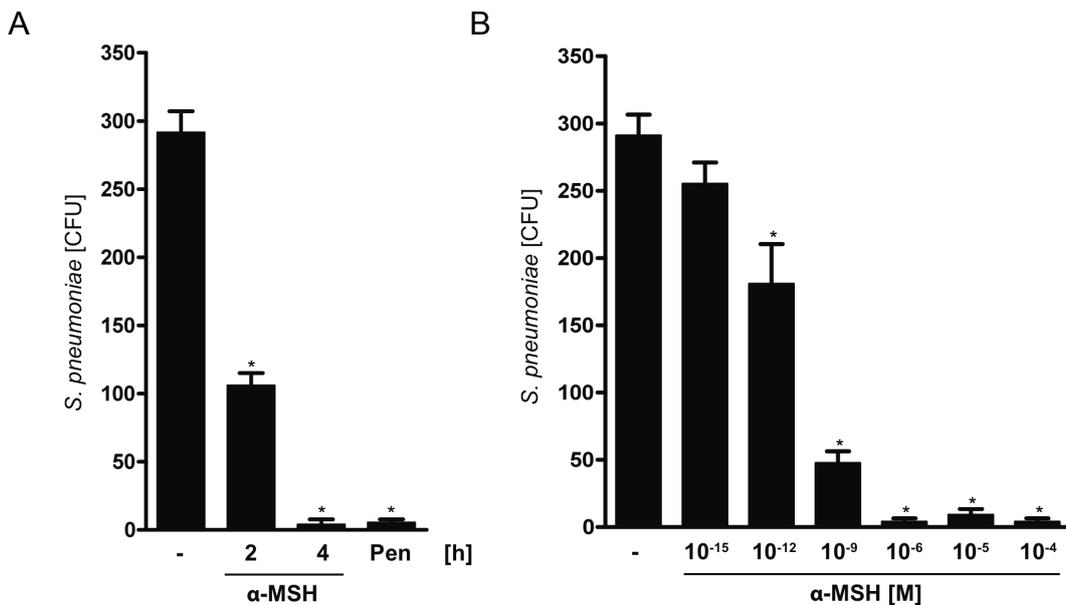
## 4 Ergebnisse

### 4.1 $\alpha$ -MSH ist gegen *S. pneumoniae* antimikrobiell wirksam

Für  $\alpha$ -MSH konnten bereits von Cutuli und Kollegen antimikrobielle Effekte gegen zwei bedeutende Krankheitserreger – gegen das grampositive Bakterium *Staphylococcus aureus* und den Hefepilz *Candida albicans* – nachgewiesen werden (Cutuli, Cristiani et al. 2000). Bislang gab es keine weiteren Erkenntnisse hinsichtlich der antimikrobiellen Wirkung  $\alpha$ -MSHs gegen andere Erreger.

In diesem Versuch sollte die antimikrobielle Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH gegenüber dem unbekapselten Erreger *S. pneumoniae* R6x ermittelt werden. Hierfür wurden antimikrobielle Assays durchgeführt. Es zeigte sich, dass  $\alpha$ -MSH gegenüber der grampositiven *S. pneumoniae*-Mutante R6x deutliche antimikrobielle Wirksamkeit besitzt. Sowohl zeit- (Abb. 4.1 A) als auch konzentrationsabhängig (Abb. 4.1 B) kam es nach Inkubation des Erregers mit  $\alpha$ -MSH zur signifikanten Reduktion der Anzahl der Pneumokokkenkolonien.

Die antimikrobielle Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH erwies sich beim Einsatz einer Konzentration von  $10^{-6}$  M bei einer Inkubationsdauer von vier Stunden der antimikrobiellen Wirkung von Penicillin als gleichwertig (Abb. 4.1 A).



**Abb. 4.1 A-B:  $\alpha$ -MSH ist gegen *S. pneumoniae* antimikrobiell wirksam**

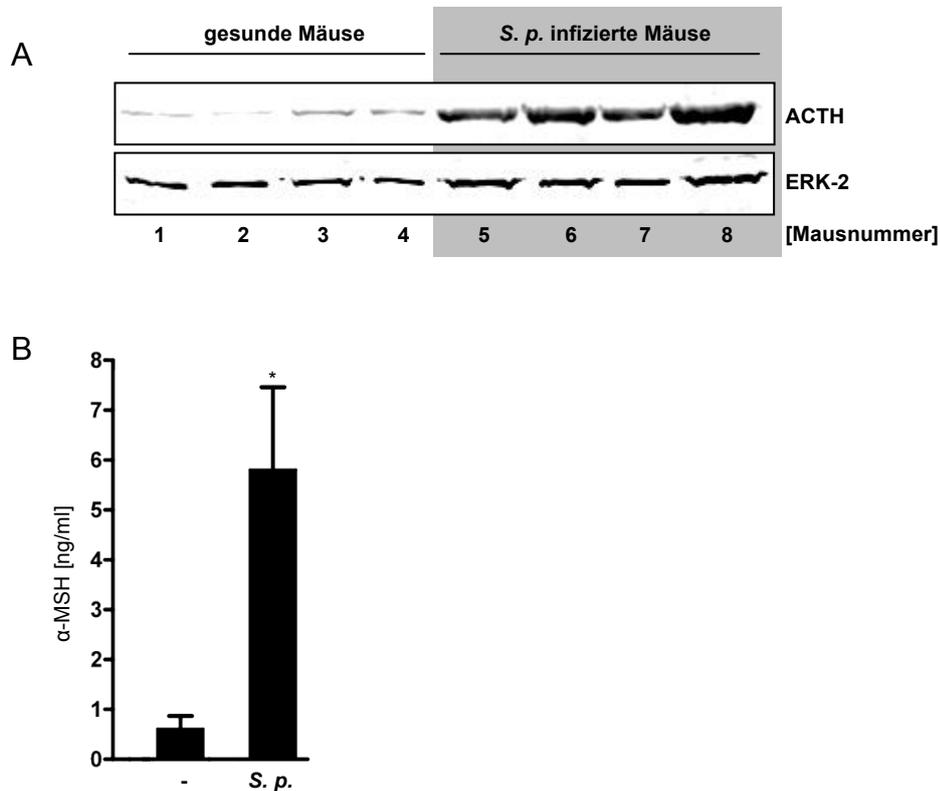
*S. pneumoniae* R6x wurde mit  $\alpha$ -MSH inkubiert. Die angefertigten Zeit- (A) und Konzentrationsreihen (B) wurden in antimikrobiellen Assays untersucht. Für die Zeitreihen wurde  $\alpha$ -MSH in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde Penicillin in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml verwendet. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Die im Vergleich zum Leerwert signifikanten ( $p < 0,05$ ) Reduktionen der Kolonie-bildenden Einheiten (engl.: colony forming units; cfu) nach  $\alpha$ -MSH-Inkubation wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

## 4.2 ACTH und $\alpha$ -MSH werden durch *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe induziert

Die Neuropeptide ACTH und  $\alpha$ -MSH entstehen durch posttranslationale Veränderungen aus dem Vorläuferprotein POMC. Es ist in der Literatur bekannt, dass ACTH und  $\alpha$ -MSH neben ihrem Hauptbildungsort in der Hypophyse auch in vielen anderen peripheren Geweben und Zellarten, unter anderem in Zellen des Immunsystems und der Haut, exprimiert werden (Catania, Airaghi et al. 2000; Pritchard and White 2007). Zudem können sie durch verschiedene proinflammatorische Stimuli, wie z.B. ultraviolette Strahlung, Zytokine oder bakterielles Endotoxin induziert werden (Schiller, Brzoska et al. 2004). Nachfolgend sollte untersucht werden, ob ACTH und  $\alpha$ -MSH ebenfalls durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe induziert werden. Hierfür wurden Mauslungenlysate, BAL-Proben von Mäusen (Bronchoalveoläre Lavages) sowie humane Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B untersucht.

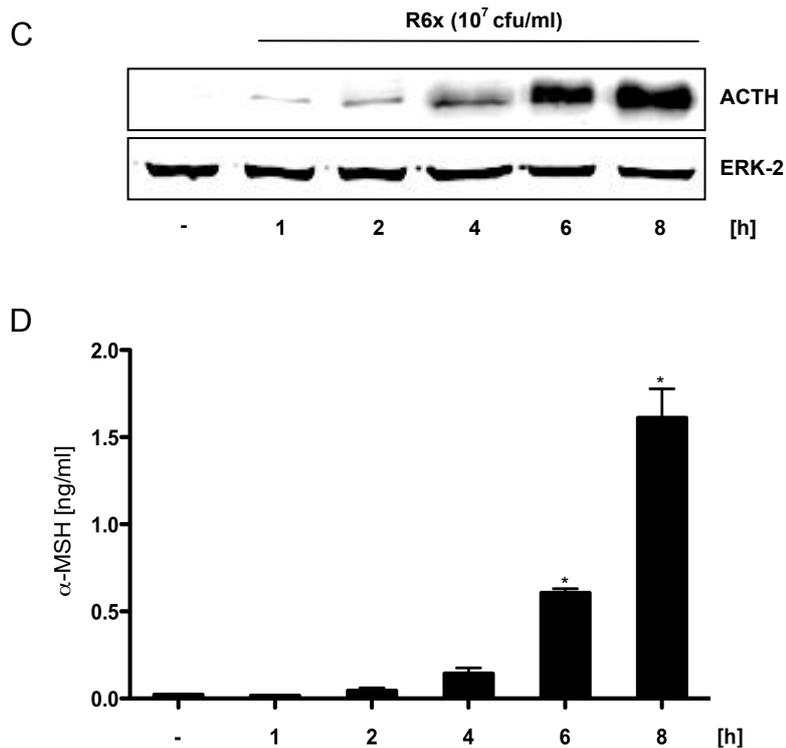
Das 39-Aminosäuren-Polypeptid ACTH entsteht durch posttranslationales Processing aus dem 29 kDa schweren Vorläuferprotein POMC und wird durch die Prohormon-

Convertase 2 weiter in  $\alpha$ -MSH gespalten. Die Bildung von ACTH sollte mittels Western Blot mit einem für die Detektion von POMC und ACTH empfohlenen Antikörper (29 kDa) gezeigt werden (Abb. 4.2 A, C). Die  $\alpha$ -MSH-Induktion wurde durch einen spezifischen  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht (Abb. 4.2 B, D).



**Abb. 4.2 A-B: ACTH und  $\alpha$ -MSH werden nach Infektion mit *S. pneumoniae* in murinem pulmonalem Gewebe induziert**

Die ACTH-Induktion in den Mauslungenlysaten (A) wurde mittels Western Blot untersucht. Die Maus-BAL-Proben (B) wurden mittels  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht. Die Mäuse waren zuvor für 24 h mit dem bekapselten Serotyp 3 *S. pneumoniae* NCTC7978 infiziert worden. Der Nachweis von ERK-2 („extracellular signal-regulated kinase“) wurde als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot (A). Der Graph (B) zeigt eine Zusammenfassung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zum Leerwert signifikante ( $p < 0,05$ ) Anstiege der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet.



**Abb. 4.2 C-D: ACTH und  $\alpha$ -MSH werden durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* in Bronchialepithelzellen induziert**

BEAS-2B-Zellen wurden mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Es wurde eine Zeitreihe angefertigt. Die ACTH-Induktion wurde mittels Western Blot untersucht (C). Die  $\alpha$ -MSH-Induktion in den Mediumüberständen wurde mittels  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht (D). Der Nachweis von ERK-2 wurde als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot (C). Der Graph (D) zeigt eine Zusammenfassung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zum Leerwert signifikante ( $p < 0,05$ ) Anstiege der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Es konnte nachgewiesen werden, dass es sowohl bei einem Maus-Pneumonie-Modell *in vivo* (Abb. 4.2 A, B) als auch *in vitro* (Abb. 4.2 C, D) nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* zur Induktion von ACTH und  $\alpha$ -MSH kommt.

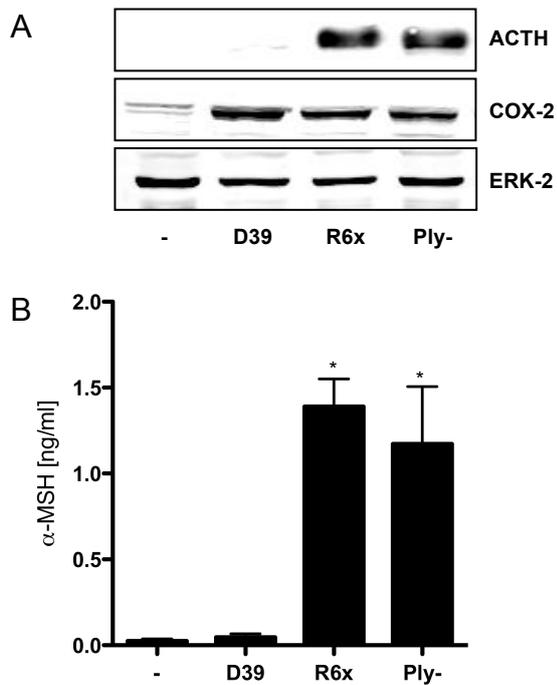
## 4.3 Untersuchung verschiedener Pathogenitätsfaktoren

### 4.3.1 Die Bedeutung von Kapsel und Pneumolysin für die $\alpha$ -MSH-Induktion

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass ACTH und  $\alpha$ -MSH durch *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe induziert werden, sollten nun hierfür verantwortliche Pneumokokken-Virulenzfaktoren identifiziert werden. Im Detail wurde die Auswirkung einer Bekapselung sowie die Bedeutung eines weiteren wichtigen Virulenzfaktors – dem Pneumolysin – untersucht. Hierfür wurden neben der unbekapselten Mutante *S. pneumoniae* R6x der bekapselte Wildtyp D39 (Serotyp 2) und eine pneumolysin-defiziente Mutante R6x $\Delta$ ply eingesetzt. Die humanen Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B wurden mit den unterschiedlichen Erregern ( $10^7$  cfu/ml) jeweils über sechs Stunden infiziert. Im Western Blot wurden die Proben hinsichtlich der ACTH-Induktion untersucht. Um nachzuweisen, dass es nach Zugabe der Erreger tatsächlich auch zu einer Infektion der Zellen kommt, wurde zudem ein Cyclooxygenase-2-Antikörper (COX-2) eingesetzt. Nach *S. pneumoniae*-Infektion von humanen Bronchialepithelzellen kommt es zuverlässig zu einer COX-2-Aktivierung, die durch den NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsweg vermittelt wird (N'Guessan, Hippenstiel et al. 2006). Zur  $\alpha$ -MSH-Detektion wurden  $\alpha$ -MSH-ELISAs eingesetzt.

Nach einer Infektion mit dem bekapselten Wildtyp D39 konnte weder durch Western Blot Analysen noch mittels ELISA eine Induktion von ACTH oder  $\alpha$ -MSH nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch die deutliche Induktion der COX-2, so dass davon auszugehen ist, dass eine Infektion der Zellen stattgefunden hat.

Die unbekapselte Mutante *S. pneumoniae* R6x bewirkte, ebenso wie ihre pneumolysin-defiziente Mutante, eine deutliche Induktion von ACTH,  $\alpha$ -MSH und COX-2 (Abb. 4.3.1 A-B).



**Abb. 4.3.1 A-B: Auswirkung von Kapsel und Pneumolysin auf die ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Induktion**

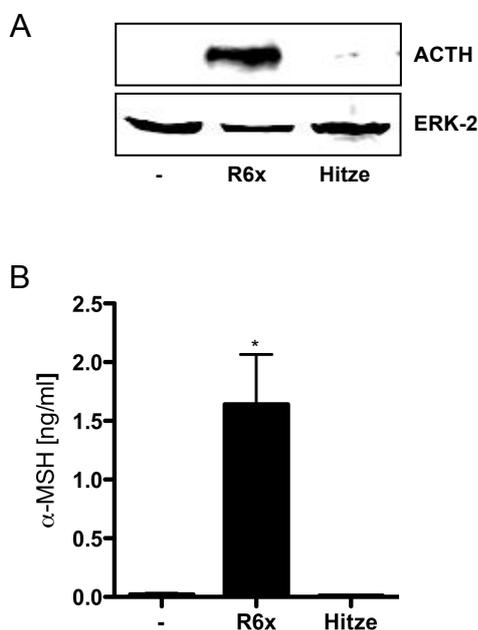
BEAS-2B-Zellen wurden mit dem bekapselten Wildtyp D39, der nicht-bekapselten Mutante R6x sowie deren pneumolysin-defizienter Mutante R6x $\Delta$ ply infiziert ( $10^7$  cfu/ml). Durch den bekapselten Erreger wurde weder ACTH (A) noch  $\alpha$ -MSH (B) induziert. Das Fehlen von Pneumolysin hingegen hatte keinen signifikanten Einfluss auf die ACTH- oder  $\alpha$ -MSH-Induktion. COX-2 wurde als Stimulationskontrolle eingesetzt. Der Nachweis von ERK-2 wurde als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist jeweils ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot (A). Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Im Vergleich zum Leerwert signifikante ( $p < 0,05$ ) Anstiege der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

### 4.3.2 Einsatz hitzeinaktivierter Erreger

Bisher konnte gezeigt werden, dass ACTH und  $\alpha$ -MSH durch lebende Pneumokokken in pulmonalem Gewebe induziert werden können. Jedoch kam es *in vitro* beim Einsatz bekapselter Erreger nicht zur ACTH- und  $\alpha$ -MSH Induktion. Nachfolgend sollte überprüft werden, ob hitzeinaktivierte Erreger in der Lage sind, ACTH und  $\alpha$ -MSH zu induzieren. Eine Hitzeinaktivierung der Erreger bewirkt die Denaturierung von Proteinstrukturen.

Um dies zu untersuchen, wurden BEAS-2B-Zellen mit der lebenden *S. pneumoniae*-Mutante R6x ( $10^7$  cfu/ml) und dem hitzeinaktivierten R6x ( $10^8$  cfu/ml) über sechs Stunden infiziert. Die inaktivierten Erreger wurden in einer erhöhten Konzentration eingesetzt, um den Konzentrationsunterschied zum lebenden Erreger auszugleichen, da sich dieser während der Inkubationszeit weiter repliziert. Es zeigte sich, dass es nur nach einer Infektion mit dem lebenden Erreger R6x zur ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Induktion kommt, nach der Hitzeinaktivierung der Erreger zeigte sich kein Effekt. Dies gibt den Hinweis darauf, dass die beobachteten Ergebnisse auf einer hitzelabilen Erregerstruktur beruhen.



**Abb. 4.3.2 A-B: Hitzeinaktivierte Erreger bewirken keine ACTH- oder  $\alpha$ -MSH-Induktion**

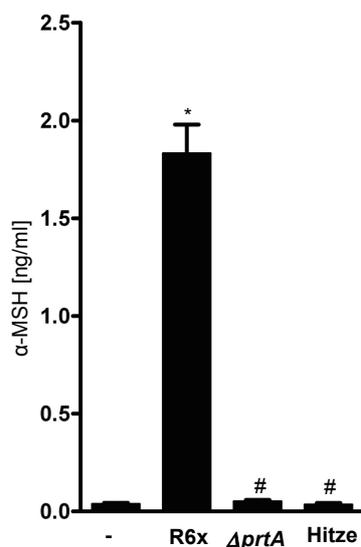
BEAS-2B-Zellen wurden mit dem lebenden *S. pneumoniae* ( $10^7$  cfu/ml) sowie dem hitzeinaktivierten R6x ( $10^8$  cfu/ml) infiziert. Nur nach Infektion mit dem vitalen Erreger kam es zur Induktion von ACTH (A) und  $\alpha$ -MSH (B). Der Nachweis von ERK-2 wurde als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot. Der Graph (B) zeigt eine Zusammenfassung von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zum Leerwert signifikante ( $p < 0,05$ ) Anstiege der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

### 4.3.3 Die Serinprotease PrtA

#### 4.3.3.1 $\alpha$ -MSH wird durch PrtA induziert

Die zellwandständige Serin-Protease PrtA ist ein Oberflächenprotein der Pneumokokken und wurde erstmals 2001 von Bethe und Kollegen beschrieben (Bethe, Nau et al. 2001). Sie gehört der Familie der Subtilisin-ähnlichen Proteasen (auch Subtilasen genannt) an und ist mit Proteasen verwandt, die in Laktokokken, Laktobazillen und Streptokokken mit Edopeptidase-Aktivität beschrieben wurden (Siezen 1999). Diese Proteasen können durch das Spalten von Wirtsproteinen zur Virulenz der Erreger beitragen.

Im nachfolgenden Versuch wurde die Bedeutung dieses in seiner Funktion bisher recht unbekanntes Pneumokokken-Virulenzfaktors hinsichtlich der  $\alpha$ -MSH-Induktion untersucht. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen mit dem Erreger R6x ( $10^7$  cfu/ml), hitzeinaktivierten R6x ( $10^8$  cfu/ml) oder einer PrtA-defizienten Mutante, R6x $\Delta$ prtA ( $10^7$  cfu/ml), über 24 Stunden infiziert. Interessanterweise zeigte sich, dass das Fehlen von PrtA eine  $\alpha$ -MSH-Induktion verhinderte. Es kam nur nach der Infektion durch *S. pneumoniae* R6x zur  $\alpha$ -MSH-Induktion (Abb. 4.3.3.1 A).



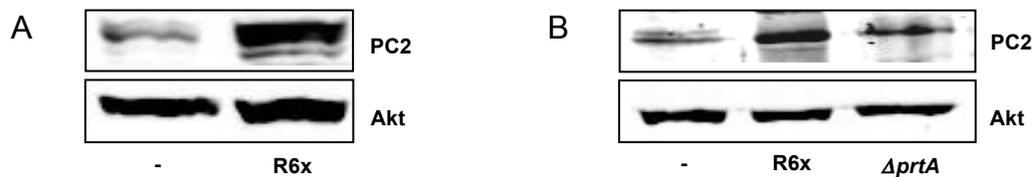
**Abb. 4.3.3.1: Die  $\alpha$ -MSH-Induktion durch *S. pneumoniae* in humanen Bronchialepithelzellen ist PrtA-abhängig**

BEAS-2B-Zellen wurden für 24 Stunden mit *S. pneumoniae* R6x, der PrtA-defizienten Mutante R6x $\Delta$ prtA oder hitze-inaktivierten R6x (Hitze) infiziert. Die  $\alpha$ -MSH-Induktion wurde im  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zum Leerwert signifikante ( $p < 0,05$ ) Anstiege der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Signifikante Reduktionen von  $\alpha$ -MSH im Vergleich zum Erreger R6x wurden mit einem # gekennzeichnet.

#### 4.3.3.2 PrtA induziert die Prohormon-Convertase 2

$\alpha$ -MSH entsteht durch die Spaltung von ACTH durch die Prohormon-Convertase 2 (PC2). Es sollte untersucht werden, ob es nach einer *S. pneumoniae*-Infektion in humanen Bronchialepithelzellen zu einer Induktion der PC2 kommt. Die BEAS-2B-Zellen wurden hierfür für 4 Stunden mit *S. pneumoniae* infiziert. Im Western Blot wurden die Proben mit PC2-spezifischen Antikörpern untersucht (Abb. 4.3.3.2 A).

In einem weiteren Versuch wurde neben *S. pneumoniae* R6x auch der PrtA-defiziente Erreger R6x $\Delta$ *prtA* eingesetzt. Hier zeigte sich, dass der PrtA-defiziente Erreger keine PC2-Induktion hervorrief. Die Induktion der PC2 durch *S. pneumoniae* scheint somit von der Serinprotease PrtA abhängig zu sein (Abb. 4.3.3.2 B).

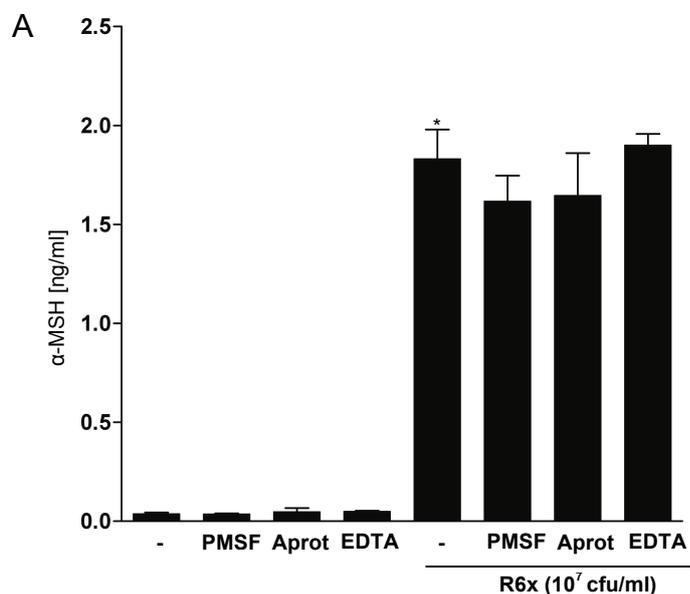


**Abb. 4.3.3.2 A-B: Die PC2-Induktion durch *S. pneumoniae* in humanen Bronchialepithelzellen ist PrtA-abhängig**

BEAS-2B-Zellen wurden für 4 Stunden mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Die PC2-Aktivität wurde mittels Western Blot untersucht (A). Weiterhin wurde die Rolle der PrtA bei der PC2-Induktion durch Pneumokokken untersucht. Hierfür wurden BEAS-2B-Zellen mit *S. pneumoniae* R6x oder der PrtA-defizienten Mutante R6x $\Delta$ *prtA* infiziert ( $10^7$  cfu/ml) (B). Die PC2-Aktivität wurde mittels Western Blot untersucht. Akt wurde als Beladungskontrolle eingesetzt. Abgebildet wurde ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot.

#### 4.3.3.3 $\alpha$ -MSH wird durch PrtA PC2-unabhängig induziert

Die Bedeutung von PrtA und der PC2 für die  $\alpha$ -MSH-Induktion in humanen Bronchialepithelzellen sollte nun genauer untersucht werden. BEAS-2B-Zellen wurden daher für eine Stunde mit verschiedenen Inhibitoren zellulärer Serinproteasen – zu denen auch die PC2 gehört – vorinkubiert und nachfolgend mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert. Die  $\alpha$ -MSH-Induktion wurde mittels  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht. Eine Inaktivierung zellulärer Proteasen hatte keine signifikante Veränderung der  $\alpha$ -MSH-Konzentration zur Folge (Abb. 4.3.3.3 A).

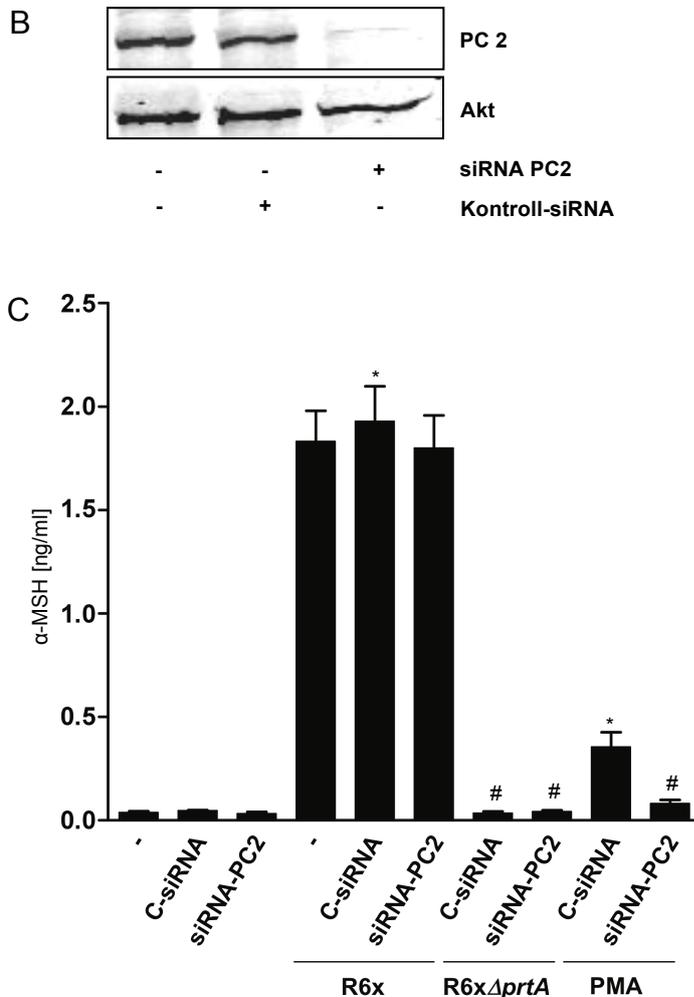


**Abb. 4.3.3.3 A: *S. pneumoniae* induziert PC2-unabhängig  $\alpha$ -MSH durch PrtA in humanen Bronchialepithelzellen**

Um die Beteiligung von PrtA bei der Pneumokokken-induzierten  $\alpha$ -MSH-Expression weiter zu untersuchen, wurden BEAS-2B-Zellen für eine Stunde mit Inhibitoren von zellulären Serinproteasen (z.B. PC2) vorinkubiert: Eingesetzt wurden PMSF (1 mM), Aprotinin (2  $\mu$ g/ml) und EDTA (10 mM). Danach erfolgte die Infektion der Zellen mit *S. pneumoniae*. Die  $\alpha$ -MSH-Konzentration in den Mediumüberständen wurde mittels ELISA bestimmt (A). Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Ein im Vergleich zum Leerwert signifikanter ( $p < 0,05$ ) Anstieg der  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Durch die Inhibition der zellulären Proteasen kam es nicht zur signifikanten Reduktion des *S. pneumoniae*-induzierten  $\alpha$ -MSHs.

Um die endogene PC2-Bildung zu hemmen, wurden zusätzlich Transfektionsversuche mit PC2-siRNA durchgeführt. Hierfür wurden die BEAS-2B-Zellen über 72 Stunden mit PC2-spezifischer siRNA oder non-silencing Kontroll-siRNA (C-siRNA) inkubiert. Um den Erfolg der Methode zu überprüfen wurden die Proben dann mit Western Blot Lysepuffer lysiert und mit PC2-spezifischen Antikörpern im Western Blot untersucht. Es zeigte sich, dass die PC2-spezifische siRNA die Expression dieser Protease inhibieren konnte (Abb. 4.3.3.3 B).

Die transfizierten Zellen wurden dann mit *S. pneumoniae* R6x oder R6x $\Delta$ prtA infiziert; als Positivkontrolle wurde der PKC-Aktivator PMA (100 nM) eingesetzt (Sei, Toneff et al. 2002). Die Mediumüberstände wurden nachfolgend im  $\alpha$ -MSH-ELISA untersucht. Es zeigte sich eine PC2-unabhängige  $\alpha$ -MSH-Induktion. Sowohl in den mit PC2-siRNA-behandelten Zellen als auch nach Einsatz von Kontroll-siRNA konnten nach der Infektion mit *S. pneumoniae* R6x unverändert hohe  $\alpha$ -MSH-Mengen nachgewiesen werden. Die PrtA-defiziente Mutante induzierte erwartungsgemäß kein  $\alpha$ -MSH. Nach Einsatz der PC2-siRNA kam es zu einer deutlichen Reduktion des durch PMA-induzierten  $\alpha$ -MSH. (Abb. 4.3.3.3 C).



**Abb. 4.3.3.3 B-C: *S. pneumoniae* induziert PC2-unabhängig  $\alpha$ -MSH durch PrtA in humanen Bronchialepithelzellen**

Um die Expression von endogener PC2 zu hemmen, wurden RNAi-Experimente in BEAS-2B-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit PC2-spezifischer siRNA sowie mit non-silencing Kontroll-siRNA (C-siRNA) inkubiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot untersucht (B). Zudem wurden die BEAS-2B-Zellen mit Kontroll-siRNA oder PC2-siRNA für 72 Stunden inkubiert, bevor sie mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml), R6x $\Delta$ prtA ( $10^7$  cfu/ml), oder PMA (100 nM) infiziert wurden. Die  $\alpha$ -MSH-Konzentration wurde im ELISA ermittelt. Abgebildet wurde ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot (B). Die ELISA-Ergebnisse werden als Zusammenfassung von vier voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen gezeigt.

\*:  $p < 0,05$ : Vergleich mit nicht-infizierten Kontrollzellen;

#:  $p < 0,05$ : Wildtyp-Bakterien versus Mutanten oder Kontroll-siRNA versus Ziel-siRNA.

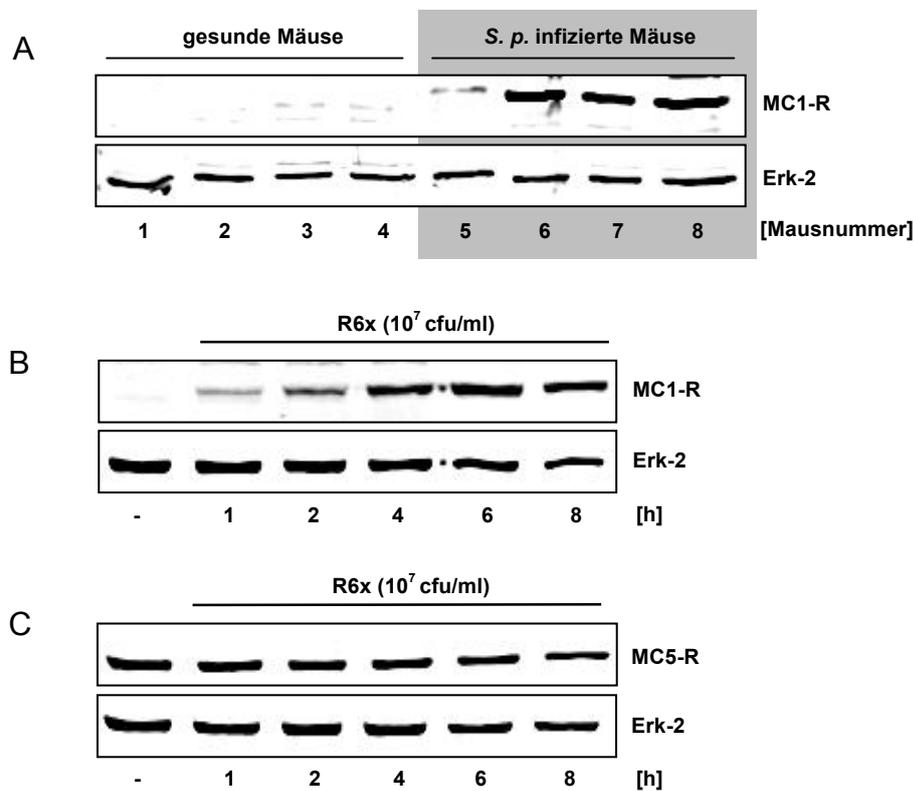
#### 4.4 Untersuchung der Melanocortin-Rezeptoren MC1-R und MC5-R

Es sind fünf verschiedene Rezeptoren bekannt, an welche die Melanocortine binden und nachfolgend ihre Wirkung entfalten können. Nahezu allen Zelltypen, die an der Regulierung von Entzündungsprozessen beteiligt sind, exprimiert einen oder mehrere Subtypen der Melanocortin-Rezeptoren (Catania, Airaghi et al. 2000). Eine antiinflammatorische bzw. immunregulatorische Funktion wurde bisher für den MC1-R, den MC3-R und den MC5-R beschrieben (Catania, Gatti et al. 2004).

Der wohl am meisten verbreitete Rezeptor ist der MC1-R. Er findet sich vorwiegend in Melanozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie Makrophagen und hat eine bedeutende Funktion bei der Vermittlung antiinflammatorischer und antipyretischer Effekte. Der MC5-R wird in verschiedenen Organen, unter anderem auch der Lunge, exprimiert; seine Expression in B- und T-Lymphozyten lässt eine immunregulatorische Funktion vermuten (Getting 2006). Die MC2-, MC3- und MC4-Rezeptoren werden hauptsächlich in Zellen des zentralen Nervensystems bzw. in Fettzellen, Muskelgewebe oder Nebennieren gefunden (Brzoska, Luger et al. 2008); sie wurden daher nicht in die vorliegenden Untersuchungen miteinbezogen.

Es sollte die Auswirkung einer Infektion von pulmonalem Gewebe mit *S. pneumoniae* auf die Expression des MC1-R und des MC5-R untersucht werden. Hierfür wurden Mauslungenlysate und Lysate aus BEAS-2B-Zellen im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen diese Rezeptoren untersucht. Die Mäuse waren zuvor für 24 h mit dem bekapselten *S. pneumoniae*-Stamm NCTC7978 (Serotyp 3) infiziert worden. Die BEAS-2B-Zellen wurden mit *S. pneumoniae* R6x ( $10^7$  cfu/ml) infiziert.

Es zeigte sich, dass der MC1-R nach Pneumokokken-Infektion *in vivo* (Abb. 4.4 A) und *in vitro* (Abb. 4.4 B) in pulmonalem Gewebe induziert wird. Für den MC5-R konnte keine Änderung gezeigt werden (Abb. 4.4 C).



**Abb. 4.4 A-C: S. pneumoniae induziert den MC1-R in pulmonalem Gewebe**

Die Auswirkung einer *S. pneumoniae*-Infektion auf den MC1- und MC5-R wurde mittels Western Blot untersucht. Es konnte nachgewiesen werden dass der MC1-R nach Infektion mit *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe von Mäusen (A) als auch in humanen Bronchialepithelzellen (B) induziert wird. Der MC5-R wird bereits in nicht infizierten Zellen deutlich exprimiert. Nach Pneumokokken-Infektion zeigte sich hier keine Änderung (C). Der Nachweis von ERK-2 wurde als Beladungskontrolle verwendet. Abgebildet ist jeweils ein aus drei unabhängigen Experimenten ausgewählter repräsentativer Blot.

## 5 Diskussion

Pneumokokken verursachen auch heutzutage noch den prozentual größten Anteil an ambulant erworbenen Pneumonien. Vor allem bei Kindern, alten Menschen oder immunsupprimierten Patienten besitzt die Pneumonie durch *S. pneumoniae* eine hohe Morbidität und Mortalität. Seit einigen Jahren existiert eine Impfung gegen 23 Kapseltypen (für Erwachsene) bzw. 7 Kapseltypen (für Kinder), welche die Erkrankungen durch die am häufigsten vertretenen Stämme abdeckt. Die Inzidenz der Pneumokokken-Erkrankungen konnte so zwar deutlich gesenkt werden (Pilishvili, Lexau et al.); jedoch bietet die Impfung keinen hundertprozentigen Schutz.

Die zunehmende Resistenzbildung der Pneumokokken gegen Penicilline und Makrolide – Antibiotika, die bei ambulant erworbenen Pneumonien häufig verordnet werden – stellt ein ernst zu nehmendes Problem dar. Daher ist die Suche nach alternativen Behandlungsstrategien derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Einen möglichen Ansatz stellt hier eine Therapie mit körpereigenen antimikrobiellen Peptiden dar, zu denen auch das Peptidhormon  $\alpha$ -MSH gezählt wird.  $\alpha$ -MSH vermittelt zudem antiinflammatorische Effekte.

In der vorliegenden Studie wurde die Bedeutung von  $\alpha$ -MSH für eine durch *S. pneumoniae* verursachte Pneumonie am Beispiel von pulmonalem Gewebe von Mäusen und humanen Bronchialepithelzellen untersucht.

### 5.1 Die pneumokokkenvermittelte Induktion von ACTH und $\alpha$ -MSH in pulmonalem Gewebe

Die Lunge ist auf Grund ihrer großen Oberfläche ständig einer Vielzahl von potentiell pathogenen Erregern ausgesetzt. Sie zählt – neben Haut und Gastrointestinaltrakt – zu den sogenannten Barriereorganen und ist damit ein wichtiger Bildungsort von verschiedenen antimikrobiellen Peptiden, wie z.B. von Defensinen oder Cathelicidin (Devine 2003).

Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das aus POMC hervorgehende Peptidhormon ACTH als auch das antimikrobiell und antiinflammatorisch wirksame  $\alpha$ -MSH selbst durch eine Infektion mit *S. pneumoniae in vivo* induziert wird. Anhand der Untersuchung von in einem Maus-Pneumonie-Modell gewonnenen Gesamtlungenlysaten

wurde gezeigt, dass es im Rahmen einer Pneumokokken-Pneumonie zur Bildung von  $\alpha$ -MSH und ACTH in pulmonalem Gewebe kommt (Abb. 4.2 A-B).

Der Einfluss verschiedener inflammatorischer Krankheitsbilder auf die  $\alpha$ -MSH-Bildung ist in der Literatur gut belegt. So zeigte sich, dass verschiedene proinflammatorische Stimuli wie beispielsweise IL-1 zur Hochregulierung der POMC-mRNA und der Expression der POMC-abhängigen Peptide inklusive  $\alpha$ -MSH führen (Slominski, Wortsman et al. 2000). Auch nach einer Bestrahlung der Haut mit UV-Licht konnte die Hochregulierung von  $\alpha$ -MSH und des MC1-Rezeptor nachgewiesen werden (Schiller, Brzoska et al. 2004). Catania und Kollegen zeigten, dass  $\alpha$ -MSH bei HIV-infizierten Patienten in erhöhter Konzentration vorliegt (Catania, Airaghi et al. 1998). Ebenfalls rief eine Endotoxin-Injektion bei gesunden Probanden eine  $\alpha$ -MSH-Erhöhung hervor (Catania, Suffredini et al. 1995). Beim Vorliegen eines septischen Syndroms allerdings kam es zur Senkung des  $\alpha$ -MSH-Levels. Die Gründe hierfür sind nicht vollständig geklärt, möglicherweise jedoch kommt es durch einen erhöhten endogenen Dopamin-Spiegel zur Hemmung der  $\alpha$ -MSH-Freisetzung (Catania, Cutuli et al. 2000). Auch bei Arthritis-Patienten konnten erhöhte  $\alpha$ -MSH-Spiegel nachgewiesen werden; der Spiegel war umso höher, je stärker die Inflammation ausgeprägt war (Catania, Gerloni et al. 1994). Bei Patienten, die nach einem Myokardinfarkt eine thrombolytische Therapie erhielten, waren die  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen ebenfalls erhöht (Airaghi, Lettino et al. 1995).

Auch die *in vitro* Untersuchung von humanen Bronchialepithelzellen zeigte, dass nach Infektion der Zellen mit *S. pneumoniae* in diesen ACTH und  $\alpha$ -MSH induziert werden (Abb. 4.2 C-D). Proopiomelanocortin und die daraus entstehenden Peptide (Abb. 1.4) werden im zentralen Nervensystem und vielen verschiedenen extraneuralen Geweben gebildet. Unter anderem wurde die Bildung von  $\alpha$ -MSH in der Hypophyse, in Melanozyten, in Epithelien der Haut und des Gastrointestinaltraktes, in Monozyten, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen nachgewiesen (Maaser, Kannengiesser et al. 2006). Unter normalen Bedingungen können diese Peptide jedoch nur in geringer Menge detektiert werden.

Bisher war eine Untersuchung von humanen Bronchialepithelzellen diesbezüglich nicht erfolgt. In der vorliegenden Studie konnte somit erstmals der Nachweis erbracht werden, dass es auch hier zur Bildung von ACTH und  $\alpha$ -MSH kommen kann. Da, wie beschrieben, auch in Epithelien der Haut und des Gastrointestinaltrakts eine ACTH- und

$\alpha$ -MSH-Bildung erfolgt, könnte vermutet werden, dass Epithelien organunabhängig die Eigenschaft besitzen,  $\alpha$ -MSH zu bilden.

Das Vorkommen von  $\alpha$ -MSH bei den verschiedenen inflammatorischen Krankheitsbildern weist möglicherweise auf seine wichtige Funktion als Bestandteil des angeborenen Immunsystems hin.

## **5.2 Vergleich verschiedener Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae***

Es konnte nachgewiesen werden, dass es nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* zur Induktion der Peptidhormone ACTH- und  $\alpha$ -MSH in pulmonalem Gewebe kommt. Um die für diesen Effekt eventuell verantwortlichen pathogenen Erregerstrukturen näher einzugrenzen, wurde am Beispiel von humanen Bronchialepithelzellen der Linie BEAS-2B die Auswirkung verschiedener Pneumokokken-Virulenzfaktoren auf die ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Bildung untersucht. Im Einzelnen wurden hier die Polysaccharidkapsel, das Zytolysin Pneumolysin und die pneumokokkeneigene zellwand-assoziierte Serinprotease PrtA, die durch Spalten von Wirtsproteinen zur Virulenz des Erregers beitragen könnte, genauer betrachtet.

### **5.2.1 Polysaccharidkapsel**

Interessanterweise zeigte sich nach der Infektion von humanen Bronchialepithelzellen mit dem bekapselten Wildtyp *S. pneumoniae* D39 (Serotyp 2) keine Induktion von ACTH bzw.  $\alpha$ -MSH (Abb. 4.3.1 A-B).

Es existieren mindestens 91 verschiedene Kapseltypen, deren Ausprägung unterschiedlich stark sein kann. Klinisch relevante Pneumokokkenisolate besitzen – bis auf wenige Ausnahmen, z.B. im Rahmen einer Konjunktivitis (Martin, Turco et al. 2003) – praktisch alle eine Kapsel. Die Kapsel scheint somit von entscheidender Bedeutung für die Virulenz des Erregers zu sein (Kadioglu, Weiser et al. 2008).

Es ist bekannt, dass durch die Polysaccharidkapsel der Pneumokokken Erregerbestandteile maskiert werden und so die Bildung von verschiedenen phagozytenaktivierenden Zytokinen reduziert ist (Kadioglu, Weiser et al. 2008; Martner, Skovbjerg et al. 2009; Melin, Jarva et al. 2009). Vermutlich sind ähnliche Mechanismen für die fehlende  $\alpha$ -MSH-Induktion bei einer Infektion mit bekapselten Erregern verantwortlich. Durch die Bekapselung könnten Erregerbestandteile, die die  $\alpha$ -MSH-Induktion verursachen, verdeckt werden, und so den Verlauf der unspezifischen Immunabwehr des Wirts

beeinflussen. Die fehlende Induktion des antiinflammatorisch und antimikrobiell wirksamen  $\alpha$ -MSHs könnte also zur Virulenz der Pneumokokken beitragen.

Allerdings erschwert die Bekapselung der Pneumokokken die direkte Interaktion zwischen Erreger und Zelle (Magee and Yother 2001). Es könnte aus diesem Grund vermutet werden, dass die fehlende  $\alpha$ -MSH-Induktion durch den mangelnden Kontakt zwischen Erreger und Zelle bedingt ist. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da durch den Nachweis einer deutlichen COX-2-Induktion (Abb. 4.3.1 A), welche über den TLR2 vermittelt wird (Bernard and Gallo ; N'Guessan, Hippenstiel et al. 2006), gezeigt werden konnte, dass grundsätzlich eine Interaktion zwischen Zellen und Erreger stattgefunden hat.

In den Mauslungenlysaten aus einem Maus-Pneumonie-Modell konnte eine Induktion von ACTH und  $\alpha$ -MSH nachgewiesen werden, obwohl die Tiere ebenfalls mit einem bekapselten Stamm (Pneumokokken-Serotyp 3 NCTC7978) infiziert worden waren. Dies ist vermutlich durch die Eigenschaft der bekapselten Pneumokokken bedingt, während des Kontakts zu Atemwegsepithelzellen die Dicke ihrer Kapsel zu reduzieren (Hammerschmidt, Wolff et al. 2005). Eventuell wird eine  $\alpha$ -MSH-Induktion somit erst bei geringerer Kapselausprägung möglich. Da es sich bei den Proben um Gesamtlungenlysate handelt, ist eine genaue Zuordnung der  $\alpha$ -MSH-Induktion zu einer Zellgruppe nicht möglich. Eine Beteiligung von Bronchialepithelzellen ist jedoch sehr wahrscheinlich, da diese, wie oben beschrieben, bereits in *in vitro* Versuchen nachgewiesen wurde.

Obwohl es unwahrscheinlich scheint, kann letztendlich nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Unterschiede in der ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Induktion durch die verschiedenen eingesetzten Serotypen 2 und 3 bedingt sind.

Um die Bedeutung der Polysaccharidkapsel für die Induktion von ACTH und  $\alpha$ -MSH weiterführend zu klären, sind nachfolgende Versuche mit unterschiedlichen *S. pneumoniae*-Serotypen erforderlich.

### **5.2.2 Pneumolysin und hitzeinaktivierte Erreger**

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor, der in allen klinischen Pneumokokkenisolaten zu finden ist, ist das Zytolysin Pneumolysin, welches durch Autolyse des *Pneumococcus* freigesetzt wird und die Invasion in die Zellen begünstigt.

In den vorliegenden Versuchen zeigten sowohl der nicht-bekapselte Erreger R6x als auch dessen pneumolysin-defiziente Mutante R6x $\Delta$ p/ly eine deutliche ACTH- und  $\alpha$ -MSH-Induktion ohne signifikante Unterschiede (Abb. 4.3.1 A-B). Das Fehlen von Pneumolysin war für die hier beobachteten Effekte somit nicht von Bedeutung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Pneumolysin für die  $\alpha$ -MSH-Induktion unerheblich ist.

Beim Vergleich von vitalen und hitzeinaktivierten *S. pneumoniae* R6x zeigte sich, dass nur die lebenden Erreger in der Lage waren, ACTH und  $\alpha$ -MSH zu induzieren (Abb. 4.3.2 A-B). Dies kann als indirekter Hinweis dafür angesehen werden, dass eine hitzlabile Proteinstruktur des Erregers – möglicherweise die nachfolgend untersuchte zellwand-assoziierte Serinprotease PrtA – für die  $\alpha$ -MSH-Induktion verantwortlich sein muss.

### 5.2.3 Die Serinprotease PrtA und die Prohormon-Convertase 2

Das aktive Peptidhormon  $\alpha$ -MSH entsteht in den Zellen durch gewebsspezifische Spaltung des Propeptids POMC. Dabei bewirkt die Prohormon-Convertase 2 die Abspaltung von  $\alpha$ -MSH aus ACTH. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Erreger *S. pneumoniae* R6x zur direkten Aktivierung der PC2 führt (Abb. 4.3.3.2 A).

Bei der Untersuchung weiterer Pneumokokken-Virulenzfaktoren zeigte sich, dass Erreger, die die zellwandassoziierte Serinprotease PrtA nicht besitzen (*S. pneumoniae* R6x $\Delta$ prtA) nicht zur Induktion von  $\alpha$ -MSH und der PC2 führten (Abb. 4.3.3.1, Abb. 4.3.3.2 B). Damit konnte indirekt nachgewiesen werden, dass PrtA  $\alpha$ -MSH und die PC2 in humanen Bronchialepithelzellen induziert. Die  $\alpha$ -MSH-Induktion selbst war jedoch PC2-unabhängig (Abb. 4.3.3.3 A-C), was zeigt, dass der Erreger in der Lage ist, direkten Einfluss auf das angeborene Immunsystem zu nehmen. Die Serinprotease PrtA scheint zu einer schnellen Spaltung von POMC und ACTH zu führen und bewirkt somit initial einen schnellen  $\alpha$ -MSH-Anstieg. Die  $\alpha$ -MSH-Konzentration wird zudem durch die zusätzliche Induktion der PC2 durch PrtA weiter unterhalten, so dass eine zweizeitige  $\alpha$ -MSH-Induktion vermutet werden kann.

Über die genaue Funktion der Serinprotease PrtA ist in der Literatur derzeit nicht sonderlich viel bekannt. PrtA wird als Precursor-Protein produziert und nach Reifung in die Umgebung der Zelle abgegeben (Bethe, Nau et al. 2001). Möglicherweise dringt die reife PrtA in die Zellen ein und bewirkt eine Konversion von ACTH zu  $\alpha$ -MSH oder eine

Aktivierung der PC2, da diese Subtilisin-ähnliche Serinprotease den Prohormon-Konvertasen in molekularer und funktioneller Hinsicht ähnlich ist (Rockwell, Krysan et al. 2002). Für verschiedene Subtilisin-artige Serinproteasen konnten bereits ähnliche Beobachtungen gemacht werden: Sie trugen zur Virulenz von Erregern durch Spaltung eukaryotischer Zellproteine bei (Seidah, Chretien et al. 1994; Rago, Vath et al. 2000; Paton, Beddoe et al. 2006). Diese Proteasen scheinen also durch direkte Beeinflussung wichtiger zellulärer Stoffwechselfvorgänge unter Umgehung der klassischen Signalwege zu wirken. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass PrtA-defiziente Pneumokokken-Mutanten geringer virulent waren (Bethe, Nau et al. 2001). Die fehlende  $\alpha$ -MSH-Induktion könnte eventuell der Grund für die von Bethe und Kollegen nachgewiesene verringerte Virulenz dieser Mutanten sein, da gezeigt wurde, dass hohe Konzentrationen von  $\alpha$ -MSH die Immunantwort bei Pneumonie schwächen (Schulte-Herbruggen, Quarcoo et al. 2008)

Dies unterstützt die Annahme, dass PrtA eine wichtige Funktion bei der Pneumokokken-Pneumonie einnehmen könnte. Da  $\alpha$ -MSH ein bedeutsames immunmodulatorisches Peptid ist und da eine Kontrolle der Immunantwort wichtig für eine bakterielle Clearance und Verhinderung stärkerer Gewebsschäden durch die Pneumonie ist, könnte der beschriebene Mechanismus wichtig für die Pathogenese der Pneumokokken-Pneumonie sein.

### **5.3 Die Melanocortin-Rezeptoren**

Die Wirkung der Melanocortine wird über die G-Protein-gekoppelten Melanocortin-Rezeptoren vermittelt. Von den fünf bekannten Rezeptoren waren vor allem der MC1-R und der MC5-R von besonderem Interesse, da eine Expression beider in der Lunge bekannt ist und  $\alpha$ -MSH als starker Agonist dieser Rezeptoren gilt (Getting 2006).

#### **5.3.1 Der MC1-Rezeptor**

Es konnte beobachtet werden, dass eine pulmonale Infektion mit *S. pneumoniae* am Beispiel von Mauslungenlysaten und humanen Bronchialepithelzellen zur schnellen Hochregulation des MC1-R im Gewebe führt (Abb. 4.4 A-B). In den nicht-infizierten Versuchstieren bzw. Zellen konnte der Rezeptor nicht nachgewiesen werden. Es ist daher zu vermuten, dass diesem Rezeptor eine grundsätzliche Bedeutung für den Ablauf der Inflammation bei einer Pneumokokken-Pneumonie zukommt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den Ergebnissen verschiedener Kollegen, welche nachweisen

konnten, dass dieser Rezeptor bei inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt.

So zeigten beispielsweise Bhardwaj und Kollegen, dass es nach drei- bis fünf-tägiger Inkubation von Monozyten mit LPS oder Mitogen zur Hochregulation der MC1-R-Expression kam. Durch zusätzliche Zytokinbehandlung mit IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  der Zellen wurde dieser Effekt noch verstärkt. Die Hochregulation des Rezeptors scheint für die  $\alpha$ -MSH-vermittelte Modulierung der Immunantwort von Bedeutung zu sein (Bhardwaj, Becher et al. 1997). Kameyama und Kollegen zeigten, dass Interferone zur vermehrten Expression von Melanocortin-Rezeptoren in murinen Melanom-Zellen führten (Kameyama, Tanaka et al. 1989).

In einem Maus-Meningitis-Modell konnten nach Infektion mit *S. pneumoniae* erhöhte Zytokin-mRNA-Level für IL-4, IL-10 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Diab, Zhu et al. 1997). Möglicherweise tragen also die erhöhten Zytokinspiegel nach einer Pneumokokken-Infektion dazu bei, eine Rezeptorinduktion zu verstärken.

$\alpha$ -MSH selbst wirkt ebenfalls als Induktor des MC1-Rezeptors. Die Behandlung von humanen Melanozyten mit  $\alpha$ -MSH führte zur Erhöhung des MC1-R mRNA- und Protein-Levels (Scott, Suzuki et al. 2002; Rouzaud, Annereau et al. 2003). Durch die Behandlung der Zellen mit dem Agouti-Protein – dem natürlichen Rezeptorantagonisten – kam es zur Reduktion der Expression. Das von den Pneumokokken nachgewiesenermaßen induzierte  $\alpha$ -MSH könnte also ebenfalls zur Rezeptorinduktion beitragen und somit die eigene Wirkung potenzieren.

Möglicherweise kann durch die Induktion des MC1-R, welcher vermutlich maßgeblich an der antiinflammatorischen Wirkung  $\alpha$ -MSHs beteiligt ist (Catania, Gatti et al. 2004), eine überschießende Gewebeschädigung mit nachfolgender Narbenbildung in der Lunge verhindert werden.

### **5.3.2 Der MC5-Rezeptor**

Der MC5-R kann in geringen Mengen in einer Vielzahl von peripheren Geweben (unter anderem der Lunge), nicht jedoch im ZNS, nachgewiesen werden.

Es zeigte sich, dass der MC5-R in humanen Bronchialepithelzellen konstitutiv exprimiert wird. Eine Infektion mit *S. pneumoniae* hatte allerdings keine Induktion des Rezeptors

zur Folge (Abb. 4.4 C), was jedoch eine  $\alpha$ -MSH-Wirkung über den bereits exprimierten Rezeptor nicht ausschließt.

Taylor und Kollegen zeigten, dass mit  $\alpha$ -MSH vorbehandelte T-Zellen den MC5-R exprimierten. Wurde dieser Rezeptor blockiert, konnte die IFN- $\gamma$ -Produktion von T-Zellen durch  $\alpha$ -MSH nicht mehr unterdrückt werden. Es wurde daher angenommen, dass die immunoregulatorische Funktion von  $\alpha$ -MSH in T-Zellen über den MC5-R vermittelt wird (Taylor and Namba 2001).

Bei Untersuchungen an MC5-R-Knockout-Mäusen jedoch konnte beispielsweise keine Veränderung von antiinflammatorischen oder neuroregenerativen Abläufen nach peripherer  $\alpha$ -MSH-Gabe beobachtet werden (Cone 2006). Auf Grund der hohen Sekretion in exokrinen Drüsen (unter anderem in Talgdrüsen, Tränendrüsen etc.) scheint die physiologische Funktion dieses Rezeptors schwerpunktmäßig in der Regulation dieser Drüsen zu liegen (Chen, Kelly et al. 1997).

Auch in der Lunge existiert eine Vielzahl schleimbildender Drüsenzellen, deren Sekret für die mukoziliäre Clearance durch das respiratorische Flimmerepithel von großer Bedeutung ist.  $\alpha$ -MSH könnte möglicherweise durch Bindung an den MC5-Rezeptor die Drüsenregulation beeinflussen und so die Beseitigung der Bakterien verbessern.

Zusammenfassend kann jedoch durch die gewonnenen Ergebnisse keine sichere Aussage bezüglich der Funktion beider Rezeptoren bei der durch *S. pneumoniae* vermittelten Pneumonie getroffen werden. Weitere Untersuchungen der Rezeptoren am Beispiel von Knockout-Mäusen könnten hierfür hilfreich sein.

## **5.4 Die biologische Bedeutung von $\alpha$ -MSH**

### **5.4.1 Antimikrobielle Aktivität**

Antimikrobielle Peptide sind wichtige Bestandteile der körpereigenen Immunabwehr. Als Peptidhormon mit antimikrobieller Wirkung und potenten antiinflammatorischen Eigenschaften wird Tridekapeptid  $\alpha$ -MSH zu dieser Gruppe gezählt. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass  $\alpha$ -MSH auch gegenüber dem grampositiven Diplococcus *Streptococcus pneumoniae* in einem breiten Konzentrationsspektrum antimikrobiell wirksam ist (Abb. 4.1 A-B).

Für  $\alpha$ -MSH, das wie andere antimikrobielle Peptide in den Epithelien von Barriereorganen wie Haut, Gastrointestinaltrakt (Catania, Airaghi et al. 2000) und Lunge (eigene Da-

ten) gebildet wird, konnten zuvor bereits mehrfach antimikrobielle Eigenschaften nachgewiesen werden. Cutuli und Kollegen beschrieben im Jahr 2000 die antimikrobielle Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH gegenüber zwei bedeutenden Pathogenen, dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus* und dem Hefepilz *Candida albicans*. Der antimikrobielle Mechanismus ist derzeit noch nicht vollständig geklärt; es gibt aber Anhaltspunkte dafür, dass der cAMP-Stoffwechsel von Bedeutung für die antimikrobielle Wirksamkeit ist (Cutuli, Cristiani et al. 2000). Interessanterweise führt die Bindung von  $\alpha$ -MSH an die G-Protein-gekoppelten Melanocortinrezeptoren in Säugetierzellen ebenfalls zur intrazellulären cAMP-Erhöhung durch die Aktivierung der Adenylatzyklase (Grieco, Rossi et al. 2005). Der vermutete antimikrobielle Wirkmechanismus und die Wirkung des Hormons über die hormonspezifischen Rezeptoren in Säugetierzellen scheinen sich somit möglicherweise ähnlich zu sein.

Ob Pneumokokken oder andere Bakterien und Hefepilze ebenfalls Melanocortin-Rezeptoren besitzen, oder ob es auf anderem Wege zur Aktivierung der Adenylatzyklase mit nachfolgender Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration kommt, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Madhuri und Kollegen bestätigten die Ergebnisse von Cutuli und Kollegen in einer aktuellen Untersuchung über die antimikrobielle Aktivität von  $\alpha$ -MSH gegenüber *Staphylococcus aureus* (sowohl MSSA als auch MRSA). Hier wird die Vermutung geäußert, dass die Abtötung der Erreger durch  $\alpha$ -MSH zumindest teilweise durch eine Membranpermeabilisierung hervorgerufen wird – allerdings konnte auch hier der genaue antimikrobielle Wirkmechanismus nicht näher beschrieben werden (Madhuri, Shireen et al. 2009). Es wurde ebenfalls beschrieben, dass  $\alpha$ -MSH die Aufnahme von *S. aureus* in menschliche Epithelzellen durch Herunterregulierung der Expression von HSP70 und Integrinen hemmte (Donnarumma, Paoletti et al. 2004).

Die antimikrobielle Aktivität von  $\alpha$ -MSH scheint also durch verschiedene Faktoren vermittelt zu werden. In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass  $\alpha$ -MSH antimikrobielle Wirksamkeit gegen *S. pneumoniae* besitzt. Es wurden jedoch keine Untersuchungen zum antimikrobiellen Wirkmechanismus durchgeführt, so dass diesbezüglich keine Aussage getroffen werden kann.

Im Widerspruch zu den gewonnenen Beobachtungen steht eine erneute Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von  $\alpha$ -MSH gegen *C. albicans*. Die Ergebnisse von Cutuli konnten hier von Rauch und Kollegen nicht reproduziert werden. Auch beim Einsatz

unphysiologisch hoher  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen kam es nicht zur Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten. Es wird daher die Empfehlung ausgesprochen, das tatsächliche antimikrobielle Potential von  $\alpha$ -MSH zusätzlich im Tiermodell zu untersuchen (Rauch, Holzmeister et al. 2009).

Um die hier vorgestellten *in vitro* Ergebnisse zu bestätigen, soll daher in zukünftigen Versuchen auch die antimikrobielle Wirksamkeit von  $\alpha$ -MSH gegen *S. pneumoniae in vivo* in einem Tiermodell nachgewiesen werden.

#### 5.4.2 Antiinflammatorische Wirkung

Neben den oben beschriebenen antimikrobiellen Effekten wurde für  $\alpha$ -MSH bereits eine Vielzahl von antiinflammatorischen Einflüssen *in vitro* und *in vivo* gezeigt. Es wurde daher auf den erneuten Nachweis dieser durch  $\alpha$ -MSH vermittelten Effekte verzichtet.

Es ist in der Literatur bekannt und mehrfach nachgewiesen, dass  $\alpha$ -MSH die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6 oder IL-8 und anderer proinflammatorischer Stoffe (z.B. von Prostaglandinen) hemmt. Auch kommt es zur Induktion des Zytokins IL-10, welches die Bildung von proinflammatorischen Mediatoren unterdrückt. IL-10 ist ein Schlüsselmediator der durch  $\alpha$ -MSH vermittelten antiinflammatorischen Effekte. Ein weiterer Schlüsselmechanismus der antiinflammatorischen  $\alpha$ -MSH-Wirkung ist die Hemmung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors „Nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF $\kappa$ B) (Brzoska, Luger et al. 2008). Auch die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten wird reduziert (Catania, Rajora et al. 1996). In zahlreichen Krankheitsmodellen im Tierversuch (Schlaganfall, allergische Atemwegsinfektion, Lungenversagen nach renaler Ischämie, akute Pankreatitis, Arthritis etc.) konnte  $\alpha$ -MSH bereits erfolgreich therapeutisch eingesetzt werden und so die *in vitro* beobachteten antiinflammatorischen Effekte zusätzlich *in vivo* bestätigt werden (Deng, Hu et al. 2004; Brzoska, Luger et al. 2008; Savos, Gee et al. 2010). So zeigten beispielsweise Colombo und Kollegen, dass es bei einer Bleomycin-induzierten Lungenschädigung in Ratten zur  $\alpha$ -MSH-Induktion kam. Bei zusätzlicher therapeutischer Gabe eines  $\alpha$ -MSH-Analogons konnte hier durch die antiinflammatorische Wirkung ein positiver Effekt beschrieben werden (Colombo, Gatti et al. 2007). In einem Kolitis-Mausmodell konnten die Symptome (Zellschädigung, Gewichtsabnahme) durch die Therapie mit einem rekombinanten,  $\alpha$ -MSH produzierenden *Lactobacillus casei* deutlich reduziert und das Überleben verbessert werden (Yoon, Lee et al. 2008).

Somit scheint  $\alpha$ -MSH eine entscheidende Rolle in der Modulation von inflammatorischen Prozessen und eventuell auch bei der bakteriellen Pneumonie zu spielen.

Möglicherweise bietet die antiinflammatorische Wirkung  $\alpha$ -MSHs jedoch nicht nur Vorteile. Der Einsatz von  $\alpha$ -MSH bei bakteriellen Infektionen in Tier-Modellen wurde bisher nur selten untersucht. Schulte-Herbrüggen und Kollegen untersuchten in einem Maus-Modell die antimikrobielle Immunantwort der Lunge nach zerebraler Ischämie im Hinblick auf die häufige postischämische Pneumonie. Es konnte eine schnelle Hochregulierung von  $\alpha$ -MSH in BAL-Proben nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich, dass eine zusätzliche Applikation von  $\alpha$ -MSH zur Erhöhung der Bakterienanzahl in der Lunge führte. Dies lässt die Autoren vermuten, dass eine erhöhte  $\alpha$ -MSH-Freisetzung die pulmonalen antibakteriellen Abwehrmechanismen schwächt und somit zu einer Verschlechterung der Prognose führen kann (Schulte-Herbrüggen, Quarcoo et al. 2008).

Eine zerebrale Ischämie stellt jedoch eine erhebliche Gesamtbelastung für den Organismus dar, so dass die erhaltenen Ergebnisse nicht auf ein reines Pneumonie-Modell übertragen werden können. Zudem besteht das Erregerspektrum der in dieser Studie beschriebenen postischämischen Pneumonie aus  $> 95\%$  *E. coli*. Eine antimikrobielle Wirksamkeit  $\alpha$ -MSHs gegen diesen Erreger wurde bisher nicht untersucht. Für *S. pneumoniae* hingegen konnte *in vivo* eine ausgeprägte antimikrobielle Wirksamkeit nachgewiesen werden (Abb. 4.1 A-B). Es kann somit keine Aussage für die Therapie einer durch *S. pneumoniae* verursachten Pneumonie getroffen werden. Die Ergebnisse sollten in zukünftigen Versuchen in einem Pneumokokken-Pneumonie-Modell an Mäusen nachvollzogen und erneut diskutiert werden.

## 5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das antimikrobielle Peptid  $\alpha$ -MSH in pulmonalem Gewebe durch eine Infektion mit *S. pneumoniae* induziert wird. Zudem konnte die antimikrobielle Aktivität gegen diesen Erreger nachgewiesen werden. Aufgrund der zunehmenden Resistenzbildung von Pneumokokken gegen häufig verordnete Antibiotika (Bruinsma, Kristinsson et al. 2004; Welte, Torres et al. 2010) wird intensiv nach neuen Behandlungsstrategien geforscht.

### 5.5.1 Der therapeutische Einsatz antimikrobieller Peptide

Als innovativer, allerdings sehr kostenintensiver Therapieansatz von bakteriellen Infektionen ist der Einsatz von antimikrobiellen Peptiden als „Peptidantibiotika“ anzusehen. Einige AMP werden derzeit bereits in präklinischen und klinischen Studien getestet. So befinden sich beispielsweise ein Indolicidin-Analogon (gegen katheterassoziierte Infektionen), ein Peptid der Protegrin-Gruppe (gegen peritoneale Infektionen durch *P. aeruginosa* und *S. aureus* sowie Pneumonien) als auch Plectasin aus der Gruppe der Defensine (gegen Antibiotika-resistente Erreger) in klinischer Erprobung (Guani-Guerra, Santos-Mendoza et al. 2010).

Interessant könnte zudem die endogene Induktion von AMP durch Stimulanzen sein, da diese eine kostengünstigere und sichere Methode darstellt. Nebenwirkungen durch synthetisch hergestellte Peptide könnten dadurch eventuell vermieden werden. Außerdem könnten Schwierigkeiten in der Verabreichung der AMP (z.B. die Sicherstellung ausreichend hoher Konzentrationen am Zielort) umgangen werden (Guani-Guerra, Santos-Mendoza et al. 2010). In Mäusen mit akuter Lungenerkrankung konnte nach Induktion von  $\beta$ -Defensin 2 durch Verabreichung eines adenoviralen Vektors eine im Vergleich zur Kontrollgruppe reduzierte Keimzahl von *P. aeruginosa*, geringere Alveolarschädigung, Neutrophileninfiltration und Ödem nachgewiesen werden. Das Überleben der  $\beta$ -Defensin 2-Gruppe war signifikant höher (Shu, Shi et al. 2006).

Antimikrobielle Peptide stellen somit vielversprechende Agenzien im Kampf gegen Infektionskrankheiten dar – auch gegen solche, die durch resistente Erreger hervorgerufen werden (Wu, Li et al.). Der therapeutische Einsatz von antimikrobiellen Peptiden könnte zudem dazu beitragen, die Neubildung von Antibiotika-Resistenzen zu reduzieren.

### 5.5.2 Pulmonale Pneumokokken-Infektionen und $\alpha$ -MSH

Eine Pneumokokken-Infektion des Respirationstraktes führt zur Ausschüttung zahlreicher pro- und antiinflammatorischer Zytokine.

Dabei ist der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  von entscheidender Bedeutung. Seine Hemmung fördert das Wachstum und die Ausbreitung der Pneumokokken. IL-1 scheint eine ähnliche Rolle zu spielen. Die Hemmung von TNF- $\alpha$  und IL-1 im Tierversuch machte die Versuchstiere sehr anfällig für Pneumokokken-Pneumonien und andere Arten von bakteriellen Infektionen (Rijneveld, Florquin et al. 2001). Auch das antiinflammatorische Zy-

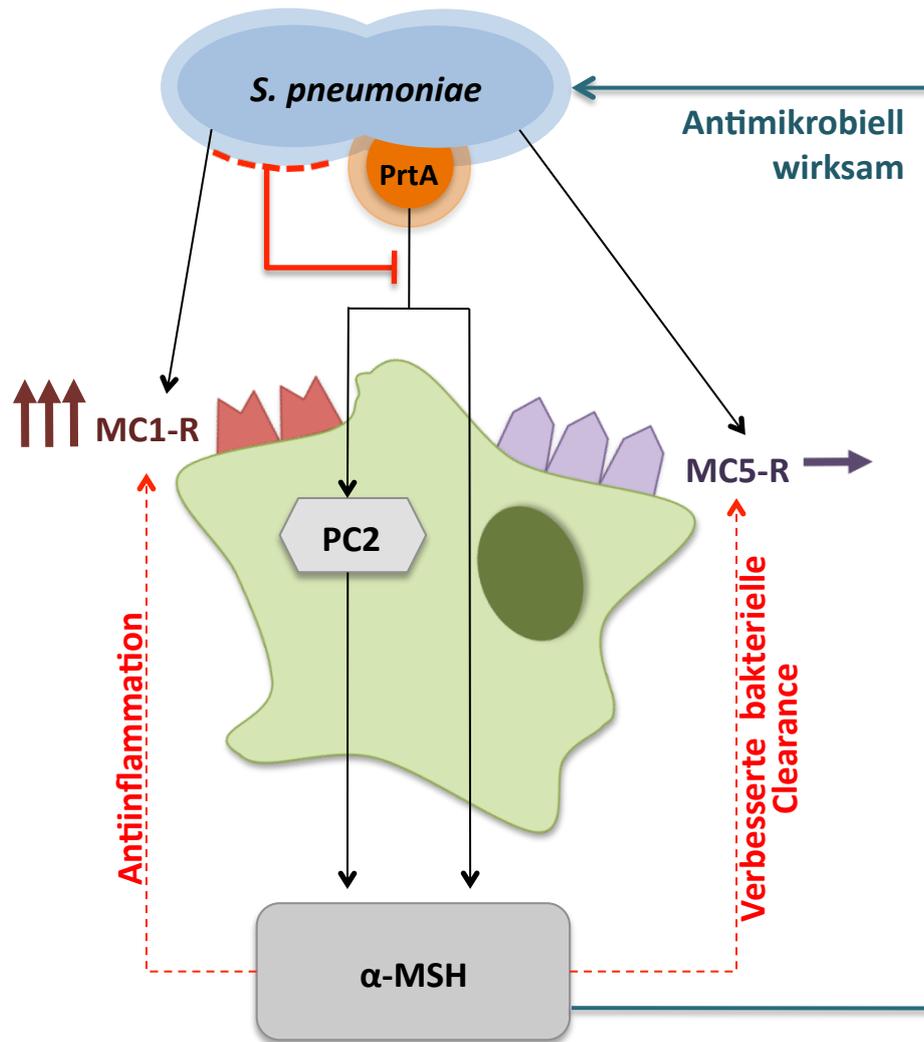
tokin IL-10 beeinträchtigte die Abwehrmechanismen gegen die Pneumokokken-Pneumonie (van der Sluijs, van Elden et al. 2004). Bei der Pneumonie durch *S. pneumoniae* kommt es in der Lunge zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Eine Hemmung der NF $\kappa$ B-Aktivierung erhöhte in Infektionsmodellen mit *S. pneumoniae* im Tierversuch die Letalität und erhöhte das Bakterienwachstum (Quinton, Jones et al. 2007).

Andererseits jedoch führt eine überschießende TNF- $\alpha$ -Produktion durch die gesteigerte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten zur starken Gewebsschädigung in der Lunge und erhöht das Risiko für einen septischen Schock mit letalem Ausgang. Auch kann TNF- $\alpha$  die Hochregulierung von Rezeptoren zur Folge haben, welche den Pneumokokken das Eindringen ins Gewebe erleichtern und nachfolgend eine Bakteriämie begünstigen (Calbo and Garau 2009). Entscheidend scheint also die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen zu sein.

Hier könnte  $\alpha$ -MSH als antiinflammatorisches Polypeptid hilfreich sein: Durch  $\alpha$ -MSH wird die Bildung verschiedener proinflammatorischer Mediatoren reduziert (Brzoska, Luger et al. 2008). Zwar könnte vermutet werden, dass hohe pulmonale  $\alpha$ -MSH-Konzentrationen das Outcome einer Pneumokokken-Pneumonie durch Hemmung der beschriebenen proinflammatorischen Zytokine verschlechtern. Jedoch könnten das starke antiinflammatorische und immunsuppressive Potential sowie die antimikrobielle Aktivität  $\alpha$ -MSHs dazu beitragen, eine möglicherweise überschießende Immunantwort des Wirts abzuschwächen und somit stärkeren Gewebsschäden durch die Pneumonie vorzubeugen. Eine sichere Aussage zur biologischen Bedeutung der  $\alpha$ -MSH-Induktion in pulmonalem Gewebe kann also derzeit nicht getroffen werden.

Es sollten daher weitere Untersuchungen, bevorzugt im Tiermodell (z.B. an ACTH-Knockout-Mäusen), erfolgen. Dadurch könnte die Bedeutung einer  $\alpha$ -MSH-Induktion für eine Pneumokokken-Pneumonie auch *in vivo* genauer beleuchtet werden.

Möglicherweise stellt die Beeinflussung der pulmonalen  $\alpha$ -MSH-Konzentration – sei es durch Induktion oder durch Hemmung – in Zukunft eine Möglichkeit zur unterstützenden Therapie bei Pneumokokken-Pneumonien dar.



**Abb. 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse**

- Eine Infektion mit *S. pneumoniae* bewirkte die Induktion von ACTH und α-MSH in Bronchialepithelzellen und Mauslungenlysaten; durch bekapselte Erreger *in vitro* jedoch nicht (vermutlich durch Maskierung relevanter Virulenzfaktoren)
- Die PC2, welche die endoproteolytische Spaltung von ACTH zu α-MSH katalysiert, wird durch *S. pneumoniae* in humanen Bronchialepithelzellen induziert. Es zeigte sich jedoch, dass die α-MSH-Induktion PC2-unabhängig war – der Erreger scheint somit in der Lage, direkten Einfluss auf das angeborene Immunsystem zu nehmen
- PrtA-defiziente Erreger bewirkten keine PC2- oder α-MSH-Induktion. Es kann somit vermutet werden, dass dieser Virulenzfaktor die α-MSH-Induktion bedingt
- Eine Pneumokokken-Infektion bewirkte eine Induktion des MC1-Rezeptors, über welchen antiinflammatorische Effekte des Tridekapeptids vermittelt werden. Der MC5-Rezeptor wird konstitutiv exprimiert; seine Funktion liegt möglicherweise in einer Beeinflussung der Drüsenregulation
- α-MSH besitzt *in vitro* antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber dem Erreger *S. pneumoniae*

## 6 Zusammenfassung

*Streptococcus pneumoniae* ist der am häufigsten isolierte Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten und der seit einigen Jahren bestehenden Schutzimpfung ist eine Pneumokokken-Pneumonie besonders bei Kindern, immunsupprimierten oder alten Patienten auch heutzutage noch eine ernst zu nehmende Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität. Auf Grund der zunehmenden Resistenzbildung gegen Penicilline und Makrolide wird intensiv nach neuen, alternativen Behandlungsstrategien geforscht. Einen innovativen Ansatz zur Behandlung der Pneumokokken-Pneumonie könnte die gezielte Steuerung des angeborenen Immunsystems darstellen: Dies könnte durch Therapie mit oder Induktion von körpereigenen antimikrobiellen Peptiden erfolgen, zu welchen das Peptidhormon  $\alpha$ -MSH gehört.

Das Tridekapeptid  $\alpha$ -MSH zählt zur Gruppe der Melanocortine. Diese entstehen durch Prozessierung von POMC und werden in vielen verschiedenen Gewebstypen gebildet. Durch proteolytische Spaltung von ACTH durch die Prohormon-Convertase PC2 entsteht  $\alpha$ -MSH. Für  $\alpha$ -MSH konnten bereits vielfach sowohl antimikrobielle Eigenschaften (gegen *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*) als auch antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden, so dass es als wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems anzusehen ist.

Das Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung von  $\alpha$ -MSH für pulmonale Infektionen durch *S. pneumoniae* zu ermitteln.

Es konnte erstmals gezeigt werden, dass  $\alpha$ -MSH gegenüber dem grampositiven Erreger *S. pneumoniae* antimikrobiell wirksam ist und dass ACTH und  $\alpha$ -MSH nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe gebildet werden. Um den molekularen Mechanismus der  $\alpha$ -MSH-Induktion genauer zu klären, wurden einige der wichtigsten Pneumokokken-Virulenzfaktoren gezielt untersucht. Interessanterweise zeigte sich, dass eine Infektion mit bekapselten Erregern nicht zur Induktion von  $\alpha$ -MSH führte; das Fehlen von Pneumolysin hingegen hatte keine Auswirkung auf die  $\alpha$ -MSH-Bildung. Weiterhin zeigte sich, dass die PC2 durch einen weiteren Pneumokokken-Virulenzfaktor, die Serinprotease A (PrtA), aktiviert wird. Es kam jedoch auch ohne eine Beteiligung der PC2 zur PrtA-induzierten  $\alpha$ -MSH-Produktion in humanen Bronchialepithelzellen. Dies gibt Hinweise darauf, dass der bisher wenig untersuchte Pneumokokken-Virulenzfaktor PrtA durch Induktion des antiinflammatorisch und antimikrobiell wirk-

samen  $\alpha$ -MSH (möglicherweise durch die direkte Spaltung von ACTH zu  $\alpha$ -MSH) eine wichtige Rolle in der Aktivierung der angeborenen Immunabwehr bei einer Pneumokokken-Pneumonie spielen könnte.

Bei der Untersuchung zweier Melanocortin-Rezeptoren (MC1-R und MC5-R) zeigte sich, dass der MC1-R nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* in pulmonalem Gewebe induziert wird. Da dieser Rezeptor vermutlich maßgeblich an der antiinflammatorischen Wirkung  $\alpha$ -MSHs beteiligt ist, kann dadurch möglicherweise eine überschießende Gewebeschädigung mit Narbenbildung in der Lunge verhindert werden.

Die physiologische Funktion des MC5-R scheint aufgrund seiner hohen Sekretion in exokrinen Drüsen schwerpunktmäßig in der Regulation dieser Drüsen zu liegen. Es zeigte sich, dass dieser Rezeptor konstitutiv in pulmonalem Gewebe exprimiert wird. Nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* ließ sich keine zusätzliche Induktion des Rezeptors nachweisen, was jedoch eine  $\alpha$ -MSH-Wirkung über den bereits vorhandenen Rezeptor nicht ausschließt:  $\alpha$ -MSH könnte möglicherweise durch Bindung an den MC5-R die Drüsenregulation in der Lunge und so die mukoziliäre Clearance beeinflussen.

Die Ergebnisse belegen, dass das antiinflammatorisch wirksame  $\alpha$ -MSH bei der Pneumonie durch *Streptococcus pneumoniae* gebildet wird und gegen den Erreger antimikrobiell wirksam ist. Jedoch ist die Bedeutung der  $\alpha$ -MSH-Bildung für die Pneumokokken-Pneumonie noch unklar. Möglicherweise verhindert die immunsuppressive Eigenschaft von  $\alpha$ -MSH eine größere Gewebeschädigung und die Bakteriämie bei einer Pneumokokken-Pneumonie durch die Hemmung einer überschießenden Bildung von proinflammatorischen Zytokinen. Jedoch kann auch ein negativer Einfluss auf den Ausgang einer Pneumokokken-Pneumonie derzeit nicht ausgeschlossen werden. Diesbezüglich sollten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, idealerweise in einem Tiermodell mit ACTH-Knockout-Mäusen.

Möglicherweise stellt die Beeinflussung der pulmonalen  $\alpha$ -MSH-Konzentration – sei es durch Induktion oder durch Hemmung – in Zukunft eine Möglichkeit zur unterstützenden Therapie bei Pneumokokken-Pneumonien dar.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adan, R. A., J. J. Hillebrand, et al. (2003). "Melanocortin system and eating disorders." Ann N Y Acad Sci **994**: 267-74.
- Adib-Conquy, M., P. Moine, et al. (2003). "Toll-like receptor-mediated tumor necrosis factor and interleukin-10 production differ during systemic inflammation." Am J Respir Crit Care Med **168**(2): 158-64.
- Airaghi, L., M. Lettino, et al. (1995). "Endogenous cytokine antagonists during myocardial ischemia and thrombolytic therapy." Am Heart J **130**(2): 204-11.
- Austrian, R. (1981). "Pneumococcus: the first one hundred years." Rev Infect Dis **3**(2): 183-9.
- Benton, K. A., M. P. Everson, et al. (1995). "A pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae* causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice." Infect Immun **63**(2): 448-55.
- Berjohn, C. M., N. O. Fishman, et al. (2008). "Treatment and outcomes for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia." Medicine (Baltimore) **87**(3): 160-6.
- Berman, Y., N. Mzhavia, et al. (2001). "Impaired prohormone convertases in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice." J Biol Chem **276**(2): 1466-73.
- Bernard, J. J. and R. L. Gallo "Cyclooxygenase-2 enhances antimicrobial peptide expression and killing of *Staphylococcus aureus*." J Immunol **185**(11): 6535-44.
- Bethe, G., R. Nau, et al. (2001). "The cell wall-associated serine protease PrtA: a highly conserved virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*." FEMS Microbiol Lett **205**(1): 99-104.
- Bhardwaj, R., E. Becher, et al. (1997). "Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes." J Immunol **158**(7): 3378-84.
- Bhardwaj, R. S., A. Schwarz, et al. (1996). "Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes." J Immunol **156**(7): 2517-21.
- Bohm, M. and T. A. Luger (2004). "[Alpha-melanocyte-stimulating hormone. Its current significance for dermatology]." Hautarzt **55**(5): 436-45.
- Bruinsma, N., K. G. Kristinsson, et al. (2004). "Trends of penicillin and erythromycin resistance among invasive *Streptococcus pneumoniae* in Europe." J Antimicrob Chemother **54**(6): 1045-50.
- Brzoska, T., T. A. Luger, et al. (2008). "{alpha}-Melanocyte-Stimulating Hormone and Related Tripeptides: Biochemistry, Antiinflammatory and Protective Effects in Vitro and in Vivo, and Future Perspectives for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases." Endocr Rev **29**(5): 581-602.
- Calbo, E. and J. Garau (2009). "Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia." Int J Antimicrob Agents.
- Catania, A., L. Airaghi, et al. (2000). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states." Trends Endocrinol Metab **11**(8): 304-8.
- Catania, A., L. Airaghi, et al. (1998). "The neuropeptide alpha-MSH in HIV infection and other disorders in humans." Ann N Y Acad Sci **840**: 848-56.

- Catania, A., M. Cutuli, et al. (2000). "Plasma concentrations and anti-L-cytokine effects of alpha-melanocyte stimulating hormone in septic patients." Crit Care Med **28**(5): 1403-7.
- Catania, A., S. Gatti, et al. (2004). "Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation." Pharmacol Rev **56**(1): 1-29.
- Catania, A., V. Gerloni, et al. (1994). "The anticytokine neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone in synovial fluid of patients with rheumatic diseases: comparisons with other anticytokine molecules." Neuroimmunomodulation **1**(5): 321-8.
- Catania, A., N. Rajora, et al. (1996). "The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro." Peptides **17**(4): 675-9.
- Catania, A., A. F. Suffredini, et al. (1995). "Endotoxin causes release of alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human subjects." Neuroimmunomodulation **2**(5): 258-62.
- Chen, W., M. A. Kelly, et al. (1997). "Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides." Cell **91**(6): 789-98.
- Colombo, G., R. Buffa, et al. (2002). "Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone in celiac intestinal mucosa." Neuroimmunomodulation **10**(4): 208-16.
- Colombo, G., S. Gatti, et al. (2007). "Production and effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone during acute lung injury." Shock **27**(3): 326-33.
- Cone, R. D. (2006). "Studies on the physiological functions of the melanocortin system." Endocr Rev **27**(7): 736-49.
- Cutuli, M., S. Cristiani, et al. (2000). "Antimicrobial effects of alpha-MSH peptides." J Leukoc Biol **67**(2): 233-9.
- Deng, J., X. Hu, et al. (2004). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits lung injury after renal ischemia/reperfusion." Am J Respir Crit Care Med **169**(6): 749-56.
- Devine, D. A. (2003). "Antimicrobial peptides in defence of the oral and respiratory tracts." Mol Immunol **40**(7): 431-43.
- Diab, A., J. Zhu, et al. (1997). "Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae induce different intracerebral mRNA cytokine patterns during the course of experimental bacterial meningitis." Clin Exp Immunol **109**(2): 233-41.
- Donnarumma, G., I. Paoletti, et al. (2004). "Alpha-MSH reduces the internalization of Staphylococcus aureus and down-regulates HSP 70, integrins and cytokine expression in human keratinocyte cell lines." Exp Dermatol **13**(12): 748-54.
- Getting, S. J. (2002). "Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 447-9.
- Getting, S. J. (2006). "Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics." Pharmacol Ther **111**(1): 1-15.
- Grieco, P., C. Rossi, et al. (2005). "Design and synthesis of melanocortin peptides with candidacidal and anti-TNF-alpha properties." J Med Chem **48**(5): 1384-8.

- Guani-Guerra, E., T. Santos-Mendoza, et al. (2010). "Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease." Clin Immunol **135**(1): 1-11.
- Hahn, F., Kaufmann, Ullmann (2001). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer-Verlag.
- Hammerschmidt, S. (2006). "Adherence molecules of pathogenic pneumococci." Curr Opin Microbiol **9**(1): 12-20.
- Hammerschmidt, S., S. Wolff, et al. (2005). "Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells." Infect Immun **73**(8): 4653-67.
- Harder, J., R. Glaser, et al. (2007). "Human antimicrobial proteins effectors of innate immunity." J Endotoxin Res **13**(6): 317-38.
- Herold, C. J. and J. G. Sailer (2004). "Community-acquired and nosocomial pneumonia." Eur Radiol **14 Suppl 3**: E2-20.
- Herold, G. (2005). Innere Medizin. Köln.
- Hertz, C. J., Q. Wu, et al. (2003). "Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2." J Immunol **171**(12): 6820-6.
- Hirst, R. A., A. Kadioglu, et al. (2004). "The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis." Clin Exp Immunol **138**(2): 195-201.
- Ichiyama, T., K. Okada, et al. (2000). "NF-kappaB activation is inhibited in human pulmonary epithelial cells transfected with alpha-melanocyte-stimulating hormone vector." Peptides **21**(10): 1473-7.
- Kadioglu, A., J. N. Weiser, et al. (2008). "The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease." Nat Rev Microbiol **6**(4): 288-301.
- Kameyama, K., S. Tanaka, et al. (1989). "Interferons modulate the expression of hormone receptors on the surface of murine melanoma cells." J Clin Invest **83**(1): 213-21.
- Krishnan, J., K. Selvarajoo, et al. (2007). "Toll-like receptor signal transduction." Exp Mol Med **39**(4): 421-38.
- Kumagai, Y., O. Takeuchi, et al. (2008). "Pathogen recognition by innate receptors." J Infect Chemother **14**(2): 86-92.
- Lode, H. M. (2007). "Managing community-acquired pneumonia: a European perspective." Respir Med **101**(9): 1864-73.
- Maaser, C., K. Kannengiesser, et al. (2006). "Role of the melanocortin system in inflammation." Ann N Y Acad Sci **1072**: 123-34.
- Madhuri, T. Shireen, et al. (2009). "In vitro antimicrobial activity of alpha-melanocyte stimulating hormone against major human pathogen Staphylococcus aureus." Peptides **30**(9): 1627-35.
- Magee, A. D. and J. Yother (2001). "Requirement for capsule in colonization by Streptococcus pneumoniae." Infect Immun **69**(6): 3755-61.

- Martin, M., J. H. Turco, et al. (2003). "An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*." N Engl J Med **348**(12): 1112-21.
- Martner, A., S. Skovbjerg, et al. (2009). "Streptococcus pneumoniae autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines." Infect Immun **77**(9): 3826-37.
- Melin, M., H. Jarva, et al. (2009). "Streptococcus pneumoniae capsular serotype 19F is more resistant to C3 deposition and less sensitive to opsonophagocytosis than serotype 6B." Infect Immun **77**(2): 676-84.
- Metlay, J. P., N. O. Fishman, et al. (2006). "Macrolide resistance in adults with bacteremic pneumococcal pneumonia." Emerg Infect Dis **12**(8): 1223-30.
- Mitchell, T. J. (2000). "Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*." Res Microbiol **151**(6): 413-9.
- Mogensen, T. H., S. R. Paludan, et al. (2006). "Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns." J Leukoc Biol **80**(2): 267-77.
- N'Guessan, P. D., S. Hippenstiel, et al. (2006). "Streptococcus pneumoniae induced p38 MAPK- and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1131-8.
- Paterson, G. K. and T. J. Mitchell (2006). "Innate immunity and the pneumococcus." Microbiology **152**(Pt 2): 285-93.
- Paton, A. W., T. Beddoe, et al. (2006). "AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP." Nature **443**(7111): 548-52.
- Pilishvili, T., C. Lexau, et al. (2010). "Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine." J Infect Dis **201**(1): 32-41.
- Pletz, M. W., U. Maus, et al. (2008). "[Pneumococcal vaccination: conjugated vaccine induces herd immunity and reduces antibiotic resistance]." Dtsch Med Wochenschr **133**(8): 358-62.
- Pletz, M. W., U. Maus, et al. (2008). "Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species." Int J Antimicrob Agents **32**(3): 199-206.
- Pritchard, L. E. and A. White (2007). "Neuropeptide processing and its impact on melanocortin pathways." Endocrinology **148**(9): 4201-7.
- Quinton, L. J., M. R. Jones, et al. (2007). "Functions and regulation of NF-kappaB RelA during pneumococcal pneumonia." J Immunol **178**(3): 1896-903.
- Raap, U., T. Brzoska, et al. (2003). "Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation." J Immunol **171**(1): 353-9.
- Rago, J. V., G. M. Vath, et al. (2000). "Staphylococcal exfoliative toxins cleave alpha- and beta-melanocyte-stimulating hormones." Infect Immun **68**(4): 2366-8.
- Rauch, I., S. Holzmeister, et al. (2009). "Anti-Candida activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) peptides." J Leukoc Biol **85**(3): 371-2; author reply 373.

- Reinert, R. R. (2002). "Positionspapier "Impfung gegen Pneumokokken-Erkrankungen"."
- Reinert, R. R. (2006). "[Medical indications and effectiveness of the pneumococcal conjugate vaccine]." Laryngorhinootologie **85**(4): 291-8; quiz 299-300.
- Rijneveld, A. W., S. Florquin, et al. (2001). "TNF-alpha compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia." J Immunol **167**(9): 5240-6.
- Robson, R. L., S. Essengue, et al. (2007). "Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* induced by frozen storage in glycerol." Diagn Microbiol Infect Dis **58**(2): 185-90.
- Rockwell, N. C., D. J. Krysan, et al. (2002). "Precursor processing by kex2/furin proteases." Chem Rev **102**(12): 4525-48.
- Rogan, M. P., P. Geraghty, et al. (2006). "Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence." Respir Res **7**: 29.
- Rossi, L. M., P. Rangasamy, et al. (2008). "Research advances in the development of peptide antibiotics." J Pharm Sci **97**(3): 1060-70.
- Roth, J. (2006). "Endogenous antipyretics." Clin Chim Acta **371**(1-2): 13-24.
- Rouzaud, F., J. P. Annereau, et al. (2003). "Regulation of melanocortin 1 receptor expression at the mRNA and protein levels by its natural agonist and antagonist." FASEB J **17**(14): 2154-6.
- Sanders, M. E., E. W. Norcross, et al. "The *Streptococcus pneumoniae* capsule is required for full virulence in pneumococcal endophthalmitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(2): 865-72.
- Savos, A. V., J. M. Gee, et al. (2010). "alpha-MSH: A potential neuroprotective and immunomodulatory agent for the treatment of stroke." J Cereb Blood Flow Metab.
- Schiller, M., T. Brzoska, et al. (2004). "Solar-simulated ultraviolet radiation-induced upregulation of the melanocortin-1 receptor, proopiomelanocortin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone in human epidermis in vivo." J Invest Dermatol **122**(2): 468-76.
- Schulte-Herbruggen, O., D. Quarcoo, et al. (2008). "Alpha-MSH promotes spontaneous post-ischemic pneumonia in mice via melanocortin-receptor-1." Exp Neurol **210**(2): 731-9.
- Scott, M. C., I. Suzuki, et al. (2002). "Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation." Pigment Cell Res **15**(6): 433-9.
- Sei, C., T. Toneff, et al. (2002). "Regulation of cellular alpha-MSH and beta-endorphin during stimulated secretion from intermediate pituitary cells: involvement of aspartyl and cysteine proteases in the control of cellular levels of alpha-MSH and beta-endorphin." Peptides **23**(8): 1409-18.
- Seidah, N. G., M. Chretien, et al. (1994). "The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions." Biochimie **76**(3-4): 197-209.

- Shu, Q., Z. Shi, et al. (2006). "Protection against *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis-induced lung injury by overexpression of beta-defensin-2 in rats." Shock **26**(4): 365-71.
- Siezen, R. J. (1999). "Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **76**(1-4): 139-55.
- Slominski, A., J. Wortsman, et al. (2000). "Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress." Physiol Rev **80**(3): 979-1020.
- Suttorp, N. M., M.; Kiehl, W.; Stück, B. (2004). Infektionskrankheiten: verstehen, erkennen, behandeln. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Tatro, J. B. (2000). "Endogenous antipyretics." Clin Infect Dis **31 Suppl 5**: S190-201.
- Taylor, A. and K. Namba (2001). "In vitro induction of CD25+ CD4+ regulatory T cells by the neuropeptide alpha-melanocyte stimulating hormone (alpha-MSH)." Immunol Cell Biol **79**(4): 358-67.
- Tsai, K. S. and M. H. Grayson (2008). "Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis." Curr Opin Pulm Med **14**(3): 260-5.
- van der Sluijs, K. F., L. J. van Elden, et al. (2004). "IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection." J Immunol **172**(12): 7603-9.
- Welte, T. and T. Kohnlein (2009). "Global and local epidemiology of community-acquired pneumonia: the experience of the CAPNETZ Network." Semin Respir Crit Care Med **30**(2): 127-35.
- Welte, T., R. Marre, et al. (2006). "[What is new in the treatment of community-acquired pneumonia?]." Med Klin (Munich) **101**(4): 313-20.
- Welte, T., A. Torres, et al. (2010). "Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia among adults in Europe." Thorax.
- Wu, G., X. Li, et al. "The activity of antimicrobial peptide S-thanatin is independent on multidrug-resistant spectrum of bacteria." Peptides.
- Yoon, S. W., C. H. Lee, et al. (2008). "Lactobacillus casei secreting alpha-MSH induces the therapeutic effect on DSS-induced acute colitis in Balb/c Mice." J Microbiol Biotechnol **18**(12): 1975-83.
- Zilberberg, M. D. and A. F. Shorr (2009). "Epidemiology of healthcare-associated pneumonia (HCAP)." Semin Respir Crit Care Med **30**(1): 10-5.

## 8 Anhang

### Danksagung

Hiermit möchte ich meinen ausdrücklichen Dank all denen aussprechen, die dieses Projekt unterstützt und gefördert haben.

Herrn Professor Dr. med. Norbert Suttrop möchte ich dafür danken, dass ich als Doktorandin dieses interessante und aktuelle Thema in seinem Labor in der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Charité, Berlin bearbeiten durfte.

Mein Dank gilt besonders Dr. med. Philippe N'Guessan für die Bereitstellung des Themas und die intensive und geduldige Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald, danke ich für die Zurverfügungstellung der Pneumokokken-Stämme, Herrn Dr. med. Holger Müller, Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie der Charité, Berlin danke ich für die Mauslungenproben.

Danken möchte ich auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Jaqueline Hellwig, Frauke Schreiber, Annika Kühn und Doris Stoll für ihre technische Unterstützung.

Bei allen Mitarbeitern des Labors möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre und die nette Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Christa und Jürgen Lang für ihre umfassende Förderung und kritische Begleitung.

## Erklärung

„Ich, Friederike Lang, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung des  $\alpha$ -Melanozyten-stimulierenden Hormons für pulmonale Infektionen 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.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

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



## Publikationsliste

### Publikationen

---

1. Scharf S, Vardarova K, **Lang F**, Schmeck B, Opitz B, Flieger A, Heuner K, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. Legionella pneumophila induces human beta defensin-3 in pulmonary cells. *Respir Res.* 2010 Jul 8;11:93.
2. Vardarova K, Scharf S, **Lang F**, Schmeck B, Opitz B, Eitel J, Hocke AC, Slevogt H, Flieger A, Hippenstiel S, Suttorp N, N'Guessan PD. PKC(alpha) and PKC(epsilon) differentially regulate Legionella pneumophila-induced GM-CSF. *Eur Respir J.* 2009 Nov;34(5):1171-9.

### Vorträge

---

1. Vortrag: „Die Bedeutung von  $\alpha$ -MSH für die Infektion von humane Bronchialepithelzellen mit *Streptococcus pneumoniae*, 49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Lübeck 2008
2. Vortrag: „*Streptococcus pneumoniae* induced  $\alpha$ -MSH in infected human bronchial epithelial cells“, 19th European Students' Conference, Berlin 2008