

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. U. Hadding

**Einfluß von *Streptococcus pneumoniae* auf den oxidative burst
und den Zelltod von Neutrophilen Granulozyten**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Levente Bejo

2000

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Prof. Dr. Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. Heinz

Korreferent: Prof. Dr. Idel

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/med/2001/bejo.html>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Biol. H.-P. Heinz danke ich für die Überlassung des Themas, die Anregungen und die hervorragende Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. U. Hadding, Leiter des Instituts für medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine hilfreichen Vorschläge zum Konzept dieser Arbeit.

Herrn Dr. med. G. Zysk danke ich für die engagierte Unterstützung, die wertvollen Vorschläge und Diskussionsbereitschaft, sowie das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. R. Nau, Neurologische Universitätsklinik Göttingen, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Apoptosedarstellung mittels *in situ tailing*.

Frau Prof. Dr. med. Idel danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bernd Nietzgen, Wilfried Schwippert, Gabriele Zysk und Adriana Soto danke ich für die technische Unterstützung und ihre beständige Hilfsbereitschaft.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Infektionen durch <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2	Die Entzündungsreaktion	3
1.3	Zelluläre Komponenten des Immunsystems: Leukozyten.....	3
1.3.1	Neutrophile Granulozyten	3
1.3.2	Eosinophile Granulozyten	5
1.3.3	Basophile Granulozyten und Mastzellen.....	6
1.3.4	Monozyten.....	6
1.3.5	Makrophagen.....	7
1.3.6	T-Lymphozyten	8
1.3.7	B-Lymphozyten.....	8
1.4	Humorale Komponenten des Immunsystems.....	9
1.4.1	Das Komplementsystem.....	9
1.4.2	Akute-Phase-Proteine.....	9
1.4.3	Antikörper	10
1.4.4	Zytokine.....	10
1.5	Bakterien und ihre Toxine als Auslöser der Entzündung.....	13
1.5.1	Aufbau der Bakterienzellwand.....	13
1.5.2	Grampositive Bakterien.....	14
1.5.3	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Pneumokokken)	14
1.5.4	Gramnegative Bakterien.....	15
1.5.5	<i>Escherichia coli</i>	15
1.6	Apoptose.....	16
1.7	Adhäsionsmoleküle	18
1.8	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialliste.....	20
2.1.1	Aufreinigung Neutrophiler Granulozyten aus <i>buffycoats</i>	20
2.1.2	Messung des <i>oxidative burst</i>	20
2.1.3	ELISA zum Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten	21

2.1.4	Durchflußzytometrie.....	21
2.1.5	Kultivierung Neutrophiler Granulozyten	21
2.1.6	Aufreinigung der Pneumokokkenzellwände	22
2.1.7	Verwendete Bakterien und deren Kultivierung.....	22
2.1.8	Monoklonale Antikörper	22
2.1.9	Stimulanzen.....	23
2.2	Methodenbeschreibungen.....	24
2.2.1	Isolierung der Neutrophilen Granulozyten	24
2.2.2	Bakterienkulturen	25
2.2.3	Inaktivierung der Pneumokokken.....	25
2.2.4	Aufreinigung der Zellwände.....	26
2.2.5	Opsonisierung.....	27
2.2.6	Komplementinaktivierung.....	27
2.3	Chemilumineszenz	27
2.3.1	Messprinzip	28
2.3.2	Proben für die Chemilumineszenzmessung	28
2.4	Kultivierung der Neutrophilen Granulozyten.....	28
2.5	ELISA zum Nachweis Histon-assoziiertes DNA-Fragmente.....	29
2.5.1	Prinzip des ELISA.....	29
2.5.2	Die Probenvorbereitung für den ELISA.....	29
2.6	Durchflußzytometrie.....	30
2.7	Färbung der Ausstriche (TUNEL-Methode)	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	<i>Oxidative burst</i> der Neutrophilen Granulozyten	32
3.1.1	Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken	34
3.1.2	Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken	35
3.1.3	Stimulation mit aufgereinigten Zellwänden	36
3.1.4	Einfluß der Opsonisierung auf den <i>oxidative burst</i>	37
3.1.5	Einfluß der Komplementinaktivierung auf die Opsonisierung	38
3.1.6	Zugabe von Anti-CD14 Antikörper.....	39
3.1.7	Zugabe von Anti-CD13, -CD14, -CD63, -BSA Antikörper.....	40
3.2	Bestimmung Histon-assoziiertes DNA-Fragmente der Neutrophilen Granulozyten....	41
3.2.1	Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken	42

3.2.2	Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken	43
3.2.3	Stimulation mit PCW bzw. LPS.....	44
3.3	Differenzierung des Zelltodes	45
3.4	Färbung der Ausstriche.....	48
4	Diskussion	49
4.1	Freisetzung oxidativer Radikale durch Neutrophile Granulozyten	49
4.2	Die Rolle des CD14-Rezeptors	51
4.3	Beeinflussung der Apoptose Neutrophiler Granulozyten.....	54
4.4	Zusammenhang zwischen Radikalproduktion und Apoptose	57
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
(m)Ak:	(monoklonaler) Antikörper
<i>bcl-2</i> :	<i>bcl-2</i> Gen
Bcl-2:	Bcl-2 Protein
CD:	<i>cluster of differentiation</i>
CFU:	<i>colony forming unit</i>
cpm:	<i>counts per minute</i>
DMEM:	Dulbecco`s modifiziertes Eagle Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
ELISA:	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab:	antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
Fc:	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers
FCS:	<i>fetal calf serum</i>
GSH:	Glutathion
HPETE:	Hydroxyperoxyeicosatetraenolsäure
IL:	Interleukin
IFN:	Interferon
LPS:	Lipopolysaccharid
LBP:	LPS-bindendes Protein
MHC:	<i>major histocompatibility complex</i>
MPS:	mononukleäres Phagozytensystem
NAC:	N-Acetylcystein
NAD(H):	Nikotinamidadenindinukleotid
NK:	natürliche Killerzellen
PAF:	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PCW:	<i>purified cell walls</i>
PG:	Peptidoglykan
PMA:	Phorbol-Myristat-Acetat

ROS: reaktive Oxygenspezies
TCR: *T-cell receptor*
TdT: *terminal deoxynucleotidyl transferase*
TGF: *transforming growth factor*
TNF: Tumornekrosefaktor
TUNEL: *TdT mediated dUTP-X nick end labeling*

nicht eingedeutschte englische Ausdrücke sind kursiv gesetzt

1 Einleitung

1.1 Infektionen durch *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, kurz Pneumokokken genannt, sind weltweit die häufigsten Erreger bakterieller Meningitiden bei Erwachsenen und verursachen bis zu 80% der außerhalb des Krankenhauses erworbenen Pneumonien. Bei Kindern sind sie die häufigsten Erreger von Mittelohrentzündungen. Weitere häufig durch Pneumokokken verursachte Erkrankungen sind Sepsis, Sinusitis und das OPSI-Syndrom (Overwhelming Post Splenectomy Infections). Besonders gefährlich sind Pneumokokkeninfektionen für immunsupprimierte Patienten; bei HIV-Infizierten gehören sie zu den bedeutendsten bakteriellen Erregern.

Nach Übertragung der Bakterien durch eine Tröpfcheninfektion von gesunden Trägern oder Erkrankten kommt es zu einer Ansiedlung der Pneumokokken im Nasen-Rachen-Raum⁸⁹. Bei den meisten Menschen bilden sich innerhalb kurzer Zeit protektive Schleimhautantikörper vom Typ IgA gegen die Erreger aus, die eine hämatogene Aussaat verhindern⁷⁴. Ist jedoch die Abwehrlage der infizierten Person nicht stark genug, um die Virulenz der Bakterien zu überwinden, kann es zu einer systemischen Invasion der Pneumokokken kommen. Als Folge der Bakteriämie ist ein Übertritt der Keime aus der Blutbahn in den Subarachnoidalraum, also die Überwindung der Blut-Liquor-Schranke, und die Absiedlung von Keimen an den Hirnhäuten möglich. Auch durch eine Fortleitung einer Infektion im Kopfbereich, z.B. Otitis oder Sinusitis oder direkt durch eine Schädel-Hirn-Verletzung können Bakterien an die Hirnhäute gelangen. Die Bekämpfung der in den Subarachnoidalraum eingedrungenen Bakterien ist durch den Zustand der lokalen Immunschwäche⁸⁰ erschwert. Dieser ist bedingt durch die niedrige Komplement- und Immunglobulinkonzentration und die geringe Leukozytenzahl im Vergleich zum Blut⁹⁵.

Klinisch manifestiert sich eine Meningitis durch Fieber, Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit (Meningismus), Bewußtseinseintrübung, Übelkeit und Erbrechen. Die Blutbildveränderungen bestehen wie bei den meisten bakteriellen Infekten aus einer Leukozytose mit Erhöhung der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten im Vordergrund. Durch die Störung der Blut-Hirn-Schranke können auch zunehmend Leukozyten und Eiweiße in den Liquorraum gelangen, so daß bei einer Lumbalpunktion neben dem Nachweis von Bakterien eine erhöhte Zellzahl und

einen erhöhten Liquorproteingehalt gefunden wird. Der Liquor/Serum-Quotient für Albumin ist erhöht, der Liquorglukosespiegel dahingegen vermindert.

Pneumokokkenmeningitiden verlaufen trotz adäquater antibiotischer Therapie in bis zu 30% der Fälle letal, dauerhafte neurologische Folgeschäden werden bei etwa 15-30% der Überlebenden beobachtet^{59, 74, 89}.

Die Pneumokokkenpneumonien verlaufen überwiegend als Lobärpneumonien, es kommen jedoch auch Bronchopneumonien vor. Die Bakterien vermehren sich vornehmlich in den Alveolen. Patienten mit gestörtem mukoziliaren Transport (z.B. bei chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen) oder vorbestehendem Lungenödem (z.B. bei Herzinsuffizienz) sind besonders gefährdet. Die Pneumokokken rufen im Bereich der Alveolenwand eine seröse Exsudation hervor und schädigen die Alveolarepithelien, wodurch die Surfactantproduktion beeinträchtigt wird. Die Auskleidung der Alveolen sowie der Verschluß der Alvelarporen sind unzureichend, so daß sich das Exsudat rasch transalveolär auf einen oder mehrere Lungenlappen ausbreiten kann. Ohne adäquate Therapie verläuft die Entzündungsreaktion in folgenden Stadien: Anschoppungsphase (seröse Entzündung), rote Hepatisation (häorrhagische Entzündung), graue Hepatisation (fibrinöse Entzündung), gelbe Hepatisation (eitrige Entzündung) und das Stadium der Lyse. Klinisch beginnt die Pneumokokkenpneumonie plötzlich mit hohem Fieber und Schüttelfrost. Das entzündliche Ödem bewirkt eine perkutorische Dämpfung sowie ein auskultatorisches Knisterrasseln. Das Sputum ist rostbraun und enthält Erreger⁷³.

In Deutschland gilt Penicillin G noch immer als Mittel der Wahl zur Therapie von Pneumokokkeninfekten, obwohl seit Ende der 60er Jahre zunehmend penicillinresistente und zum Teil auch multiresistente Stämme auftreten. Allerdings beträgt die Resistenzrate in Deutschland bislang noch zwischen 1% und 7%.^{70, 71} Weitere Mittel der Wahl sind Ampicillin und Cephalosporine der dritten Generation, bei Vorliegen einer Pneumokokkenmeningitis werden diese β -Laktamantibiotika in Kombination mit Aminoglykosiden zur Erreichung synergistischer Effekte eingesetzt. In anderen europäischen Ländern (z.B. Spanien²⁰ und Ungarn⁵²) sind Resistenzraten von bis zu 50% beschrieben, was erhebliche therapeutische Probleme bereitet und wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß Penicilline dort frei käuflich zu erwerben waren.

1.2 Die Entzündungsreaktion

Um ein Eindringen von Krankheitserregern zu verhindern, verfügt der menschliche Körper über zahlreiche unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen. Dazu gehören Haut und Schleimhäute, die nicht nur eine mechanische Barriere bilden, sondern auch IgA und Leukozyten enthalten, die bakterielle Normalflora, Schleim und Magensäure, die die Erregervermehrung behindern, sowie Lysozym, ein Enzym, das das Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand aufspalten kann und somit unspezifisch Erreger inaktiviert. Gelingt es Bakterien, Pilzen oder Viren dennoch, z.B. bei geschwächter Abwehrlage des Körpers oder durch starke Virulenz des Erregers, diese Faktoren zu überwinden, in den Körper einzudringen und sich dort zu vermehren, kommt es zur Freisetzung von Stoffwechselprodukten des Erregers und zu lokaler Gewebszerstörung.

Das Immunsystem reagiert darauf zunächst mit einer unspezifischen akuten Entzündung, welche durch Freisetzung körpereigener Mediatoren aus Zellen des Abwehrsystems ausgelöst wird.

Durch diese kommt es zu Vasodilatation und damit zu erhöhter Blutzufuhr in das betreffende Gebiet. Die gesteigerte Kapillarpermeabilität durch Retraktion der Endothelzellen führt zur Exsudation von Plasmabestandteilen. Chemotaktisch angelockte Leukozyten, vor allem Neutrophile Granulozyten, treten nach Adhäsion an die Endothelzellen aus den Kapillaren in das umliegende Gewebe über. Diese erste Phase einer akuten Entzündungsreaktion, in der die Erhöhung der Zahl der Neutrophilen Granulozyten im Vordergrund steht, wird auch als „Kampfphase“ bezeichnet. In der darauf folgenden „Überwindungsphase“ ist die Monozytenzahl stark erhöht, schließlich folgt die „Heilungsphase“, in der vor allem die Zahl der Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten stark zunimmt. Deshalb wird diese Phase auch als „Morgenröte der Heilung“ bezeichnet.

1.3 Zelluläre Komponenten des Immunsystems: Leukozyten

1.3.1 Neutrophile Granulozyten

Die Population der im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten besteht zu 60-70% aus Granulozyten, davon wiederum sind etwa 95% Neutrophile Granulozyten. Aufgrund ihres

gelappten Zellkerns werden Granulozyten auch als Polymorphkernige bezeichnet. Sie werden im Knochenmark mit einer Rate von 80 Millionen pro Minute produziert und sind mit einer Lebensspanne von 2-3 Tagen recht kurzlebig.

Die Neutrophilen Granulozyten spielen eine zentrale Rolle bei akuten Entzündungsprozessen. An den Ort der Entzündung gelangen sie durch chemotaktische Reize, die aus einem Entzündungsgebiet freigesetzt werden. Potente chemotaktische Faktoren für Neutrophile Granulozyten sind aktivierte Komplementkomponenten (C3a, C4a, C5a), Leukotriene, der Plättchenaktivierende Faktor (PAF), das bakterielle Tripeptid FMLP sowie einige Zytokine, z.B. IL-8. Die endogenen Pyrogene IL-1 und TNF- α mobilisieren Neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark.

Auf diese Weise in das Entzündungsgebiet gelockt, haften sich die Neutrophilen Granulozyten mit ihren Adhäsionsmolekülen (CD11, CD18, LAM-1) an die Endothelzellen (ICAM-1, ELAM)^{41, 49} an, um sie dann zu durchwandern (Diapedese). Nach Einwanderung in das betroffene Gewebe werden sie funktionell aktiviert, um die eingedrungenen Erreger abzuwehren. Dies geschieht durch spezifische und unspezifische Aufnahme der Bakterien durch die auch als Mikrophagen bezeichneten Neutrophilen Granulozyten und durch Freisetzung toxischer Metabolite durch Degranulation⁷⁵.

Voraussetzung für die Phagozytose ist die Adhärenz des Erregers an die Oberfläche des Phagozyten, die durch vorherige Opsonisierung, d.h. Anlagerung von Antikörpern oder Komplementfaktoren, begünstigt wird. Zu diesem Zweck tragen Neutrophile C3-Rezeptoren an ihrer Oberfläche⁷⁵. Derjenige Teil der Plasmamembran, an den diese Anlagerung stattgefunden hat, wird nach innen eingestülpt und von Pseudopodien umflossen, so daß der Erreger intrazellulär von einer Membran umgeben bleibt (Phagosom). Die enzymhaltigen Lysosomen der Phagozyten verschmelzen mit diesen Phagosomen zu Phagolysosomen, so daß die Enzyme mit den Erregern in unmittelbarem Kontakt kommen. Nach initialem pH-Anstieg in den Lysosomen kommt es zum pH-Abfall, so daß viele verschiedene Enzyme bei ihrem pH-Optimum aktiv werden können. Zum Teil wird der Inhalt der Granula auch exozytotisch in die Umgebung der Zelle freigesetzt (Prozeß der Degranulation).

Neben diesen sauerstoffunabhängigen Mechanismen kommen nach der Phagozytose auch sauerstoffabhängige Mechanismen zum Zuge, die durch Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase eingeleitet werden, die Sauerstoff zu Superoxidanionen umsetzt. Diese Superoxidanionen dienen als Ausgangssubstanz für weitere reaktive Sauerstoffmetabolite, so können mit Hilfe der Superoxiddismutase Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale und

Singulett-Sauerstoff entstehen, die alle eine mikrobizide Wirkung entfalten. Die überschießende Produktion dieser reaktiven Sauerstoffmetabolite (ROS) wird auch als *oxidative burst* bezeichnet. Zusätzlich kommt es unter Beteiligung des Enzyms Myeloperoxidase und Wasserstoffperoxid zur Halogenierung mikrobieller Proteine mit meist letaler Folge. Reaktive Stickstoffmetabolite sind ebenfalls an der intrazellulären Keimabtötung beteiligt^{25, 75}.

So werden sowohl phagozytierte intrazelluläre als auch extrazelluläre Erreger angegriffen, jedoch kommt es dabei auch zur weiteren Gewebsschädigung^{22, 87, 106}.

Durch die Freisetzung proinflammatorischer Substanzen (PAF, Arachidonsäurederivate) tragen die Neutrophilen Granulozyten zur Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei. Nach Phagozytose und Abtötung der Erreger gehen die Granulozyten rasch zugrunde. Die dabei freiwerdenden eigenen Zerfallsprodukte und Bestandteile unvollständig inaktivierter Mikroorganismen unterhalten ebenfalls das Entzündungsgeschehen. Die Beseitigung abgestorbener Granulozyten erfolgt durch nachströmende Makrophagen.

Zur Terminierung der Entzündungsreaktion führt die Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, bei den Neutrophilen Granulozyten³². Die Einleitung und der Verlauf der Apoptose wird durch die am Entzündungsort vorliegende Zytokinverteilung beeinflusst^{31, 32}. Im Verlauf der Apoptose bleiben die Zellmembranen intakt, zelluläre Zerfallsprodukte werden nicht in das Gewebe freigesetzt (s. Kap. 1.6). Die apoptotischen Körperchen werden von Makrophagen erkannt und phagozytiert, ohne daß sie inflammatorisch wirksam werden^{13, 31, 32, 60, 81}.

1.3.2 Eosinophile Granulozyten

Bei gesunden Nichtallergikern stellen die Eosinophilen 2-5% der Leukozyten im Blut. Ihre Zahl ist vermehrt bei allergischen Reaktionen und parasitären Infektionen. Eosinophile sind ebenfalls zur Phagozytose befähigt, jedoch ist diese Aktivität geringer ausgeprägt als bei Neutrophilen und Monozyten. Ihre primäre Effektorfunktion scheint vielmehr gegen extrazelluläre Ziele wie Helminthen und andere Parasiten gerichtet zu sein, die nicht phagozytiert werden können. Die durch Degranulation freiwerdenden lysosmalen Enzyme und

Peroxidasen haben neben der toxischen Wirkung auf die Parasiten zum Teil entzündungsfördernde Wirkung²⁵.

1.3.3 Basophile Granulozyten und Mastzellen

Basophile Granulozyten stellen weniger als 0,2% der Leukozyten im zirkulierenden Blut dar. Wie die gewebständigen Mastzellen tragen sie hochaffine IgE-Rezeptoren an ihren Oberflächen. Sie enthalten reichlich zytoplasmatische Granula mit biologisch hochaktiven Mediatoren. Beide Zelltypen entstammen einer gemeinsamen myelopoetischen Vorläuferzelle. Die Bindung von IgE-Antikörpern an den IgE-Rezeptor führt zu einer raschen Mediatorfreisetzung, indem die Granula mit der Zelloberfläche fusionieren und somit zu einer allergischen Sofortreaktion. Zu den freigesetzten präformierten Mediatoren zählen Histamin, Serotonin, Heparin und chemotaktischer Faktor für Eosinophile. Zusätzlich werden Mediatoren frei, die erst nach Stimulation de novo synthetisiert werden. Hierzu gehören vor allem Produkte aus der Arachidonsäurekaskade wie Prostaglandine, Leukotriene und der thrombozytenaktivierende Faktor PAF^{25, 75}.

1.3.4 Monozyten

Monozyten stellen den im Blut zirkulierenden Anteil des Mononukleären Phagozytierenden Systems (MPS) dar. Sie verbleiben für etwa 20-30h im Blut bevor sie in das Gewebe auswandern. Ihre Reaktionsfähigkeit auf chemotaktische Reize ist geringer ausgeprägt als die der Neutrophilen Granulozyten. Möglicherweise erklärt sich hieraus ihr verzögertes Einwandern in einen Entzündungsherd. Monozyten sind ebenfalls Phagozyten und weisen viele intrazytoplasmatische Lysosomen auf, die Säurehydrolasen und Peroxidase zur Abtötung intrazellulärer Mikroorganismen enthalten. Damit sind auch sie wie die Neutrophilen Granulozyten zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, also zum *oxidative burst*, befähigt. Außerdem sezernieren sie zahlreiche biologisch aktive Mediatoren und können zytotoxische Aktivität entfalten²⁵.

1.3.5 Makrophagen

Den anderen Teil des MPS bilden in verschiedene Gewebe ausgewanderte Monozyten, die sich dort zu Makrophagen mit einer Lebenszeit von einigen Monaten umwandeln. Dabei werden sie durch das jeweilige Gewebe zusätzlich zu den Fähigkeiten der Monozyten zu speziellen Funktionen geprägt, so z.B. die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Kupfferschen Sternzellen der Leber, die sessilen Makrophagen der Milz, Mikroglia des Gehirns, Osteoklasten des Knochens, die Peritonealmakrophagen sowie Bindegewebsmakrophagen (Histiozyten).

Eine ihrer Hauptfunktion ist die Phagozytose von eingedrungenen Erregern, Fremdkörpern und die Beseitigung zugrundegangener Zellen. Gemeinsam mit den Neutrophilen Granulozyten werden sie unter dem Begriff „professionelle“ Phagozyten zusammengefasst.

Bei Entzündungsreaktionen werden sie zu gesteigertem Metabolismus, Sekretion von Mediatoren, erhöhter Phagozytosefähigkeit und ausgeprägter Adhärenz stimuliert. Durch Interferon γ , das von T-Lymphozyten produziert wird, werden Makrophagen in einen rezeptiven Zustand versetzt („Priming“), und so für ein zweites, auslösendes Signal wie Endotoxin oder Zytokine empfänglicher gemacht („Trigger“). Weitere Makrophagen-aktivierende Faktoren sind der Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF), IL-2 und TNF- α .

Zu den proinflammatorischen Sekretionsprodukten der Makrophagen zählen Arachidonsäurederivate, reaktive Sauerstoffmetabolite, die Komplementkomponenten C3 und C5, IL-1, TNF- α , sowie lysosomale Enzyme, beispielsweise Kollagenase und Elastase, deren Freisetzung ursächlich an der Schädigung des Gewebes beteiligt ist²².

Makrophagen fördern nicht nur die Erhaltung des Entzündungsgeschehens, sondern sezernieren auch entzündungsdämpfende Produkte, zu denen die Enzyminhibitoren α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antiprotease zählen, weiterhin zählt die Phagozytose apoptotischer Überreste Neutrophiler Granulozyten zu ihren Aufgaben. Damit können Makrophagen auch zur Beendigung einer Entzündungsreaktion beitragen^{13, 81}.

Außerdem fungieren sie als antigenpräsentierende Zellen (APC) und schaffen die Voraussetzung für eine spezifische Immunantwort, indem sie Bestandteile phagozytierter Zellen an ihre Oberfläche transportieren und sie T-Lymphozyten präsentieren.

1.3.6 T-Lymphozyten

Bei der zellvermittelten Immunantwort spielen T-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Sie sind über das Vorhandensein des T-Zell-Rezeptors (TCR) und des damit assoziierten Polypeptidkomplexes CD3 definiert. Von den zwei Typen des Rezeptors TCR-1 und 2 ist der TCR-2 der häufigere, er wird von 95% der T-Zellen im Blut exprimiert.

Man unterscheidet unter den TCR-2 positiven Zellen CD4 positive T-Helferzellen und CD8 positive zytotoxische T-Zellen:

- CD4 positive T-Zellen erkennen Antigene in Verbindung mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse II, der auf antigenpräsentierenden Zellen und B-Lymphozyten vorhanden ist; sie sind dadurch an der Steuerung und Verstärkung der Immunantwort beteiligt.
- CD8 positive T-Zellen erkennen Antigene in Verbindung mit MHC Klasse I Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden und haben als Effektorzellen die Funktion, Zellen in allen Geweben zu zerstören, die mit intrazellulären Parasiten oder Viren infiziert sind.

TCR-1 positive Zellen, die nur 5% der zirkulierenden T-Zellen ausmachen, können CD8 positiv oder CD4 und CD8 negativ sein. Sie sind in Oberflächenepithelien der Haut und Schleimhaut beheimatet und werden intraepitheliale Lymphozyten (IEL) genannt^{25, 75}.

1.3.7 B-Lymphozyten

Funktion der B-Lymphozyten ist die Bildung von Antikörpern, die entweder sezerniert oder in die eigene Zelloberfläche eingebaut werden, um dort als spezifische Antigenrezeptoren zu fungieren. Im peripheren Blut zirkulierende B-Lymphozyten exprimieren hauptsächlich Immunglobuline der Klassen IgM und IgD mit derselben Spezifität. Nach Aktivierung differenzieren sich in den sekundären lymphatischen Organen und Geweben B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Nur ausnahmsweise treten sie im Blutkreislauf auf. Ihr Zytoplasma enthält reichlich endoplasmatisches Retikulum für die Bildung der Immunglobuline. Die sezernierten Antikörper werden zu den humoralen Komponenten des Immunsystems gezählt⁷⁵ und in dem folgenden Kapitel beschrieben.

1.4 Humorale Komponenten des Immunsystems

1.4.1 Das Komplementsystem

Unter diesem Begriff werden 21 Plasmaproteine zusammengefasst, die nach Aktivierung durch Antigen-Antikörperkomplexe (klassischer Weg) oder nach antikörperunabhängiger Aktivierung durch Mikroorganismen und Substanzen wie LPS (alternativer Weg) kaskadenartig miteinander reagieren und zur Lyse von Bakterienzellen führen.

Die Aktivierung hat eine Verstärkung der Entzündungsreaktion zur Folge, denn die Komplementkomponenten C3a, C4a und C5a haben zugleich chemotaktische Wirkung und stimulieren Leukozyten als Anaphylatoxine. Die Faktoren C3b und C4b dienen als Opsonine, die bei Anlagerung an eine Oberfläche Phagozyten aktivieren und die Erkennung und den Abbau von Fremdmaterial erleichtern, außerdem stimulieren sie die Bildung reaktiver Sauerstoffmetabolite.

1.4.2 Akute-Phase-Proteine

Während einer Entzündung steigt die Konzentration bestimmter Proteine im Serum, die unter dem Begriff Akute-Phase-Proteine zusammengefasst werden, an. Zu diesen zählen das α_2 -Coeruloplasmin, die C3-Komponente des Komplementsystems, das α_1 -Glykoprotein, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Haptoglobin, Fibrinogen, α_2 -Makroglobulin, C₁-Esteraseinhibitor sowie das C-reaktive Protein. Das zuletzt genannte ist besonders geeignet für die Diagnostik akuter Infektionen, da es bei einer Entzündung oder Gewebsschädigung schneller und deutlicher als die anderen Proteine dieser Gruppe ansteigt und wieder abfällt. Deshalb wird es als diagnostischer Verlaufsparemeter bei entzündlichen Erkrankungen bestimmt^{66, 88}. Das C-reaktive Protein wirkt als Opsonin und aktiviert die Komplementkaskade. Das Lipoproteinbindende Protein (LBP) kann ebenfalls zu den Akute-Phase-Proteinen gezählt werden⁹⁷, es vermittelt die Bindung von bakteriellem LPS an den CD14-Oberflächenrezeptor von Monozyten und Granulozyten.

1.4.3 Antikörper

B-Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen zur Bildung spezifischer Immunglobuline (Ig) angeregt. Die Antikörper eines jeden B-Zellklons sind spezifisch für ein bestimmtes Antigen. Bei dem ersten Kontakt mit diesem Antigen wird die entsprechende B-Zellpopulation aktiviert und zu Plasmazellen differenziert, die Antikörper (Ak) sezernieren, und zu Gedächtniszellen mit sehr langer Lebensdauer, die bei einer sekundären Immunantwort zu einer beschleunigten Antikörperproduktion führen.

Die sezernierten Antikörper –bei Primärantwort auf ein Antigen vor allem IgM, bei Sekundärantwort zum größten Teil IgG– binden mit einem variablen Teil (Fab) spezifisch an das Antigen und mit einem konstanten (Fc) an Leukozyten mit entsprechenden Rezeptoren.

Die Anlagerung von Antikörpern oder auch Komplementkomponenten an ein Antigen wird als Opsonisierung bezeichnet und erleichtert deren Erkennung durch die Zellen des Immunsystems. Die Fc-Fragmente der Antikörper sind in der Lage, über ihren Kohlenhydratanteil die Komplementkaskade zu aktivieren.

Weitere Antikörper sind Immunglobuline der Klasse IgA. Diese Antikörperklasse wird im Serum, auf Schleimhäuten und in Sekreten (z.B. Speichel, Tränen, Intestinalsekreten) gefunden und bildet dort eine Infektionsbarriere. Das sezernierte IgA enthält zusätzlich eine durch Epithelzellen gebildete Proteinkette, die den Transport an die Schleimhautoberfläche erleichtert und Schutz gegen Proteasen verleiht⁷⁵.

1.4.4 Zytokine

Unter Zytokinen werden Interleukine, Kolonie-stimulierende Faktoren, Interferone und andere Faktoren zusammengefasst, die überwiegend von Leukozyten freigesetzt werden.

Zytokine sind Mediatoren, die die Immunantwort steuern, indem sie pro- oder antiinflammatorische Wirkung entfalten. In dieser Funktion wirken sie auch auf das Wachstum und die Differenzierung von Leukozyten.

Es sind verschiedene Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF) bekannt, die spezifisch das Wachstum bestimmter Zellpopulationen fördern, wie der Makrophagen Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) und der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF), oder die ihre Wirkung auf mehrere Zellarten entfalten wie der Granulozyten/Makrophagen Kolonie-

stimulierende Faktor (GM-CSF) und Multi-CSF oder IL-3, das sowohl auf pluripotente als auch auf determinierte hämatopoetische Zellen proliferationsfördernd wirkt. Für ausgereifte Zellen stellen diese koloniestimulierenden Faktoren ein aktivierendes Signal dar. Sie fördern die Phagozytoseaktivität und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Makrophagen und Neutrophile Granulozyten.

Der GM-CSF induziert zusätzlich die Adhärenz, hemmt die Migration, steigert die Zytotoxizität, fördert die Prostaglandin- und Leukotrienproduktion sowie die Sekretion weiterer Zytokine und verzögert die Apoptose^{11, 23, 41}. Die Phagozyten erfahren durch Stimulation des gesamten Metabolismus und der selektiven Genexpression ein „Priming“, das sie für weitere aktivierende Signale empfänglicher macht.

Die meisten Interleukine (IL), von denen bisher 18 verschiedene beschrieben sind, haben vor allem eine proinflammatorische Funktion bei einer Immunantwort, es sind jedoch auch antiinflammatorisch wirkende Interleukine, wie IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, TGF- β und IL-1ra (Rezeptor-Antagonist) beschrieben^{6, 22, 39, 56, 85}. Im Gegensatz zu der Meinung anderer Autoren hat gemäß Xing et al.¹⁰⁸ IL-6 ebenfalls antiinflammatorische Wirkung.

Eine zentrale Rolle bei der Initiierung einer Entzündungsreaktion spielen IL-1 und TNF- α ^{69, 80} aus Makrophagen. IL-1 wirkt proliferationsfördernd auf T-Lymphozyten und fördert die Adhäsion Neutrophiler Granulozyten an das Gefäßendothel⁶⁸. IL-2 aus aktivierten T-Lymphozyten stimuliert sowohl T-Zellen, als auch natürliche Killerzellen, B-Lymphozyten und Makrophagen.

Außer IL-1 sind IL-6 und IL-8 potente Stimulatoren Neutrophiler Granulozyten⁴⁸. IL-1 wirkt neben TNF- α als endogenes Pyrogen und ruft über die Freisetzung von Prostaglandinen im hypothalamischen Thermoregulationszentrum Fieber hervor²⁵.

Antagonistisch zu IL-1 und IL-2 wirkt Transforming Growth Factor- β (TGF- β), um eine überschießende Proliferation von T-Zellen zu verhindern und die Entzündungsreaktion einzudämmen^{22, 25}.

Die Freisetzung des Entzündungsmediators TNF- α wird durch IL-2, LPS⁸⁰ und Peptidoglykan⁹⁴ bewirkt. Er steigert die Phagozytose, die antikörperabhängige Zytotoxizität und die Adhärenz Neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen. Zudem ist TNF- α an der Abtötung von Tumorzellen beteiligt und hat eine katabole Wirkung auf den menschlichen

Stoffwechsel, weshalb er auch als Cachectin bezeichnet wird. TNF- α und das genetisch verwandte Zytokin Lymphotoxin induzieren die Apoptose^{83, 84}.

PAF ist ein Entzündungsmediator, der von Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen produziert wird und wie das Peptidoglykan in der Pneumokokkenzellwand eine Phosphorylcholinkomponente besitzt, die für die biologischen Wirkungen verantwortlich gemacht wird⁸⁹.

Die Interferone (IFN) werden in zwei Gruppen unterteilt: IFN- α und IFN- β sind Typ I-Interferone mit primär antiviraler Wirkung, und IFN- γ als Typ II-Interferon mit immunmodulatorischer Funktion, der bei Monozyten und Makrophagen als „Priming“-Signal wirkt und die Phagozytose, Bakterizidie und Antigenpräsentation steigert.

Andere Zytokine mit Wirkung auf Makrophagen sind der Makrophagen-aktivierende Faktor (MAF), der die Zytotoxizität erhöht, der Migratons-Inhibitions-Faktor (MIF), der die Beweglichkeit der Zellen einschränkt und den Metabolismus steigert⁷⁵.

Die meisten Zytokine sind nur parakrin und autokrin wirksam, d.h. sie entfalten ihre Wirkung auf benachbarte Zellen und auf die sezernierenden Zellen selbst, jedoch sind für IL-1, IL-6 und TNF- α auch endokrine, also systemische Wirkungen bekannt.

Die Wirkungen der Zytokine werden durch membranständige Rezeptoren der Zielzellen vermittelt, die entweder konstitutiv vorhanden sind oder durch Stimulation induziert werden. Nach spezifischer Besetzung eines Rezeptors werden Enzymsysteme entweder direkt oder über intrazelluläre *second messenger* (z.B. cAMP) aktiviert, die beispielsweise zur Transkription bestimmter Gene führen.

1.5 Bakterien und ihre Toxine als Auslöser der Entzündung

1.5.1 Aufbau der Bakterienzellwand

Die Grundstruktur der bakteriellen Zellwand bildet ein Peptidoglykangerüst, auch Murein genannt. Das Heteropolysaccharid Peptidoglykan besteht aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure, die alternierend über β -1,4-glykosidische Bindungen zu langen, unverzweigten Ketten verknüpft sind. Quervernetzungen unter den einzelnen Ketten erfolgen über Tetrapeptide, die an die Lactylgruppe der N-Acetylmuraminsäure angehängt sind.

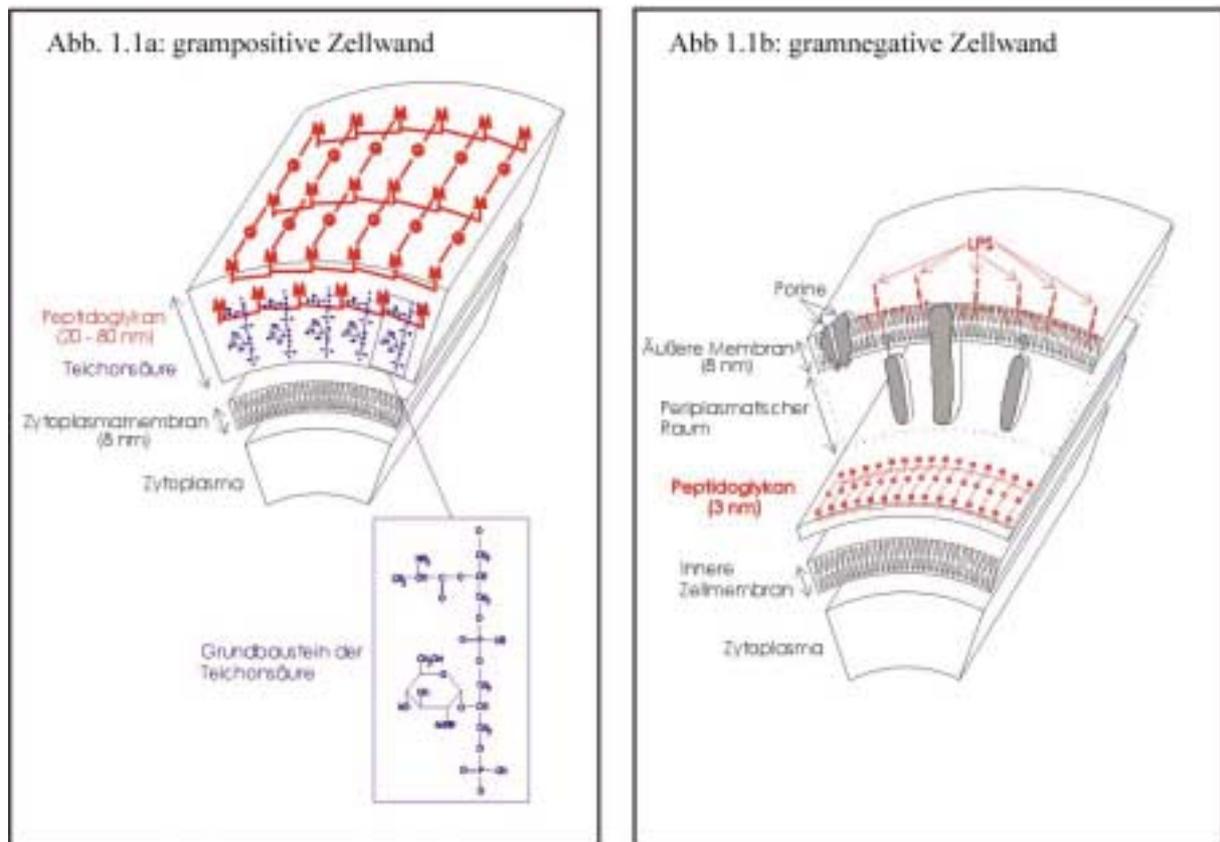


Abbildung 1.1: Wandaufbau grampositiver und gramnegativer Bakterien

1.5.2 Grampositive Bakterien

Bei grampositiven Bakterien sind bis zu 40 Mureinschichten übereinandergelagert, die eine 20 bis 80 nm dicke Schicht bilden und bis zu 70% des Zellwandtrockengewichtes ausmachen. Diese Zellwand lagert sich der Zytoplasmamembran von außen an. Viele grampositive Bakterien enthalten in ihrer Zellwand zusätzlich Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren, die kovalent über Amidbrücken an das Murein gebunden sind. Außerdem kommen kovalent an Murein gebundene Proteine oder Polysaccharide vor, die zur Einteilung von Bakterien in Gruppen und Typen verwendet werden (Lancefield-Typisierungsschema für Streptokokken). Ob die Zellwände bzw. das Peptidoglykan als Pathogenitätsfaktor bei grampositiven Bakterien eine ähnlich große Bedeutung hat wie das LPS bei gramnegativen Bakterien, ist nicht endgültig geklärt (s. Diskussion).

1.5.3 *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken)

Pneumokokken sind grampositive lanzettförmige Diplokokken, die beim Wachstum auf Blutagar einen Vergrünungshof durch α -Hämolyse aufweisen. Pathogene Pneumokokken sind von einer Polysaccharidkapsel umgeben. Als weitere Virulenzfaktoren sind bislang das Zytotoxin Pneumolysin⁷⁷, die IgA-1-Protease, zwei Neuraminidasen und die Hyaluronidase, sowie einige weitere Oberflächenproteine wie das SpsA und das PspA^{30, 62, 76} beschrieben worden. In der Zellwand ist das C-Polysaccharid lokalisiert, an welches das im Verlauf einer Infektion gebildete Akute-Phase-Serum-Protein CRP (C-reaktives Protein, s.Kap. 1.4.2) bindet⁶⁶.

1.5.4 Gramnegative Bakterien

Die Mureinschicht gramnegativer Bakterien ist ein- oder zweischichtig, etwa 3 nm dick und macht damit weniger als 10% der Zellwandtrockenmasse aus. Sie liegt nicht unmittelbar der Zytoplasmamembran an, sondern ist von dieser durch den enzymhaltigen periplasmatischen Raum getrennt. Zusätzlich verfügen gramnegative Bakterien über eine äußere Membran, die ähnlich wie die Zytoplasmamembran gebaut und kovalent über Lipoproteine an das Murein gebunden ist. Nach außen hin ragen aus dieser Membran Lipopolysaccharide (LPS) heraus, die über das Lipid A in ihr verankert sind. Der Polysaccharidanteil des LPS hat eine Kernregion, an die sich O-spezifische Seitenketten anlagern. Sie stellen die Determinanten der Oberflächen-(O)-Antigene dar und können spezies- oder serovarspezifisch sein (Einteilung der Salmonellen nach dem Kaufmann-White-Schema). LPS ist der gemeinsame Pathogenitätsfaktor aller gramnegativer Bakterien, wobei das Lipid A für dessen toxische Eigenschaften verantwortlich ist. Da es erst bei Lyse eines Bakteriums frei wird, wird es als Endotoxin bezeichnet. Es wirkt als exogenes Pyrogen.

Die zellulären Effekte des LPS werden durch den Leukozytenoberflächenrezeptor CD14 vermittelt, der vor allem auf Monozyten und Neutrophilen Granulozyten exprimiert wird². Das LPS bindet an CD14 unter Vermittlung des Akute-Phase-Proteins LBP (LPS-bindendes Protein)^{19, 53, 67, 82, 97}.

1.5.5 *Escherichia coli*

E. coli ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchen, das zur Normalflora des menschlichen Darmes gehört. Als fakultativ pathogene Keime sind bestimmte *E. coli* - Stämme Erreger einer Reihe intestinaler und extraintestinaler Infektionen. Neben dem Endotoxin LPS zählen zu den Pathogenitätsfaktoren einiger Stämme Fimbrien, Hämolysine und diverse Enterotoxine.

1.6 Apoptose

Im Zuge des Wachstums und der Differenzierung eines Organismus, aber auch bei der physiologischen Zellmauserung in Geweben, besteht neben der Proliferation von Zellen auch die Notwendigkeit zum Zugrundegehen von solchen Zellen, die ihre Funktionalität verloren haben oder durch reifere Zellen ersetzt werden. Dieses programmierte Zugrundegehen ist für jede Zelle genetisch festgelegt, kann aber auch durch bestimmte Faktoren beschleunigt bzw. verzögert werden. Der Begriff Apoptose (griech.: herunterfallen) soll die Ähnlichkeit dieses programmierten Zelltodes zu dem Herunterfallen der Blätter eines Baumes verdeutlichen, weil nur vereinzelte Zellen eines Gewebsverbandes zugrundegehen.

Bei neoplastischen Tumoren wirkt die Aktivierung der Apoptose in den entarteten Zellen einem Wachstum entgegen. Hierbei spielt das p53 Tumorsuppressorgen⁵⁰ eine entscheidende Rolle. Das Produkt des *bcl-2* Gens ist in der Lage, die Apoptose zu verhindern^{35, 36}, so daß beim Fehlen dieses Proteins ein Wachstum von entarteten Zellen begünstigt ist.

Die Apoptose ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozeß, an dem zelleigene Enzyme beteiligt sind. Nach anfänglicher Zellschrumpfung kommt es zu marginaler Chromatinkondensation und Fragmentation der Zelle, dabei enthalten die einzelnen Fragmente Organellen und Chromatin und sind von einer Membran umgeben. Aus diesem Grund werden keine Zellinhalte freigesetzt und eine Entzündungsreaktion bleibt aus. Die durch Endonucleasen³ in regelmäßig große Bruchstücke geschnittene DNA erzeugt in der Gelelektrophorese die typische „Leiterstruktur“.

Im Gegensatz zu dieser physiologischen Form des Zelltodes steht die Nekrose, der eine pathologische Ursache zugrundeliegt, bei der meist ein zusammenhängender Gewebsverband zugrundegeht. Es handelt sich um einen passiven Vorgang, bei der die Zelle ihren Stoffwechsel und transmembranären Ionengradienten nicht mehr aufrechterhalten kann, deshalb führt der frühe Verlust der Integrität der Zellmembran zur Freisetzung des Zellinhaltes und löst auf diesem Wege eine Entzündungsreaktion aus oder verstärkt diese.

Tab. 1 Vergleich Apoptose-Nekrose

Apoptose	Nekrose
<u>biochemisch:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Energieabhängiger, aktiver Prozeß mit Enzyymbeteiligung • Frühe DNA-Fragmentation durch Endonucleasen in Mono- und Oligonucleosomen 	<ul style="list-style-type: none"> • Passiver Prozeß, Verlust der Zellhomöostase • Späte Degradation der DNA in Bruchstücke unregelmäßiger Größe
<u>morphologisch:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Zellmembran bleibt intakt • Chromatinaggregation an Kernmembran • Zellschrumpfung und Bildung apoptotischer Körperchen • Organellen bleiben intakt 	<ul style="list-style-type: none"> • Verlust der Membranintegrität • Chromatinstruktur wird beibehalten • Schwellung der Zelle und Lyse • Organellenschwellung mit Funktionsverlust
<u>physiologische Aspekte:</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • Sterben einzelner, isolierter Zellen • Ausgelöst durch physiologische Reize • Keine nachfolgende Entzündung 	<ul style="list-style-type: none"> • Absterben zusammenhängender Zellgruppen • Durch nicht physiologische Reize ausgelöst • Löst Entzündungsreaktion aus

Im Rahmen des Entzündungsgeschehens kommt der Apoptose ebenfalls eine regulative Bedeutung zu. Eine Induktion der Apoptose führt zur Terminierung der Entzündungsreaktion, eine Verzögerung jedoch verlängert die Aktivität der Neutrophilen Granulozyten und wirkt somit proinflammatorisch^{31, 32}.

Zahlreiche körpereigene Mediatoren nehmen einen Einfluß auf das Apoptoseverhalten der Neutrophilen Granulozyten, so wird die Apoptose durch die Zytokine GM-CSF^{23, 43, 44}, IL-2⁶³, IL-4²⁷, IL-6⁵, IL-8^{38, 46}, IL-15²⁶, sowie durch PAF, Thrombozyten¹ und C5a^{10, 49} verzögert.

TNF- α und IL-10 sind bisher die einzigen beschriebenen körpereigenen Mediatoren, die die Apoptose induzieren^{14, 28, 84, 93}.

Körperfremde Faktoren, die die Apoptose im Sinne einer Verzögerung beeinflussen, sind bakterielles LPS^{29, 43, 109}, inaktivierte Streptokokken¹⁰ und Glucocorticoide^{12, 37}, beschleunigend auf den Prozess wirken phagozytierte *E. coli*^{101, 102}.

Außerdem haben Transmigration der Leukozyten und Adhäsionsmoleküle eine regulative Wirkung auf die Neutrophilenapoptose. Watson et al.¹⁰³ haben gezeigt, daß sowohl die Transmigration durch Gefäßendothel, als auch eine Verbindung der β_2 -Integrine CD11a oder CD11b mit monoklonalen Antikörpern die Apoptose verzögern. Durch die Verbindung von L-Selektin mit monoklonalen Antikörpern wird die Apoptose dahingegen beschleunigt.

1.7 Adhäsionsmoleküle

Der Durchtritt von Leukozyten durch Kapillarwände wird einerseits durch Adhäsionsmoleküle auf den Leukozyten selbst als auch auf Endothelzellen vermittelt. Auf Leukozytenoberflächen werden die Adhäsionsmoleküle CD11 und CD18 sowie das L-Selektin oder LAM-1 (Leukocyte Adhesion Molecule) exprimiert. CD11 und CD18 gehören zu den Integrinen und bilden als Heterodimer eine funktionelle Einheit. Sie sind aus unterschiedlichen α -Untereinheiten (CD11a, CD11b oder CD11c), aber der gleichen β -Untereinheit (CD18) zusammengesetzt.

Auf Kapillarendothelzellen werden ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule, CD54), das der Familie der Immunglobuline angehört, sowie P-Selektin (CD62P) und E-Selektin (ELAM, Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule) exprimiert⁹⁰.

Bevor es zur Adhäsion der Leukozyten kommen kann, müssen diese aus dem mittleren Blutstrom an die Gefäßwand gelangen. Hier kommt es zunächst zu einer schwachen Adhäsion, die durch die Selektine vermittelt ist, man spricht auch von *rolling* der Leukozyten entlang der Endothelzellen⁴¹. Darauf folgt die durch Integrine und ICAM vermittelte starke Adhäsion und Extravasation der Leukozyten⁴⁹. Die Transmigration der Leukozyten erhöht ihre Lebensdauer¹⁰³. Andererseits wird mit dem Einsetzen der Apoptose die Fähigkeit der Neutrophilen Granulozyten zur Adhäsion eingeschränkt¹⁶.

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Pneumokokken und Pneumokokkenzellwänden auf die Aktivität Neutrophiler Granulozyten zu studieren.

Einerseits sollte untersucht werden, ob Pneumokokken bzw. deren Zellwände die Radikalfreisetzung (*oxidative burst*) von Neutrophilen Granulozyten induzieren. Desweiteren sollte die Rolle des CD14-Rezeptors bei der Aktivierung dieser Zellen ermittelt werden.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob und in welcher Weise Pneumokokken und deren aufgereinigte Zellwände die Apoptose und Nekrose der Neutrophilen beeinflussen.

Für gramnegative Bakterien ist es bekannt, daß ganze Bakterien die Apoptose Neutrophiler Granulozyten induzieren, Zellwandbestandteile sie jedoch verzögern. Es sollte geprüft werden, ob diese Ergebnisse in gleicher Weise für die Veränderung des Apoptoseverhaltens durch grampositive Bakterien zutreffen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialliste

Folgende Materialien wurden bei der vorliegenden Arbeit verwendet:

2.1.1 Aufreinigung Neutrophiler Granulozyten aus *buffycoats*

- a. 50 ml Röhrchen (Becton Dickinson)
- b. Ficoll-Paque[®] (Pharmacia Biotech, Freiburg)
- c. PBS, pH 7,3, steril und pyrogenfrei:
 - 800 g/l NaCl
 - 0,20 g/l KCl
 - 0,25 g/l KH₂PO₄
 - 1,35 g/l Na₂HPO₄
- d. NH₄Cl- Lösung, (pH 7,8) isotoniert und sterilisiert:
 - 8,30 g/l NH₄Cl
 - 1,00 g/l KHCO₃
 - 0,0375 g/l EDTA-Na₂
- e. Zellschaber (Greiner)
- f. Neubauer-Zählkammer
- g. Trypanblau

2.1.2 Messung des *oxidative burst*

- a. 12×75 mm Falcon Rundbodenröhrchen (Becton Dickinson)
- b. PBS
- c. Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion, Sigma, Deisenhofen)
- d. PMA (Phorbol-Myristat-Acetat, Sigma, Deisenhofen)

2.1.3 ELISA zum Nachweis von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten

a. Cell Death Detection ELISA^{PLUS}[®] (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Dieser enthält:

1. Biotin-markierte monoklonale Anti-Histon-Antikörper aus der Maus
2. Peroxidase-konjugierte monoklonale Anti-DNA-Antikörper aus der Maus
3. DNA-Histon-Komplex als Positivkontrolle
4. Inkubationspuffer
5. Lysepuffer
6. Substratpuffer und darin zu lösende Substratablette
7. Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten

b. Aqua bidestillata

c. PBS

2.1.4 Durchflußzytometrie

a. Apoptosis detection kit TACSTM Annexin V-FITC (R&D Systems, Wiesbaden)

b. Cell-QuestTM Software Programm (Becton Dickinson, Heidelberg)

2.1.5 Kultivierung Neutrophiler Granulozyten

a. Zellkulturmedium:

DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium, Gibco, Eggenstein)

mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum)

b. Zellkulturflaschen:

Schräghalskulturflaschen mit gasdurchlässigem Verschuß, Grundfläche 75 cm²
(Corning Costar, Bodenheim)

2.1.6 Aufreinigung der Pneumokokkenzellwände

- a. SDS (Merck, Darmstadt)
- b. NaN_3 (Merck, Darmstadt)
- c. MgSO_4 (Merck, Darmstadt)
- d. Trispuffer (Sigma, Deisenhofen)
- e. DNase (Sigma, Deisenhofen)
- f. RNase (Sigma, Deisenhofen)
- g. Pronase (Sigma, Deisenhofen)
- h. Glasperlen mit 0,10-0,11mm Durchmesser (Braun, Melsungen)
- i. 0,7 M NaOH
- j. 0,5% Methylenblau
- k. Chloroform

2.1.7 Verwendete Bakterien und deren Kultivierung

- a. *Streptococcus pneumoniae*, bekapselter Stamm D39
- b. *Streptococcus pneumoniae*, Pneumolysin-defiziente Mutante des Stammes D39
- c. *Streptococcus pneumoniae*, unbekapselter Stamm R6x
- d. Todd-Hewitt-Nährbouillon
- e. Müller-Hinton-Agar mit 3% Schafblut
- f. 0,5% Hefeextrakt
- g. 10% Glycerinlösung

2.1.8 Monoklonale Antikörper

- a. Anti-CD14, IgM aus der Maus, anti-human, 2,5-10 $\mu\text{g/ml}$ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim)
- b. Anti-CD13, IgG1 aus der Maus, anti-human, 5 $\mu\text{g/ml}$ (Immunotech, Marseille)
- c. Anti-CD63, IgG1 aus der Maus, anti-human, 5 $\mu\text{g/ml}$ (Immunotech, Marseille)
- d. Anti-BSA, IgG2a aus der Maus, anti-bovin, 5 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Deisenhofen)

2.1.9 Stimulanzen

- a. PMA (Sigma, Deisenhofen)
- b. LPS (*Escherichia coli* K-235, Sigma, Deisenhofen)
- c. BSA (Rinderserumalbumin, Sigma, Deisenhofen)
- d. PCW (aufgereinigte Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* (R6x), Purified Cell Wall)
- e. Hitzeinaktivierte Pneumokokken (R6x)

2.2 Methodenbeschreibungen

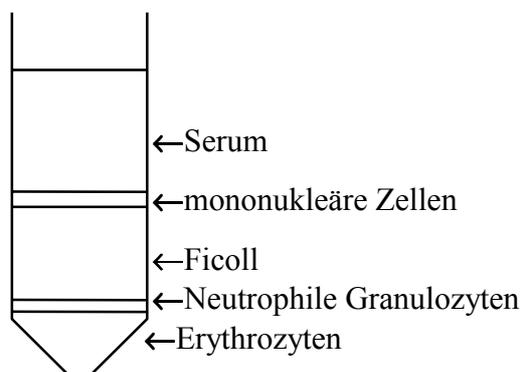
2.2.1 Isolierung der Neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden aus *buffycoats* aus tagesfrischem Blut von vier gesunden Spendern isoliert. Zu diesem Zweck wurden je 15 ml des *buffycoat* in ein 50ml Röhrchen überführt, je 20 ml PBS dazugegeben und mit je 15 ml Ficoll-Paque[®] unterschichtet.

Nach 20 minütigem Zentrifugieren bei 700 g waren die Blutbestandteile nach ihrer Dichte aufgetrennt, so daß das Serum, mononukleäre Zellen, Ficoll, Granulozyten und Erythrozyten in unterschiedlichen Banden im Röhrchen vorlagen (s. Abb. 2.1). Das Serum, die mononukleären Zellen, sowie das Ficoll wurden abgesaugt und die verbleibende Zellsuspension zur Lyse der Erythrozyten mit bei 37°C vorgewärmtem NH₄Cl auf 50 ml aufgefüllt. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Suspension 10 Minuten lang bei 200 g zentrifugiert. Die Neutrophilen Granulozyten bildeten nun das Pellet und der aus lysierten Erythrozyten bestehende Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 50 ml NH₄Cl resuspendiert, erneut 5 min inkubiert und 10 min bei 200 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet zweimal mit 50 ml PBS gewaschen. Vier Pellets wurden in PBS resuspendiert und gepoolt, eine Probe (100µl) aus dieser Zellsuspension wurde nach Färbung mit Trypanblau (900 µl) in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da nur tote Zellen diesen Farbstoff aufnehmen und vitale mit intakter Zellmembran ihn ausschließen, wurde so der Anteil vitaler Zellen in der Suspension bestimmt. Dieser betrug stets mehr als 95%.

Für die Stimulationsversuche zur Messung des *oxidative burst* wurden die Neutrophilen Granulozyten in einer Konzentration von 10⁶/ml, zur Messung der Apoptoseinduktion in einer Konzentration von 10⁵/ml verwendet.

Abb. 2.1:



2.2.2 Bakterienkulturen

Herstellung von Pneumokokkenstammlösungen:

Die Pneumokokken (R6x) wurden auf Müller-Hinton-Agar mit 3% Schafblut ausgeimpft, über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 10 ml Todd-Hewitt-Nährbouillon (+ 0,5% Hefeextrakt) auf eine optische Dichte von 0,1 (bei einer Wellenlänge von 600 nm, OD₆₀₀) beimpft und die Bakterienkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 kultiviert. Die Kulturen wurden portioniert zu 100 µl in 10% Glycerin bei -70°C aufbewahrt.

250 ml Todd-Hewitt-Nährbouillon wurden mit 100 µl der Pneumokokkenstammlösung beimpft und bei 37°C und 5% CO₂ bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 (mitlogarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Konzentration der Bakterien lag zwischen 5×10⁶/ml und 1,5×10⁷/ml.

2.2.3 Inaktivierung der Pneumokokken

Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 wurden 5 ml der Kultur bei 4500 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das aus Pneumokokken bestehende Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde ebenfalls bei 4500 g zentrifugiert, das Pellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert und für 20 min in einem Wasserbad bei 60°C inaktiviert. Bei einer 1:10 Verdünnung dieser Lösung wurde die OD₆₀₀ ermittelt, dabei entsprach eine OD von 0,2 5×10⁷ Bakterien der Ausgangslösung.

Die Bakteriensuspension wurde mit DMEM verdünnt, so daß in den Stimulationsversuchen die Bakterien in einer Endkonzentration von 10⁵, 10⁶ und 10⁷ CFU/ml Kulturmedium eingesetzt wurden.

Durch die Hitzeinaktivierung wurde erreicht, daß die Pneumokokken nicht mehr vermehrungsfähig waren. Dies wurde jeweils durch eine negative Kultur der zur Stimulation verwendeten Bakteriensuspension überprüft.

2.2.4 Aufreinigung der Zellwände

Zur Herstellung der PCW wurde ein zuvor beschriebenes Verfahren mit Modifikationen angewendet^{15, 33, 51}. Die Pneumokokken wurden über Nacht in 1000 ml Todd-Hewitt Nährbouillon bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Die Bakterien wurden pelletiert (4°C, 4500 g, 10 min). Der Überstand wurde abgegossen, das Pellet in 40 ml eiskalter 50 mM Tris-HCl Lösung resuspendiert (pH 7,0). Die Zellsuspension wurde langsam zu 120 ml 100°C warmer, 5%-iger SDS-Lösung dazugegeben und die Temperatur 15 min lang konstant gehalten. Nachdem die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurde sie bei 17000 g 10 min lang zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet über Nacht auf Eis gestellt. Die Pellets wurden zweimal mit 20 ml 1 M NaCl, dann dreimal mit 20 ml A.d. gewaschen, bis kein SDS mehr in der Lösung nachzuweisen war. Bei diesen Schritten wurde jeweils 10 min bei 17000 g zentrifugiert. Der Nachweis von SDS erfolgte, indem zu 335 µl Probenüberstand 170 µl 0,7 M NaOH, 25 µl 0,5% Methylenblau und 1 ml Chloroform pipettiert wurde, nach heftigem Schütteln verfärbte sich diese Lösung blau bei vorhandenem SDS, rosa wenn kein SDS mehr in der Lösung vorlag. Zu den in 2 ml A.d. resuspendierten Pellets wurde das gleiche Volumen an Glasperlen hinzugefügt und zehnmal 2 min lang heftig geschüttelt, um die durch SDS aufgebrochenen Bakterien mechanisch zu zertrümmern. Nach dem Sedimentieren der Glasperlen wurde der Überstand, indem sich die Zellwände befanden, filtriert, um auch die restlichen Glasperlen zu entfernen, und das Filtrat bei 700 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem separaten Röhrchen aufbewahrt, das Pellet nochmal aufgeschwemmt, um die restlichen darin befindlichen Zellwände in einem erneuten Zentrifugationsschritt (700 g, 10 min) zu gewinnen. Dieser Überstand wurde mit dem vorherigen kombiniert, das aus intakten Bakterien bestehende Pellet verworfen. Die kombinierten Überstände wurden bei 38000 g 15 min lang zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet bestand danach aus Bakterienzellwänden. Diese wurden in 2 ml 100 mM Tris (pH 7,5) mit 0,05 % NaN₃ resuspendiert. Zu der Lösung wurden 400 µl 100mM MgSO₄ gegeben, so daß eine Endkonzentration von 20 mM erreicht wurde, sowie 20 µl DNase (Stocklösung 1mg/ml, Endkonzentration 10 µg/ml) und 10 µl pankreatische RNase (Stocklösung 50mg/ml, Endkonzentration 50µg/ml) hinzugegeben. Die Lösung wurde für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die Nukleinsäuren der Bakterien abzubauen. Dann folgte die Zugabe von 200 µl Trypsin (Stocklösung 1mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml) und 20 µl 1M CaCl₂.

Die Lösung wurde über Nacht unter ständigem Rühren bei 37°C inkubiert. Durch erneute SDS-Extraktion wurden die zugegebenen Enzyme entfernt. Zu diesem Zweck wurde der Lösung 200 µl 10%ige SDS Lösung hinzupipettiert, so daß die Endkonzentration 1% betrug und diese 15 min lang im Wasserbad auf 60-80°C erhitzt. Dann wurde mit A.d. auf 20 ml aufgefüllt und bei 38000 g 15 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 20 ml A.d. resuspendiert und der Waschschrift wiederholt, bis kein SDS mehr nachweisbar war (Methode s.o.), schließlich wurde das Pellet lyophilisiert und gewogen. Aus einem Liter Bakterienkultur wurden ca. 30 mg Zellwandlyophilisat (PCW) gewonnen. Das Pellet wurde in destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 1mg/ml resuspendiert.

2.2.5 Opsonisierung

Zur Opsonisierung wurde von allen vier Spendern das Serum gesammelt, welches nach der Dichtegradientenzentrifugation des Blutes in der obersten Schicht des Röhrchens enthalten war (s. unter Isolierung der Neutrophilen Granulozyten, Abb. 2.1). Die Seren der vier Spender wurden gepoolt und in 10%iger Konzentration verwendet. Die Opsonisierung erfolgte auf einem Rüttler über 30 Minuten bei 37°C. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen, so daß im Endansatz keine freien Serumbestandteile vorlagen.

2.2.6 Komplementinaktivierung

Die Opsonisierung wurde zusätzlich mit komplementinaktiviertem Serum durchgeführt. Die Komplementkomponenten im Serum wurden inaktiviert, indem das Serum 30 Minuten lang in einem Wasserbad bei 56° C erhitzt wurde.

2.3 Chemilumineszenz

Zur Messung der Radikalproduktion der Neutrophilen Granulozyten diente der AutoLumat LB 953 (E&G Berthold, Bad Wildbad).

2.3.1 Messprinzip

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die nach Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten freigesetzt werden, können durch Chemilumineszenz detektiert werden. Dafür ist die Zugabe von luminogenen Substanzen erforderlich. Diese reagieren mit freien Radikalen und werden in einen energiereichen Zustand versetzt. Die Energie aus diesen Zwischenprodukten wird bei ihrem Zerfall in Form von Photonen frei, die durch den AutoLumat quantitativ erfaßt werden. Dazu dient der im Gerät integrierte Photomultiplier, der als ultraschneller Photonenzähler betrieben wird und zur Messung auf 8°C abgekühlt wird, um die Untergrundrate zu reduzieren. Die hier verwendete luminogene Substanz Luminol (5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazindion) emittiert Photonen bei einer Wellenlänge von 460 nm, die vom AutoLumat LB 953 in *counts per minute* (cpm) gemessen werden. Ein *count* entspricht einer bestimmten Anzahl von auftreffenden Lichtquanten.

2.3.2 Proben für die Chemilumineszenzmessung

Zu jeweils 10^6 Granulozyten wurde das stimulierende Agens in unterschiedlicher Menge dazugegeben. Zur Generierung der Lichtquanten war für jede Probe 100 µl Luminol erforderlich. Mit PBS wurden die Proben auf jeweils 1ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die einzelnen Komponenten wurden unmittelbar vor Beginn der Messung zusammengeführt um die Reaktion von Anfang verfolgen zu können. Gemessen wurde bei 460 nm, 37°C über 240 Minuten.

2.4 Kultivierung der Neutrophilen Granulozyten

Zur Untersuchung auf Histon-assoziierte DNA-Fragmente wurden die isolierten Neutrophilen Granulozyten in je 10ml DMEM mit 10% FCS aufgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ 24 Stunden lang kultiviert. Die Stimulanzen wurden den Kulturmedien zu Anfang hinzugegeben. Alle zwei Stunden wurden 100µl der Kultur entsprechend 10^4 Zellen entnommen und für den ELISA vorbereitet.

2.5 ELISA zum Nachweis Histon-assoziiierter DNA-Fragmente

Zur Ermittlung der beginnenden Apoptose wurde der Cell Death Detection ELISA^{PLUS}-Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) eingesetzt.

2.5.1 Prinzip des ELISA

Der verwendete ELISA basiert auf dem Sandwich-Prinzip, d.h. daß dem zu messenden Antigen zwei verschiedene monoklonale Antikörper anhaften. Der erste Antikörper ist gegen Histonprotein gerichtet und über seinen Biotin-Anteil an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Der zweite, gegen DNA gerichtete monoklonale Antikörper haftet sich den Nukleosomen an und ist Peroxidase-konjugiert. Dieses Enzym ist nach Zugabe des Substrates ABTS für dessen Umsatz verantwortlich. Das Produkt bewirkt den Farbumschlag der Lösung, deren Extinktion bei 405 nm gemessen wird. Die Extinktionswerte erlauben eine Aussage über das zeitliche Auftreten der Histon-assoziierten DNA-Fragmente in den Neutrophilenkulturen.

2.5.2 Die Probenvorbereitung für den ELISA

Am Anfang der Stimulation und später alle zwei Stunden wurden jeweils dreifach 100µl aus einer Kulturflasche entsprechend 10^4 Zellen entnommen und bei 200 g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, die pelletierten Neutrophilen Granulozyten in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die nach der Karyolyse zytoplasmatisch vorliegenden Nukleosomen freizusetzen. Danach wurden bei 200 g die intakten Zellkerne und hochmolekulare DNA pelletiert und aus dem Überstand, in dem sich die Mono-, und Oligonukleosomen befanden 20µl entnommen, die bis zur Messung im ELISA bei 4°C gelagert wurden. Nach Ablauf von 24 h wurden die Proben in die mit Streptavidin beschichteten 96-well Mikrotiterplatten pipettiert, dazu jeweils 80 µl Immunreagenz, bestehend aus den beiden Antikörpern und dem Inkubationspuffer. Diese wurden zwei Stunden lang auf einem Rüttler bei 500 U/min inkubiert. Dann wurde dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen, um die im Überstand befindlichen Immunkomplexe zu

entfernen. Als nächstes wurde die Substratlösung hinzupipettiert und 15 min lang auf dem Rüttler inkubiert. Sofort im Anschluß erfolgte die Messung mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm. Für die Auswertung wurde aus den einzelnen Werten der Dreifachbestimmungen jeweils der Mittelwert gebildet.

2.6 Durchflußzytometrie

Die Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose in den Zellkulturen erfolgte durch Messung der Bindung von Annexin V und der Aufnahme bzw. dem Ausschluß von Propidiumjodid mittels Durchflußzytometrie¹⁰⁰.

Annexin V ist ein antikoagulatorisches Protein, das an negativ geladene Phospholipide der Zellmembran bindet. In der frühen Phase der Apoptose kommt es zur Aufhebung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran, so daß Phosphatidylserin, das sonst nur in der inneren Schicht der Phospholipiddoppelschicht lokalisiert ist, in die äußere Schicht der Zytoplasmamembran gelangt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin unter der Vermittlung von Calciumionen. Das verwendete Annexin V ist FITC-konjugiert, um die apoptotischen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflußzytometrie zu detektieren.

Propidiumjodid wird von nekrotischen Zellen und von apoptotischen Zellen im späten Stadium aufgenommen. Vitale Zellen werden weder durch Annexin V noch durch Propidiumjodid markiert.

Die durchflußzytometrische Analyse wurde mit dem Cell-QuestTM Programm erstellt. Die logarithmische Fluoreszenzintensität von Annexin V-FITC ist dabei gegen die Fluoreszenzintensität von Propidiumjodid in einem Dichtediagramm aufgetragen. Für eine Analyse wurden jeweils 10^5 Neutrophile Granulozyten eingesetzt.

2.7 Färbung der Ausstriche (TUNEL-Methode)

Mit dieser Methode (*TdT mediated dUTP-X Nick End Labeling*) werden apoptotische DNA-Fragmente mittels *in situ tailing* angefärbt, indem den DNA-Fragmenten, die durch die Apoptose entstehen, am 3'-Ende (*nick*) mittels des Enzyms TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) Farbstoff-markierte Nukleotide angehängt werden (*tailing*). Durch diese Färbung können die apoptotischen Zellkerne mikroskopisch dargestellt werden.

Für die Anwendung der TUNEL-Methode wurden zu den Messzeitpunkten des ELISA jeweils Aliquots aus den Granulozytenkulturen entnommen, Ausstriche der Zellen angefertigt, über Nacht luftgetrocknet und bei Raumtemperatur in 100% Aceton 5 Minuten lang fixiert.

Die Zellen wurden rehydriert und für 15 min bei 37°C mit 50 µg/ml Proteinase K (Sigma, Deisenhofen) behandelt. Danach wurden die Ausstriche für 1 h bei 37°C in einem Reaktionsgemisch bestehend aus

10 µl 5× Tailing Puffer

1 µl Digoxigenin DNA Labeling Mix

2 µl Cobaltchlorid

12 U terminale Transferase

A.d. ad 50 µl

inkubiert und zweimal mit 10% FCS für 15 min bei Raumtemperatur gewaschen.

Dann wurde eine Lösung von alkalische Phosphatase-markiertem Anti-Digoxigenin-Antikörper in 10% FCS für 60 min bei 37°C auf die Ausstriche aufgetragen. Die Farbreaktion wurde mittels 4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/5-Bromid-4-Chlorid-3-Inodyl-Phosphat (NBT/BCIP) erreicht. Die Ausstriche wurden mit Nuclear Fast Red-Aluminiumhydroxid gegengefärbt. Die Reagenzien wurden bei Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 *Oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten

Als ein Maß für die durch verschiedene Stimulanzen induzierbare Aktivierung Neutrophiler Granulozyten gilt ihre Radikalfreisetzung, auch *oxidative burst* genannt. Dieser wurde mittels Chemilumineszenz gemessen, wobei Neutrophile mit stoffwechelaktiven und hitzeinaktivierten Pneumokokken in verschiedenen Konzentrationen (10^6 /ml; Verhältnis Neutrophile Granulozyten zu Bakterien 1:1 bzw. 10^7 /ml; 1:10), sowie PCW von Pneumokokken ($50 \mu\text{g/ml}$) aus eigener Präparation stimuliert wurden.

Die Erfassung der Aktivität erfolgte jeweils über 240 Minuten. In den folgenden Diagrammen ist die Aktivität der Neutrophilen, ausgedrückt in cpm (*counts per minute*), gegen die Zeit aufgetragen.

Als Negativkontrolle wurden bei den Messungen jeweils 10^6 /ml unstimulierte Neutrophile Granulozyten eingesetzt, dabei war ihre über 240 min gemessene Grundradikalproduktion konstant bei ca. 10^5 cpm ohne erkennbare Tendenzen zur Zu- oder Abnahme. Die Zugabe von PMA, das als ein Maximalstimulus für die Radikalproduktion gilt und bei den Versuchen als Positivkontrolle diente, löste eine sehr starke Zunahme bis $2,5 \times 10^8$ cpm aus. Diese setzte unmittelbar nach Zugabe von PMA ein, erreichte ihren Höhepunkt nach 15 min und fiel danach wieder auf den Ausgangswert ab, der nach etwa 100 min erreicht wurde (Abb. 3.1).

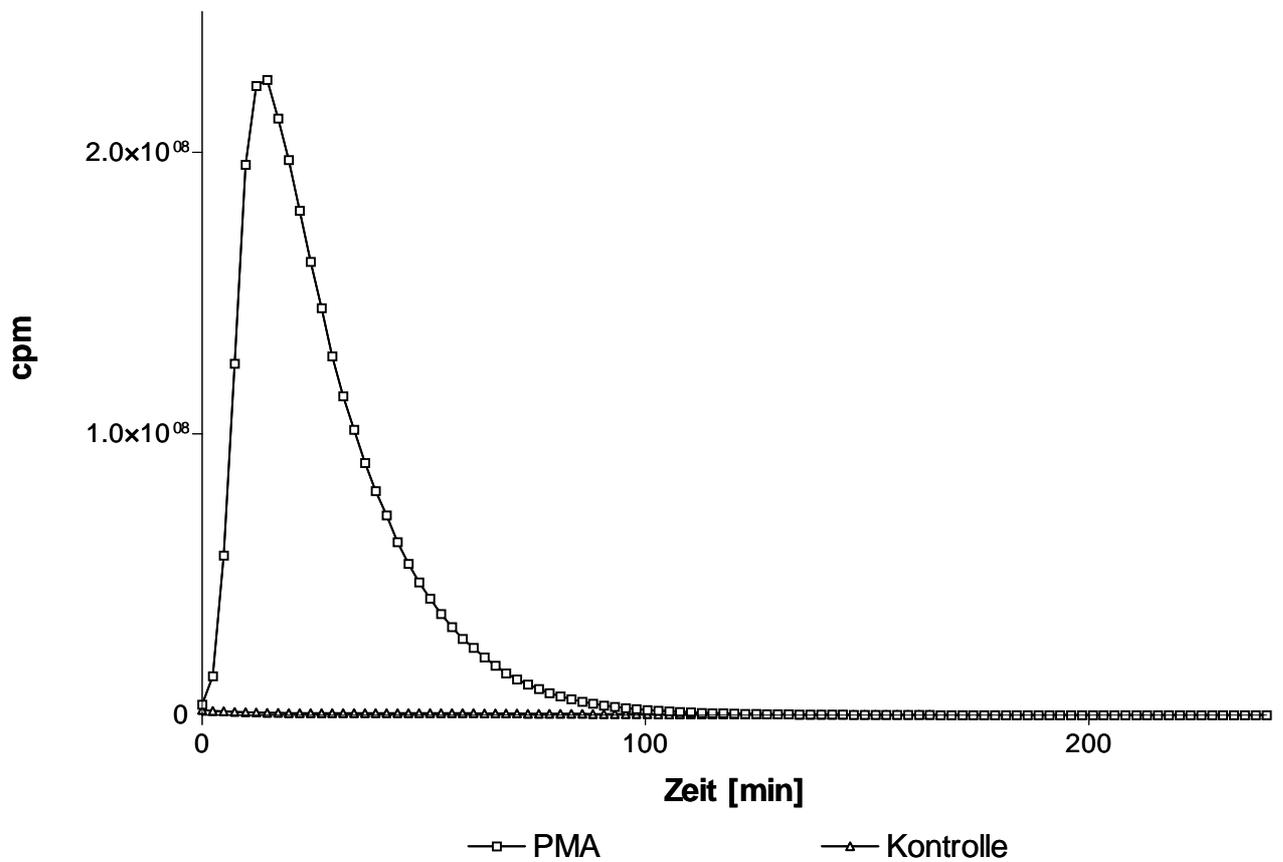


Abbildung 3.1: *Oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten nach Zugabe von PMA im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen

3.1.1 Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken

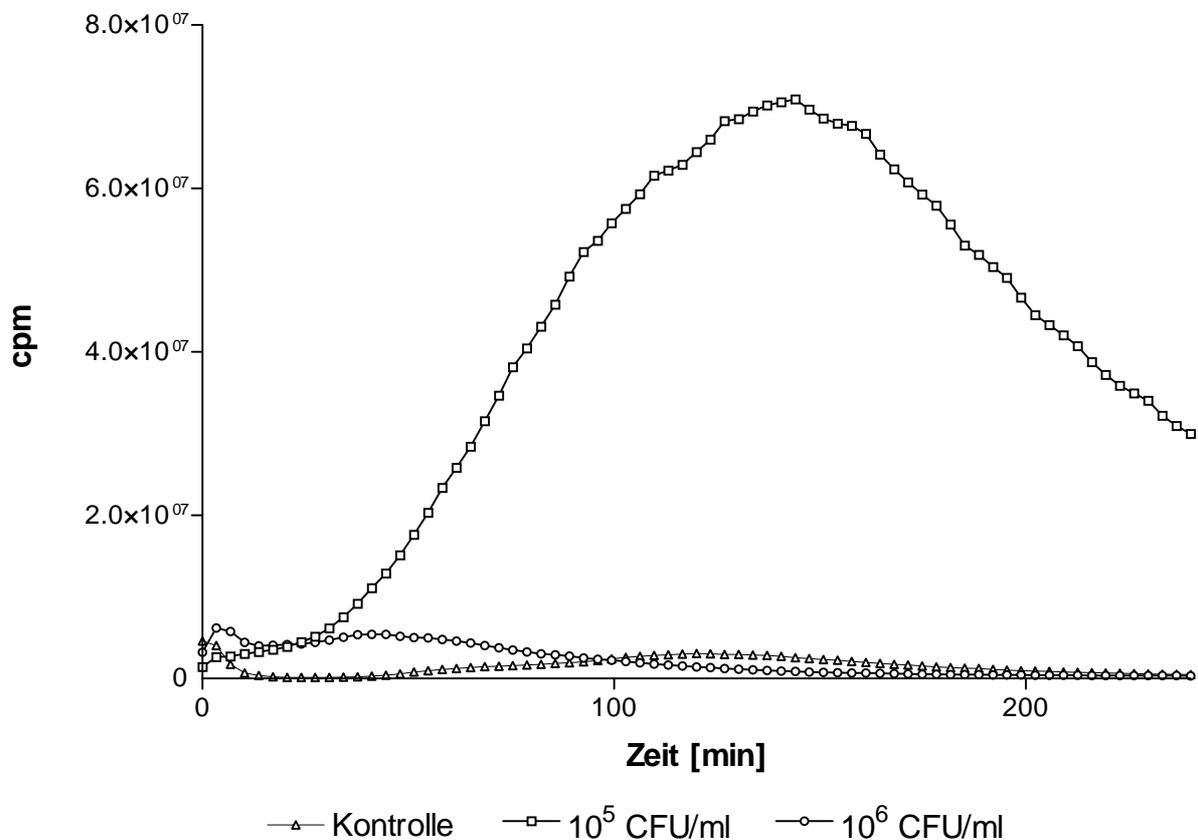


Abbildung 3.2: *Oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken (10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml)

Stoffwechselaktive Pneumokokken führten zu einer Freisetzung oxidativer Radikale nur in einer eingesetzten Bakterienkonzentration von 10^5 / ml (Abb. 3.2). Das Verhältnis von Neutrophilen Granulozyten zu Pneumokokken betrug dabei 10:1. Der Spitzenwert der Radikalproduktion von 6×10^7 wurde nach 150 min erreicht. Im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen betrug dieser Wert mehr als das 100fache.

Bei Exposition Neutrophiler Granulozyten mit einer Bakterienkonzentration von 10^6 CFU/ml (1:1) war die Radikalfreisetzung mit der von unstimulierten Neutrophilen vergleichbar. Bei 10^7 CFU/ml (1:10) wurde eine noch niedrigere Radikalfreisetzung gemessen. Möglicherweise wurde in diesen Stimulationen durch die hohe Konzentration an Pneumolysin der *oxidative burst* gehemmt oder die Nekrose Neutrophiler Granulozyten induziert, so daß sie nicht mehr zur Bildung der Sauerstoffradikale in der Lage waren.

3.1.2 Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken

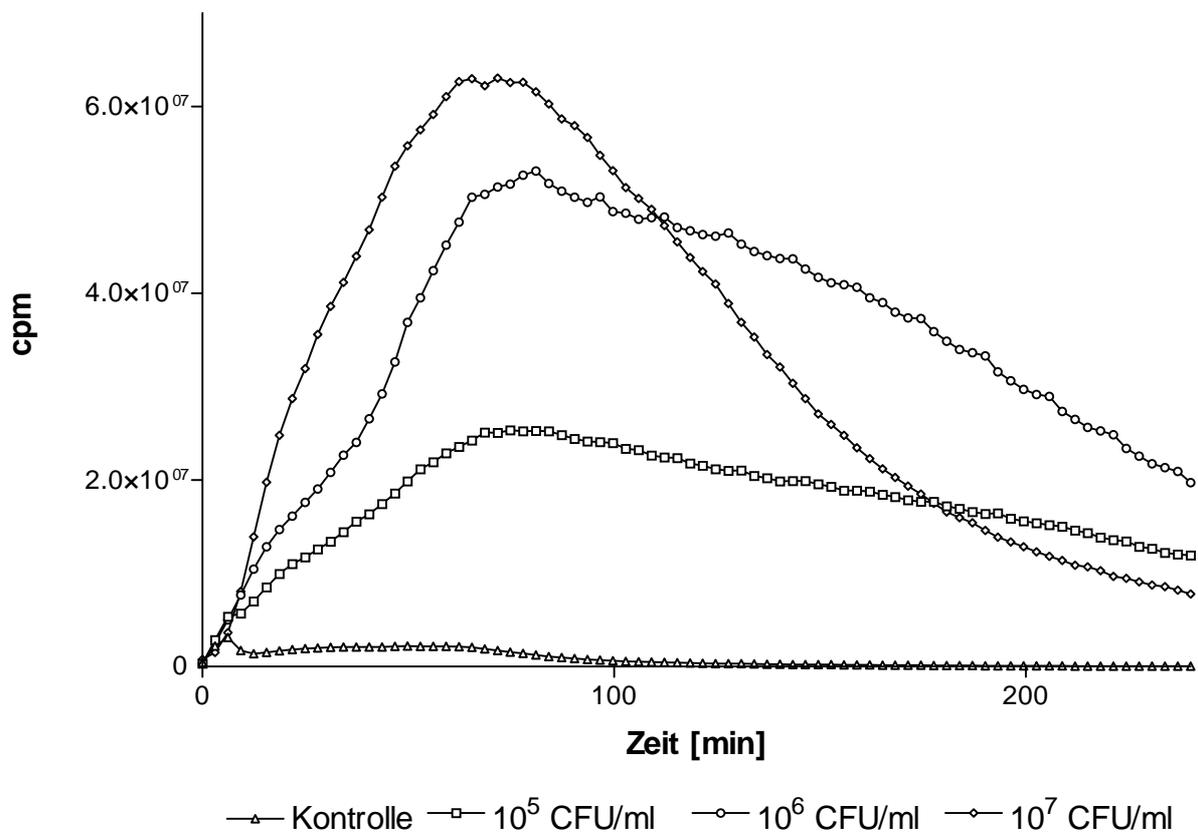


Abbildung 3.3: *Oxidative burst* der Neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken (10^5 CFU/ml, 10^6 CFU/ml, 10^7 CFU/ml)

Nach der Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Sauerstoffradikalfreisetzung zu beobachten (Abb. 3.3). Die Verhältnisse von Granulozyten zu Bakterien entsprachen denen bei stoffwechselaktiven Pneumokokken (10:1 bei 10^5 Bakterien/ml, 1:1 bei 10^6 /ml und 1:10 bei 10^7 /ml). Die Spitzenwerte wurden bereits nach 60 min erreicht - im Gegensatz zu 150 min bei Stimulation mit Stoffwechselaktiven. Der frühere Aktivitätshöhepunkt könnte durch die fehlende Inhibition des *oxidative burst* durch das hitzelabile Pneumolysin bedingt sein, da es bei der Inaktivierung der Bakterien denaturiert wird. Bei einer Bakterienkonzentration von 10^7 CFU/ml lag der Spitzenwert bei $6,3 \times 10^7$ cpm und damit ebenfalls um mehr als den Faktor 100 höher als derjenige bei unstimulierten Neutrophilen gemessene.

3.1.3 Stimulation mit aufgereinigten Zellwänden

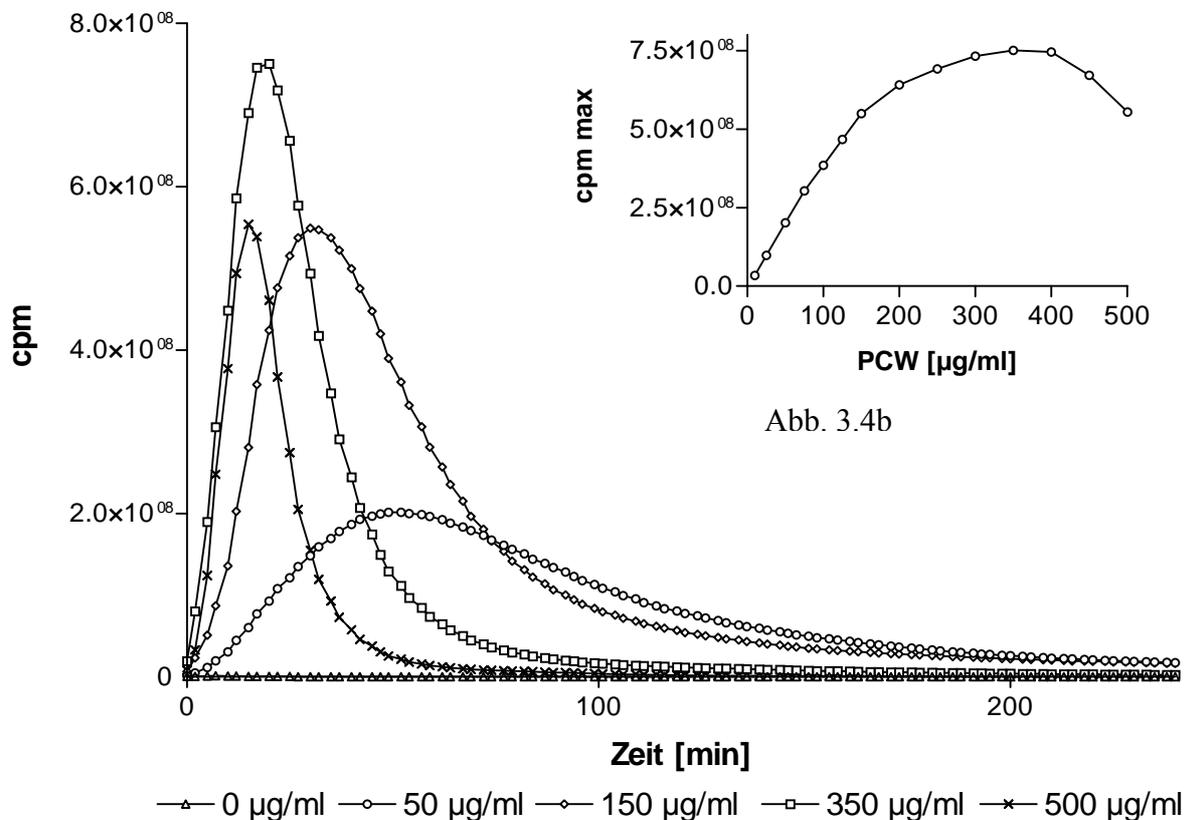


Abbildung 3.4a: *Oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit PCW unterschiedlichen Konzentrationen (0 µg-500 µg)

Abbildung 3.4b: Maximalwerte des *oxidative burst* in Abhängigkeit von der Konzentration des PCW

Nach Zugabe verschiedener Mengen opsonisierter, aufgereinigter Zellwand konnte bis 350 µg/ml eine konzentrationsabhängige Steigerung des *oxidative burst* beobachtet werden, bei höheren Konzentrationen jedoch fielen die Spitzenwerte wieder ab. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf den *scavenger*-Effekt zurückzuführen, d.h. in einer hochkonzentrierten Lösung werden Radikale abgefangen und entgehen somit der Erfassung durch die angewendete Messmethode. Je höher die Konzentration der eingesetzten Zellwände, desto früher kam es zur Freisetzung der Sauerstoffradikale (Abb. 3.4a, 3.4b). Eine Konzentration von 1µg/ml PCW entspricht etwa 10^5 Zelläquivalenten⁹⁶. Die maximal erreichbaren Werte durch Stimulation mit aufgereinigten Zellwänden übertrafen diejenigen, die durch Stimulation mit stoffwechselaktiven und hitzeinaktivierten Pneumkokken hervorgerufen werden konnten.

3.1.4 Einfluß der Opsonisierung auf den *oxidative burst*

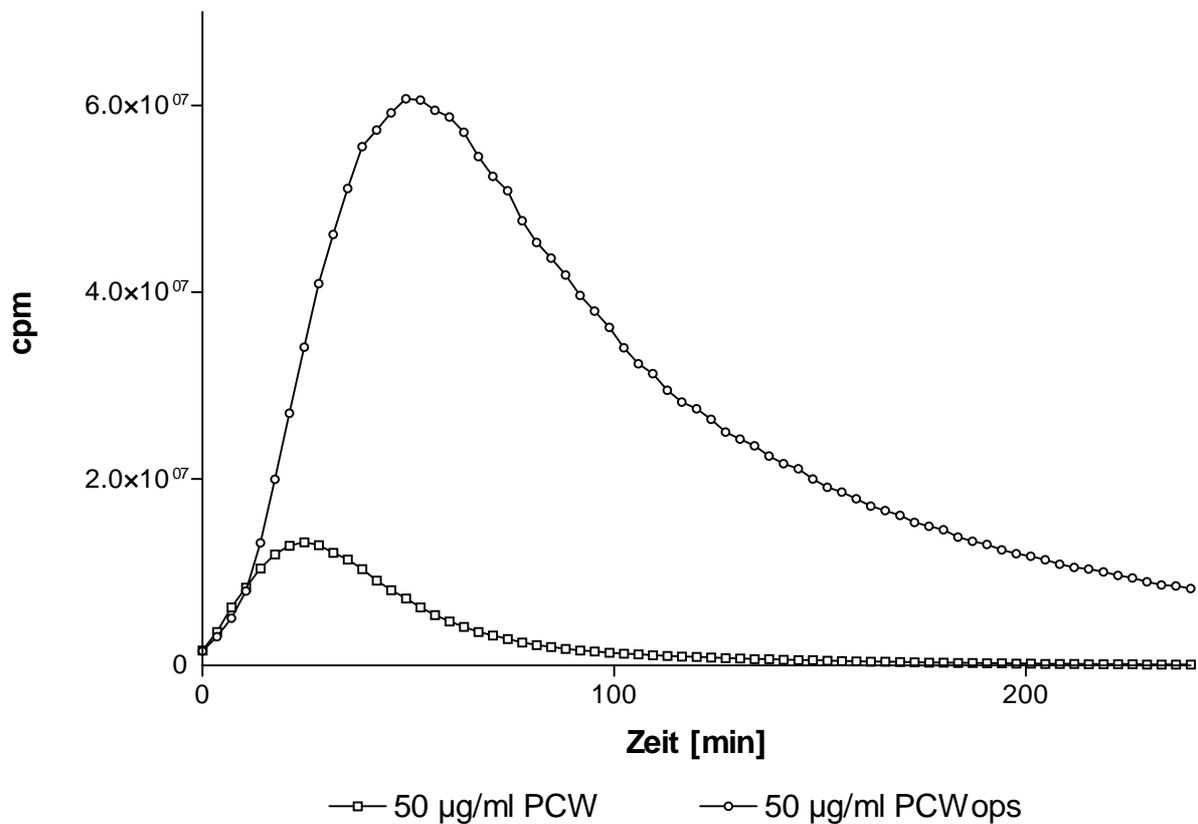


Abbildung 3.5: Auswirkung der Opsonisierung der PCW auf den *oxidative burst*

Durch die Opsonisierung der 50 µg/ml PCW mit autologem Serum wurde eine Steigerung des *oxidative burst* auf den ca. fünffachen Wert im Vergleich zum Ergebnis der Stimulation durch nicht opsonierte PCW erzielt. Bei opsonierten PCW lag dieser Wert bei manchen Messungen sogar höher als derjenige nach PMA-Stimulation, der als ein Maximalstimulus für Neutrophile Granulozyten angesehen wird.

3.1.5 Einfluß der Komplementinaktivierung auf die Opsonisierung

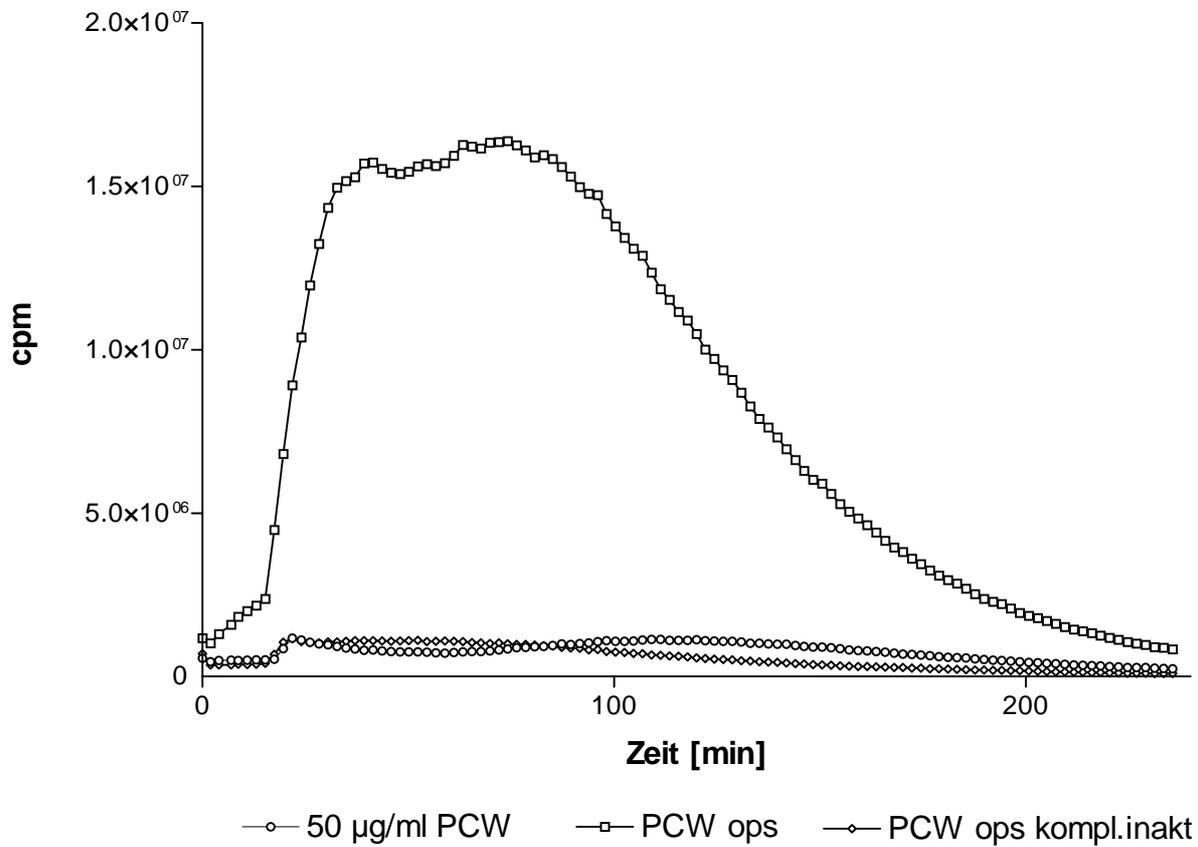


Abbildung 3.6: Auswirkung der Opsonisierung der PCW (50 µg/ml) mit komplementinaktiviertem Serum

Wurden die PCW mit autologem Serum inkubiert, in dem das Komplement zuvor inaktiviert worden war, kam es nicht zu der Steigerung der Reaktion im Vergleich zum Ausgangswert, wie es bei der Opsonisierung mit „aktivem“ Serum der Fall war. Die Radikalproduktion lag in dem gleichen Bereich wie die derjenigen Granulozyten, die mit nicht opsonisiertem PCW stimuliert wurden.

3.1.6 Zugabe von Anti-CD14 Antikörper

Bei Zellen, die 15 min mit 5 µg/ml monoklonalem Anti-CD14 vorinkubiert wurden, waren nach Stimulation mit PCW Werte für den *oxidative burst* messbar, die etwa ein Fünftel des Wertes ohne Antikörperzugabe betragen. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Antikörper mit den Granulozyten oder mit den Zellwänden vorinkubiert worden waren.

Die Variation der Antikörperkonzentration zeigte die Konzentrationsabhängigkeit dieser Hemmung. Im Verhältnis zum Höchstwert, der durch Stimulation mit 50µg/ml PCW hervorgerufen wurde, betragen die Werte bei Zugabe von 2,5 µg/ml Anti-CD14 25%, bei 5 µg/ml 18 % und bei 10 µg/ml 10 % (Abb. 3.7).

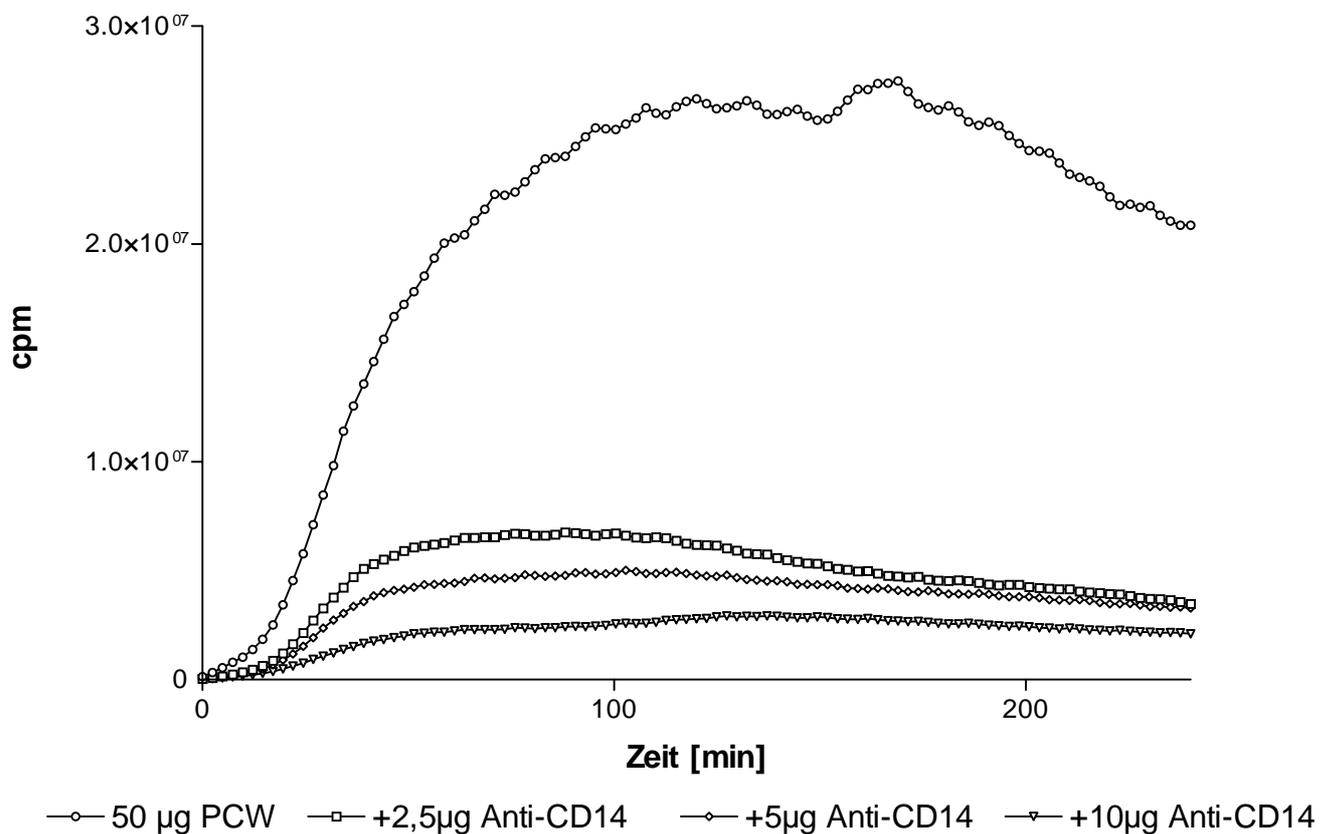


Abbildung 3.7: *Oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 50 µg/ml PCW sowie Stimulation mit PCW und Zugabe von Anti-CD14 Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen (2,5 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml)

3.1.7 Versuch des Nachweises der Spezifität von Anti-CD14 durch Zugabe weiterer Kontrollantikörper (Anti-CD13, -CD14, -CD63, -BSA)

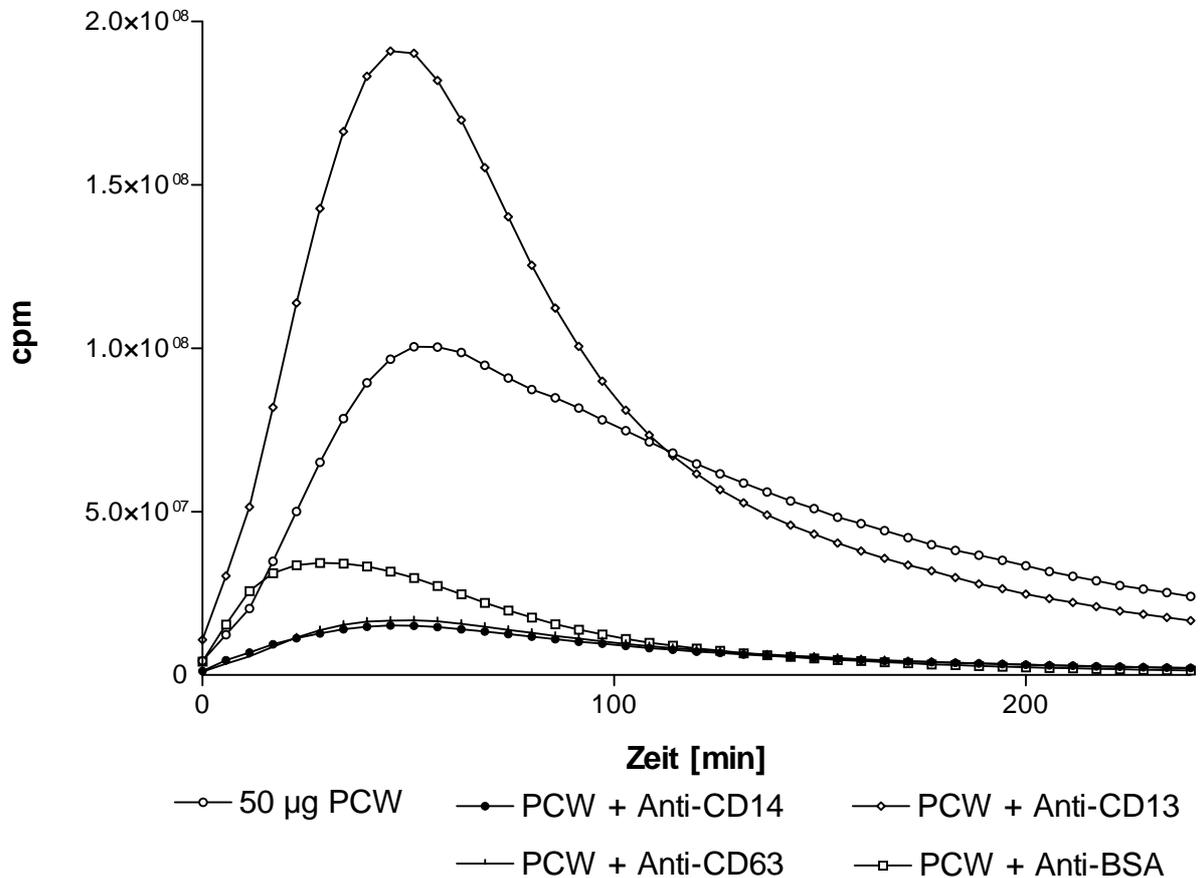


Abbildung 3.8: *Oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 50 µg/ml PCW sowie Stimulation mit 50 µg/ml PCW und Zugabe von Anti-CD14, Anti-CD13, Anti-CD63 und Anti-BSA (je 5µg/ml)

Die Reduktion der Radikalfreisetzung zeigte sich nicht nur nach Vorinkubation mit Anti-CD14 sondern auch mit Anti-CD63 und Anti-BSA, so daß von einer spezifischen Hemmung durch Anti-CD14 nichtausgegangen werden kann. Hingegen kam es nach Zugabe von Anti-CD13 zu einer Steigerung des *oxidative burst*. Diese Ergebnisse waren überraschend, da nach dem bisherigen Kenntnisstand nicht von einer Interferenz mit der Phagozytenaktivierung durch diese Antikörper auszugehen war. Ursprünglich sollten diese Antikörper als Negativkontrolle verwendet werden.

CD63 kommt überwiegend auf Thrombozyten vor und wird durch Aktivierung der Thrombozyten von der lysosomalen Membran in die äußere Zellmembran verlagert. Es vermittelt unter anderem die Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten an aktiviertes

Endothel. CD13 wird auf Zellen der myelomonozytären Gruppe exprimiert. Es ist identisch mit Aminopeptidase N, einer Zink-bindenden Metalloprotease, die am Metabolismus regulatorischer Peptide in verschiedenen Zellarten beteiligt ist. Die erhöhte Radikalfreisetzung durch Anti-CD13 ist möglicherweise durch Querverbindung von Fc-Rezeptoren erklärbar.

3.2 Bestimmung Histon-assoziiierter DNA-Fragmente der Neutrophilen Granulozyten

Die Untersuchungen zur Apoptose von Neutrophilen Granulozyten erfolgten durch Erfassung der zellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmente mittels ELISA. Die Höhe der Extinktion ist dabei ein Maß für die Menge der in der jeweiligen Kultur aufgetretenen DNA-Fragmente. Die Messungen erfolgten über 8 Stunden, die nachfolgenden Ergebnisse sind Mittelwerte aus je 5 Versuchen. Den Stimulationen mit stoffwechelaktiven und hitzeinaktivierten Pneumokokken, sowie PCW und LPS wurde die Apoptoseinduktion in Neutrophilenkulturen ohne Stimulation gegenübergestellt.

3.2.1 Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken

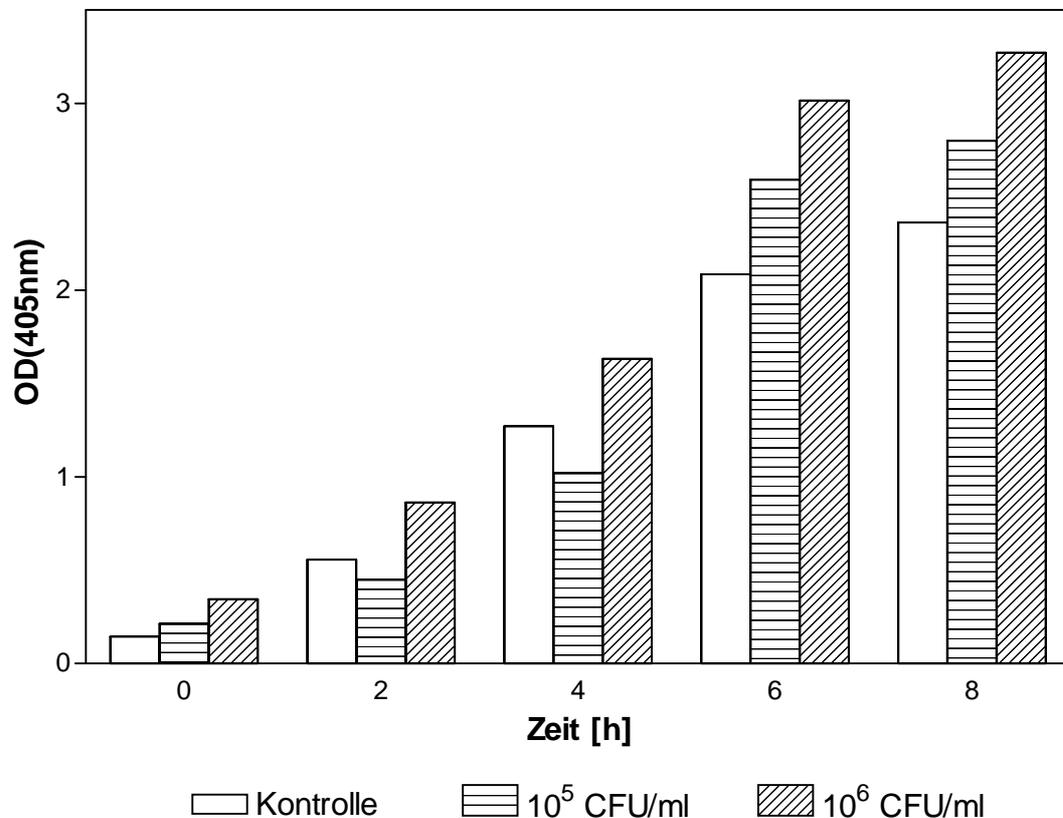


Abbildung 3.9: Apoptose Neutrophiler Granulozyten ohne Stimulation (Kontrolle) gegenüber Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken (10^5 CFU/ml und 10^6 CFU/ml)

Bereits zwei Stunden nach Ansetzen der Kulturen waren sowohl bei den mit stoffwechselaktiven Pneumokokken stimulierten als auch bei den nicht stimulierten Neutrophilen Granulozyten die ersten zellulären Histon-assoziierten DNA-Fragmente mittels ELISA erfassbar. Die Stimulation mit aktiven Bakterien (10^5 CFU/ml und 10^6 CFU/ml) führte zu früherem Auftreten der Histon-assoziierten DNA-Fragmente im Vergleich zu Unstimulierten (Abb 3.9). Stoffwechselaktive Pneumokokken in niedriger Konzentration sind somit in der Lage, die Apoptose Neutrophiler Granulozyten zu induzieren. Die scheinbare initiale Verzögerung des Einsetzens der Apoptose bei Stimulation mit 10^5 Pneumokokken/ml gegenüber Unstimulierten ist auf das Verhältnis von 10 Granulozyten zu 1 Bakterium zurückzuführen. In diesem Verhältnis sind die Pneumokokken zunächst nicht in der Lage, ihre volle apoptoseinduzierende Wirkung zu entfalten, so wie es bei dem Verhältnis 1:1 über die gesamte Zeit und im weiteren Verlauf auch in dem Verhältnis 10:1 der Fall ist. Bei

Stimulation mit 10^7 CFU/ml kam es zur Induktion von nekrotischem Zelltod, der durch diese Methode nicht erfasst wird (s. 3.3).

3.2.2 Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken

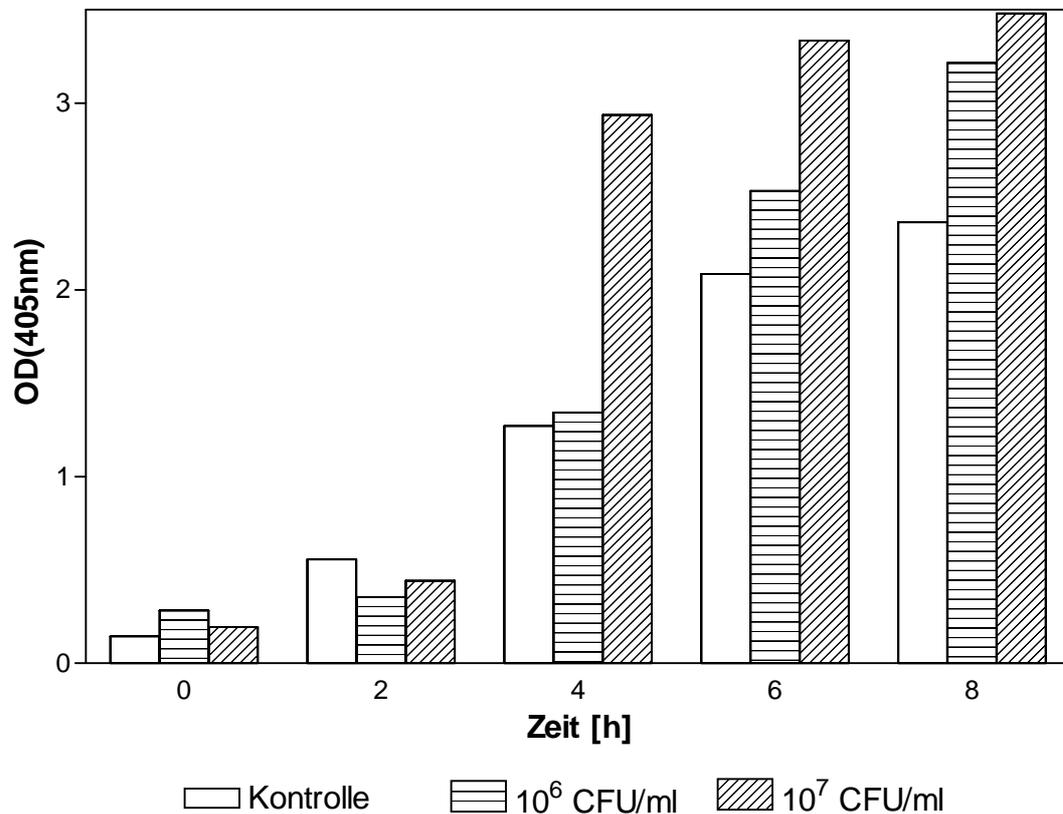


Abbildung 3.10: Apoptose Neutrophiler Granulozyten ohne Stimulation gegenüber Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken (10^6 und 10^7 CFU/ml)

Die Stimulation mit hitzeinaktivierten Pneumokokken hatte ein deutlich früheres Auftreten der apoptotischen Zeichen zufolge als bei Granulozyten, die nicht stimuliert wurden (Abb. 3.10). Auch in der Konzentration 10^7 CFU/ml waren Histon-assoziierte DNA-Fragmente im Gegensatz zur Stimulation mit 10^7 CFU/ml aktiven Pneumokokken messbar. Damit erwiesen sich hitzeinaktivierte Pneumokokken als Induktoren der Apoptose in allen eingesetzten Konzentrationen.

3.2.3 Stimulation mit PCW bzw. LPS

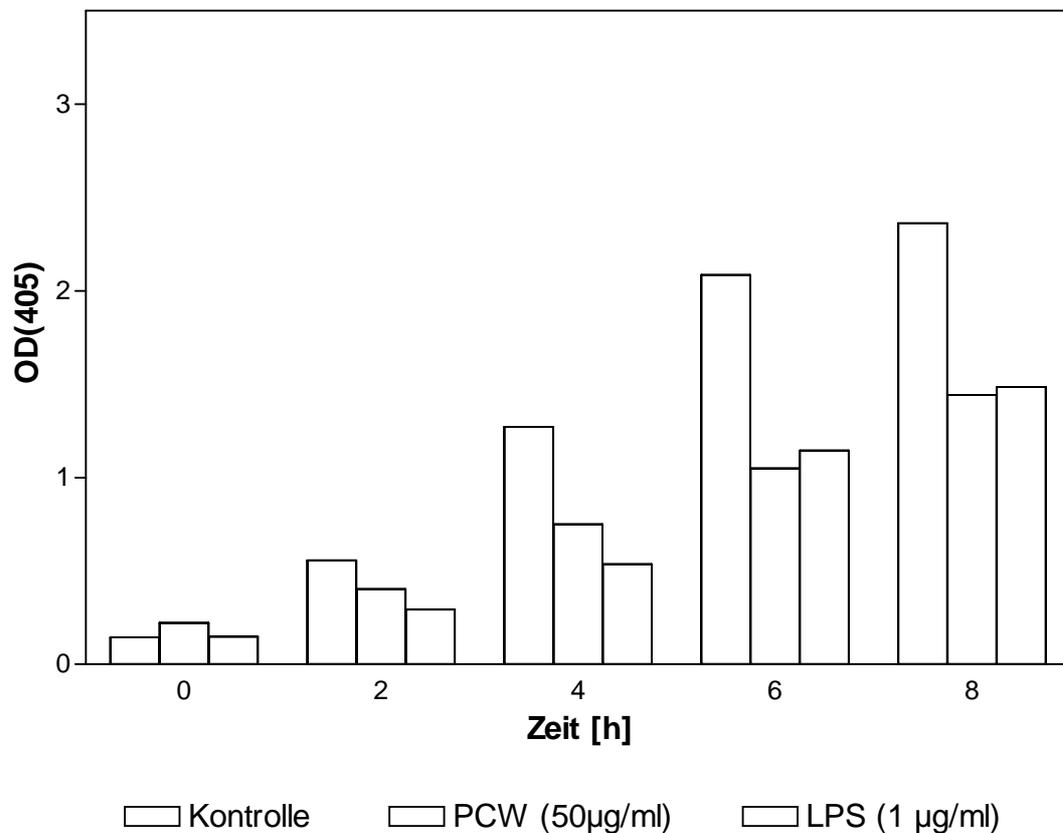


Abbildung 3.11: Apoptose der Neutrophilen Granulozyten nach Stimulation mit 50 µg/ml PCW und 1 µg/ml LPS im Vergleich zu Unstimulierten

Ein deutlich späteres Auftreten von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten gegenüber der Negativkontrolle resultierte aus der Stimulation der Neutrophilen mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwänden (PCW) in gleichem Maße wie mit LPS (Abb. 3.11). LPS gramnegativer Bakterien ist als Faktor mit verzögernder Wirkung auf die Apoptose Neutrophiler Granulozyten beschrieben¹⁰². Das verzögerte Auftreten apoptotischer Körperchen nach Stimulation mit PCW kann ebenfalls als Verzögerung der Apoptoseinduktion aufgefasst werden. Durchflußzytometrisch wurde jedoch nach Stimulation mit PCW ein erhöhter Anteil nekrotischer Neutrophiler Granulozyten gemessen. Somit kann das verminderte Auftreten Histon-assoziiierter DNA-Fragmente im vorliegenden Fall auch auf Induktion von Zelltod durch Nekrose zurückgeführt werden.

3.3 Differenzierung des Zelltodes

Mittels Durchflußzytometrie wurde zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod der Neutrophilen Granulozyten differenziert. In den folgenden Diagrammen ist die durch Propidiumjodid ausgelöste Signalintensität gegen die durch Annexin V-FITC ausgelöste aufgetragen.

Nach Präparation der Neutrophilen Granulozyten wurde die Färbung mit Annexin V und Propidiumjodid durchgeführt, um den Anteil der vitalen Zellen (linker unterer Quadrant) zu ermitteln. Er betrug zu diesem Zeitpunkt über 90%. Einige der Zellen ließen sich mit Propidiumjodid anfärben, waren also nekrotisch (9%, beide oberen Quadranten), und nur 1% zeigten eine positive Reaktion mit Annexin V. Bei diesen Zellen hatte die Apoptose bereits begonnen (rechter unterer Quadrant, Abb. 3.12 A).

Nach 19 Stunden *in vitro* Kultur ohne Stimulation wurde die Färbung erneut durchgeführt, um den Anteil abgestorbener Zellen in der Kultur zu bestimmen. Der Anteil der nekrotischen Neutrophilen Granulozyten war mit 12% etwas höher als unmittelbar nach der Präparation. Der Anteil apoptotischer Zellen war von 1% nach der Präparation auf 14% angestiegen, was für ein spontanes Einsetzen der Apoptose in der Granulozytenkultur spricht (Abb. 3.12 B).

In Kulturen, in denen die Neutrophilen Granulozyten mit stoffwechselaktiven Pneumokokken des Stammes D39 in der Konzentration 10^7 CFU/ml stimuliert wurden, kam es zu einer deutlich erhöhten Propidiumjodidaufnahme von 97%, was für eine Induktion nekrotischen Zelltodes spricht (Abb. 3.12 C).

Um den Einfluß der wichtigsten zytotoxischen Produkte der Pneumokokken – Pneumolysin⁷⁷, Wasserstoffperoxid^{17, 34} und Zellwandbestandteile (PCW)²⁴ - bei dieser Nekroseinduktion zu untersuchen, wurden die Neutrophilen Granulozyten zunächst mit einer Pneumolysin-negativen Mutante (D39*ply*::pJDC9) stimuliert. Die gleiche Stimulation wurde unter Zugabe von Katalase durchgeführt, um das Wasserstoffperoxid zu neutralisieren. Zusätzlich wurden die Neutrophilen Granulozyten mit PCW in einer Konzentration von 50 bis 200 µg/ml stimuliert.

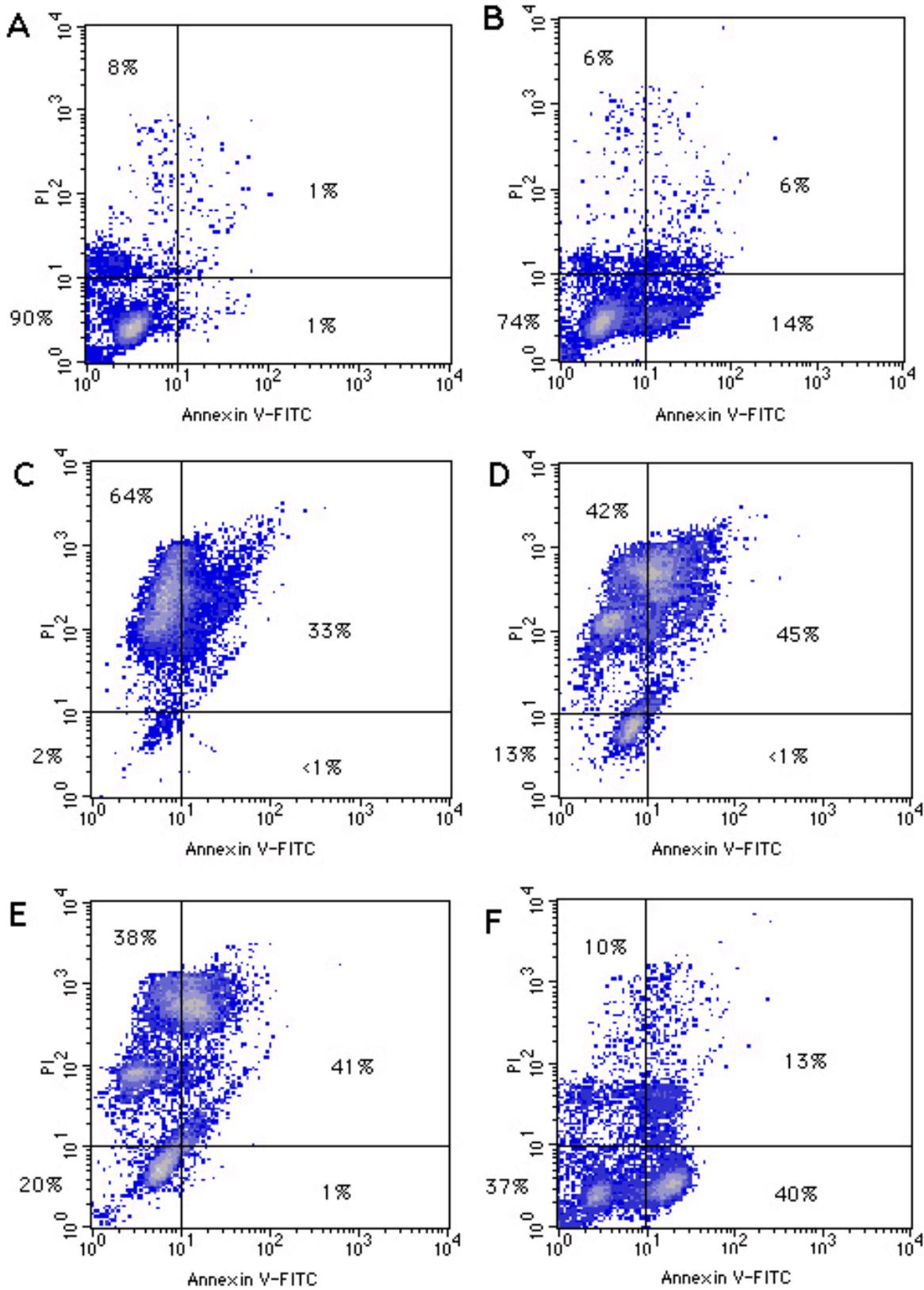


Abbildung 3.12: Durchflußzytometrische Analyse der Neutrophilenkulturen (s. Text)

Bei Stimulation mit dem Pneumolysin-negativem Stamm war der Anteil nekrotischer Granulozyten immer noch deutlich höher als in der Kultur ohne Stimulation, jedoch im Vergleich zu der Stimulation mit dem Stamm D39, bei der der Anteil vitaler Granulozyten nach 19 h nur 2% betrug, war eine Reduktion der Zytotoxizität feststellbar; nach 19 h Stimulation waren noch 13% der Zellen vital (Abb. 3.12 D).

Wurde zusätzlich zu den Pneumolysin-negativen Bakterien Katalase (2000 EU/ml) in die Kultur gegeben, stieg der Anteil der vitalen Neutrophilen Granulozyten nach 19 h auf 20% an (Abb. 3.12 E).

Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, daß sowohl das Toxin Pneumolysin als auch die Wasserstoffperoxidproduktion der Pneumokokken zu der Nekrose-induzierenden Wirkung auf Neutrophile Granulozyten beiträgt.

Während des Wachstums von Pneumokokken kommt es zur Autolyse. Dabei werden Zellwandbestandteile in die Umgebung freigesetzt, die ebenfalls zytotoxische Wirkung haben können. Aus diesem Grund wurden die Neutrophilen Granulozyten mit aufgereinigten Pneumokokkenzellwänden (PCW) in Konzentrationen von 50 bis 200 µg/ml stimuliert. Die Versuchsergebnisse differierten und waren nicht eindeutig. In einigen Versuchen war der Anteil nekrotischer Neutrophiler erhöht, der Anteil der apoptotischen Granulozyten lag in dem gleichen Bereich wie bei unstimulierten Kontrollkulturen.

Nach 19-stündiger Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit hitzeinaktivierten Pneumokokken des Stammes D39 in der Konzentration 10^7 CFU/ml waren 40% der Zellen mit Annexin V-FITC, nicht jedoch mit Propidiumjodid anfärbbar. Somit wurde bei diesen Zellen die einsetzende Apoptose nachgewiesen. (Abb. 3.12 F).

3.4 Färbung der Ausstriche

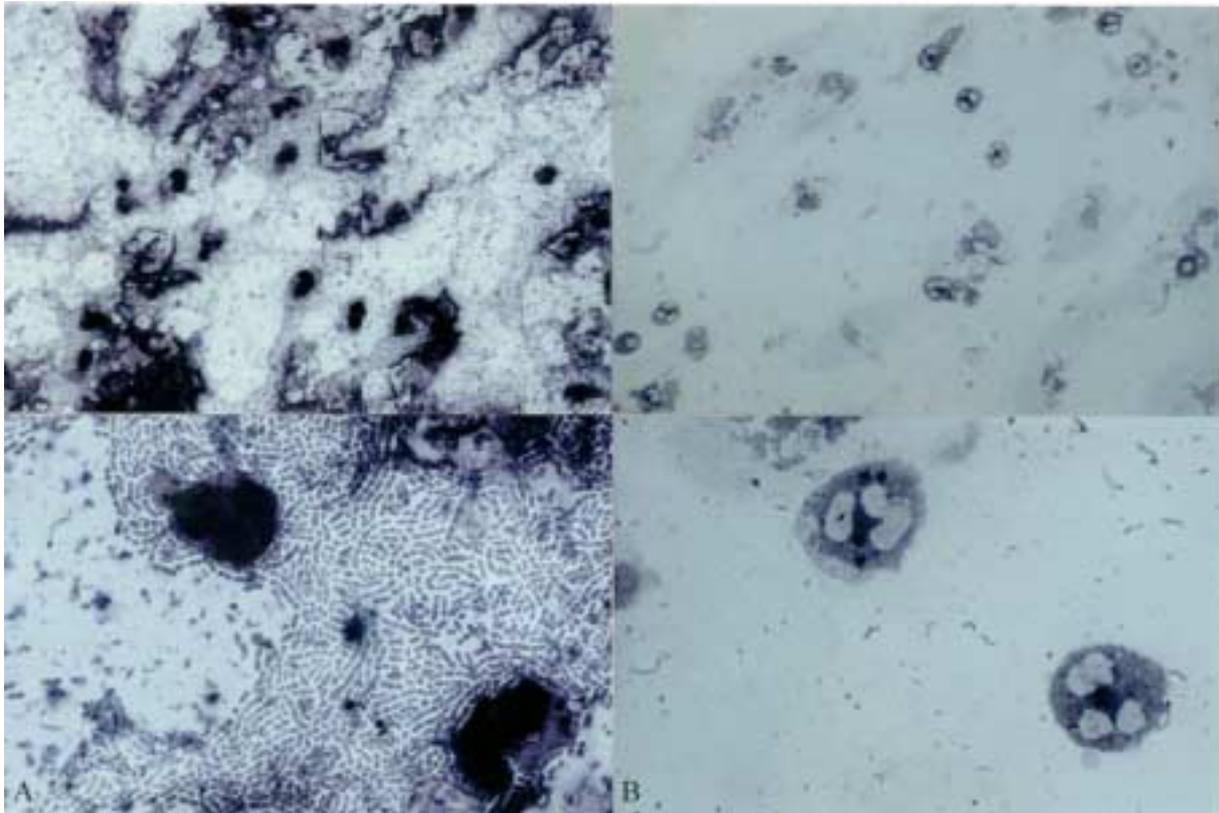


Abbildung 3.13: Färbung apoptotischer Kerne Neutrophiler Granulozyten durch die TUNEL-Methode (*TdT mediated dUTP-X Nick End Labeling*)

Die Induktion der Apoptose der Neutrophilen Granulozyten wurde mittels *in situ tailing* überprüft. Dabei werden modifizierte Nukleotide enzymatisch mittels TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) an die internukleosomalen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche (*nicks*) gebunden und so angefärbt. Auf diese Weise können Zellkerne mit solchen, für die Apoptose typischen, Strangbrüchen mikroskopisch dargestellt werden. Die Ausstriche wurden 24 h nach Ansetzen der Kulturen angefertigt. Zu diesem Zeitpunkt zeigten bei denjenigen Neutrophilen, die mit hitzeinaktivierten Pneumokokken (10^7 CFU/ml) stimuliert worden waren, alle Kerne eine positive Reaktion (dunkel gefärbte Zellkerne, Abb. 3.13 A, oben Vergrößerung ca. 300x, unten ca. 1200x), wohingegen nur wenige Neutrophile der Kontrollkultur durch die TUNEL-Methode angefärbte Kerne zeigten (Abb. 3.13 B, oben Vergr. ca. 300x, unten ca. 1200x). Die Stimulation der Neutrophilen mit PCW ergab nach 24 h das gleiche mikroskopische Bild wie die Kontrollkultur. Durch diese Methode wird im Gegensatz zum ELISA ein spätes Stadium der Apoptose erfaßt.

4 Diskussion

4.1 Freisetzung oxidativer Radikale durch Neutrophile Granulozyten

Die Aktivierung Neutrophiler Granulozyten geht mit einer gesteigerten Radikalfreisetzung, dem sogenannten *oxidative burst* einher. Neben zahlreichen Zytokinen sind Bakterienbestandteile in der Lage, Neutrophile Granulozyten in einen solchen aktivierten Zustand zu versetzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Neutrophile Granulozyten mit stoffwechselaktiven Pneumokokken, hitzeinaktivierten Pneumokokken und aufgereinigten Pneumokokkenzellwänden stimuliert. Es konnte gezeigt werden, daß es nach Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit hitzeinaktivierten Pneumokokken zu stärkerer und früherer Radikalproduktion kam, als dies nach Stimulation mit stoffwechselaktiven Pneumokokken der Fall war. Möglicherweise kann diese Beobachtung auf Pneumolysin, einen wichtigen Pathogenitätsfaktor der Pneumokokken, zurückgeführt werden. Pneumolysin hemmt den *oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten und hat diverse andere inhibitorische Effekte auf die Aktivität von Granulozyten und Monozyten. So hemmt es ebenfalls die Degranulation und damit die Freisetzung von Lysozym, die Chemotaxis und die ungerichtete Migration^{58, 61, 77}. Pneumolysin ist ein hitzelabiles Toxin, daß durch die Hitzeinaktivierung der Pneumokokken denaturiert wird. Aus diesem Grund entfällt sowohl der hemmende Effekt auf den *oxidative burst*, als auch die Nekrose-induzierende Wirkung bei Stimulation mit inaktivierten Bakterien im Gegensatz zur Stimulation durch Stoffwechselaktive.

Perry et al.^{64, 65} beschreiben ebenfalls einen Faktor, der von vitalen Pneumokokken gebildet wird und den *oxidative burst* der Neutrophilen Granulozyten inhibiert oder die gebildeten Radikale abfängt. Sie sind allerdings der Ansicht, daß dieser Faktor nicht mit Pneumolysin identisch ist, da mit einem Pneumolysin-negativen Pneumokokkenstamm die gleichen Versuchsergebnisse reproduziert werden konnten und da Antipneumolysin-Serum nicht in der Lage war, den inhibitorischen Effekt aufzuheben. Es handelt sich aber auch um einen

hitzelabilen Faktor, somit wäre die Erklärung, daß durch die Hitzeinaktivierung der Pneumokokken dieser Faktor ausgeschaltet wird, ebenfalls zutreffend.

Eine andere mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, daß bei der Hitzeinaktivierung die Bakterienzellen zum Teil aufgebrochen werden, so daß die Neutrophilen Granulozyten auch mit subzellulären Zellwandbestandteilen stimuliert werden.

Die Stimulation der Neutrophilen Granulozyten durch aufgereinigte Pneumokokkenzellwände führte ebenfalls zu der Auslösung eines starken *oxidative burst*. Die Freisetzung oxidativer Radikale war nach Zugabe von aufgereinigten Pneumokokkenzellwänden stärker als die maximale durch Zugabe von stoffwechselaktiven Pneumokokken auslösbare Radikalproduktion.

Die aufgereinigten Zellwandfragmente setzen sich aus Peptidoglykanen, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren zusammen, wobei nach Ansicht von Martinez-Martinez⁵¹ den Peptidoglykanen die größte Rolle als Stimulanzen der Neutrophilen Granulozyten zukommt. Stuertz et al.⁹² hingegen sind der Auffassung, daß Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren die potentesten proinflammatorischen Bestandteile der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* darstellen. In Versuchen von Tuomanen et al.⁹⁶ haben sich sowohl Peptidoglykan als auch Teichonsäuren in Konzentrationen von mehr als 10^5 Zelläquivalenten/ml als Auslöser einer Entzündungsreaktion erwiesen. Im Gegensatz dazu war die spezifische inflammatorische Aktivität der Polysaccharidkapsel 1000-fach geringer.

Die eigenen Versuchsergebnisse decken sich mit der Veröffentlichung von Martinez-Martinez et al.⁵¹, nach der sowohl intakte Bakterien der Spezies *Staphylococcus epidermidis* als auch deren Zellwandbestandteile den *oxidative burst* bei Neutrophilen auslösen. Dabei war ebenfalls die durch aufgereinigte Zellwände bzw. Peptidoglykane ausgelöste Radikalfreisetzung stärker und setzte früher ein als die durch aktive Bakterien ausgelöste.

Nach einer Ultraschallbehandlung der Peptidoglykane lösten sie den *oxidative burst* nicht mehr aus. Aus dieser Beobachtung haben die Autoren gefolgert, daß die Zellwandbestandteile über eine Minimalgröße oder eine bestimmte Tertiärstruktur verfügen müssen, um Neutrophile Granulozyten metabolisch aktivieren zu können.

4.2 Die Rolle des CD14-Rezeptors

Der CD14-Oberflächenrezeptor auf Neutrophilen Granulozyten und Monozyten vermittelt die Wirkungen des Endotoxins gramnegativer Bakterien, des Lipopolysaccharids (LPS). LBP, das LPS-bindende Protein, wird als Kofaktor bei der Zellaktivierung durch LPS über den CD14-Rezeptor benötigt. Für das LPS gramnegativer Bakterien sind diese Zusammenhänge detailliert beschrieben worden⁸².

Ob der CD14-Rezeptor allerdings bei der Infektion mit grampositiven Bakterien eine Rolle bei der Zellaktivierung durch Bestandteile der grampositiven Zellwand spielt, wird kontrovers diskutiert.

Nach Ergebnissen von Heumann et al.³³ kam es durch Blockierung des CD14-Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern nicht zur Hemmung der durch grampositive Zellwände ausgelösten monozytären TNF- α Produktion. Mathison et al.⁵³ haben gezeigt, daß LBP, welches als Kofaktor für die Bindung an CD14 erforderlich ist, die Wirkungen von LPS auf Makrophagen verstärkt, jedoch auf die Wirkungen von hitzeinaktivierten Staphylokokken und deren Peptidoglykan keinen Einfluß hat. Beide Beobachtungen sprechen gegen eine Beteiligung des CD14-Rezeptors bei der Vermittlung der durch grampositive Zellwände ausgelösten Effekte.

Dahingegen konnten Weidemann et al.^{104, 105} feststellen, daß nach Blockade des CD14-Rezeptors mit Anti-CD14 Antikörper die durch lösliche Peptidoglykane ausgelöste Zytokinproduktion gehemmt wird, was für eine Beteiligung des Rezeptors spricht. Pugin et al.⁶⁷ sind zu dem Ergebnis gekommen, daß bei einer Aktivierung von Makrophagen durch Zellwandkomponenten gramnegativer sowie grampositiver Bakterien und Mykobakterien der CD14-Rezeptor beteiligt ist und bezeichnen ihn als polyspezifisch für mikrobielle Strukturen.

Die scheinbaren Widersprüche zwischen den Ergebnissen könnten durch die Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Spezifität erklärt werden. Der von Heumann et al. eingesetzte monoklonale Anti-CD14 MY4 erkennt möglicherweise ein anderes Epitop des Rezeptorproteins, das für die Bindung der Peptidoglykane nicht wesentlich ist, als der von Weidemann et al. verwendete monoklonale Anti-CD14 MEM-18 Antikörper. Auch wurden

unterschiedliche Mengen der grampositiven Zellwand eingesetzt (bei Heumann 1-10µg/ml, bei Weidemann 300 ng/ml), so daß eine CD14-Beteiligung von der Konzentration der Zellwandkomponenten abhängig sein könnte.

Dziarski et al.^{18, 19} haben mit verschiedenen Methoden nachgewiesen, daß bakterielle Peptidoglykane an den CD14-Rezeptor binden und daß LPS und Peptidoglykane sich in dieser Bindung kompetitiv inhibieren. Der monoklonale Antikörper Anti-CD14 MEM-18 inhibiert sowohl die Bindung von LPS als auch Peptidoglykane an den Rezeptor, andere CD14 mAk hemmen hauptsächlich die Bindung von LPS und haben geringen oder keinen Einfluß auf die Bindung von Peptidoglykanen an CD14. Der mAk Anti-CD14 Leu M-3 hingegen hat nur einen hemmenden Effekt auf die Bindung von Peptidoglykanen an CD14, nicht jedoch auf die Bindung von LPS. Aus diesen Beobachtungen folgern sie, daß CD14 teildentische Bindungsstellen für LPS und Peptidoglykane hat und daß die Bindung unter Konformationsänderung des Rezeptorproteins geschieht.

Eine weitere Arbeit⁹⁷, in der verschiedene Anti-CD14 mAk eingesetzt wurden, ergab ebenfalls eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit der Monozytenaktivierung durch grampositive Bakterien: Anti-CD14 mAb 18E12 inhibierte die TNF und IL-10 Produktion sowohl durch LPS als auch durch hitzeinaktivierte *Streptococcus pneumoniae*, Anti-CD14 MY-4 hatte zwar einen hemmenden Einfluß auf die durch LPS stimulierte Zytokinfreisetzung, nicht jedoch auf die durch *S. pneumoniae* bzw. ihrer PCW ausgelöste. Die Autoren gehen von verschiedenen Bindungsstellen für grampositive Bakterienzellwände und den MY-4 mAk auf dem CD14-Rezeptor aus. Sie postulieren eine Therapieoption septischer Infektionen mit Anti-CD14 mAk anstatt mit Anti-Zytokin mAk.

Eine Koexistenz CD14-abhängiger und -unabhängiger Mechanismen bei der Aktivierung von Monozyten durch grampositive Bakterien beschreiben Cauwels et al.⁹. In ihren Experimenten konnte Anti-CD14 die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch aufgereinigte Pneumokokkenzellwände sowie LPS hemmen, es hatte aber keinen Einfluß auf die durch ganze Pneumokokken ausgelöste Zytokinproduktion. Sie räumen jedoch neben der Möglichkeit eines CD14-unabhängigen Mechanismus auch die Möglichkeit ein, daß die Effekte ganzer Bakterienzellen durch ein anderes Epitop des CD14-Rezeptormoleküls vermittelt werden, welches durch den Anti-CD14 MY-4 nicht erkannt wird.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich eine Blockierung des durch grampositive PCW ausgelösten *oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten nach Zugabe monoklonaler Anti-CD14 Antikörper. Da jedoch die Zugabe von monoklonalen Antikörpern, die an diesem Prozeß unbeteiligt sein sollten, ähnliche Wirkung wie das Anti-CD-14 zur Folge hatten, handelt es sich bei diesem Effekt möglicherweise um eine unspezifische Hemmung, deren Erklärung noch aussteht.

Deshalb konnte die Beteiligung des CD14-Rezeptors bei der durch grampositive Zellwände ausgelösten Radikalfreisetzung mit den durchgeführten Versuchen weder bestätigt noch widerlegt werden.

4.3 Beeinflussung der Apoptose Neutrophiler Granulozyten

Die Auswirkung gramnegativer Bakterien und ihrer Zellwände auf die Apoptose Neutrophiler Granulozyten ist weitgehend erforscht, dies gilt jedoch nicht für die Effekte grampositiver Bakterien bei diesem Prozess.

Die Stimulation von Neutrophilen Granulozyten durch hitzeinaktivierte *E. coli* führt zur Induktion der Apoptose. Wird vor der Stimulation die Phagozytosefähigkeit der Neutrophilen Granulozyten gehemmt, so bleibt diese Induktion aus, wodurch belegt wird, daß diese Wirkung der Bakterien nur nach deren Ingestion durch die Leukozyten entfaltet werden kann¹⁰¹.

Eine Stimulation mit LPS, dem als Endotoxin wirkenden Zellwandbestandteil von *E. coli*, hat den gegenteiligen Effekt. Sie führt zu einem verzögerten Einsetzen der apoptotischen Vorgänge. Werden Granulozyten mit inaktivierten *E. coli* und LPS gleichzeitig stimuliert, so wird die Apoptose ebenfalls induziert, was darauf hindeutet, daß *E. coli* bei der Beeinflussung der Apoptose den stärkeren Stimulus der beiden darstellt¹⁰¹. Ein weiteres gramnegatives Bakterium, *Haemophilus somnus*, ist ebenfalls in der Lage, die Apoptose der Neutrophilen zu induzieren¹¹⁰.

In den eigenen Versuchen wurden die Neutrophilen Granulozyten mit stoffwechselaktiven Pneumokokken, einer Pneumolysin-negative Mutante, unter Neutralisierung des Wasserstoffperoxids durch Katalase, mit hitzeinaktivierten Pneumokokken und mit aufgereinigten Zellwänden (PCW) stimuliert.

Dabei erwiesen sich hitzeinaktivierte Pneumokokken als Induktoren der Apoptose Neutrophiler Granulozyten, stoffwechselaktive Pneumokokken in der gleichen Konzentration induzierten Nekrose. In niedrigeren Konzentrationen konnte jedoch auch apoptotischer Zelltod beobachtet werden, was für eine Abhängigkeit des Effekts von der Intensität des Stimulus spricht. Ähnlich verhält es sich auch bei der Stimulation Neutrophiler Granulozyten mit *E. Coli*⁵⁴.

Bei dem Nekrose-auslösenden Effekt durch stoffwechselaktive Pneumokokken spielen Pneumolysin und bakterielles Wasserstoffperoxid eine wichtige Rolle. Die Stimulation mit Pneumolysin-negativen Pneumokokken resultierte in einer höheren Überlebensrate der

Neutrophilen Granulozyten. Noch höhere Überlebensraten konnten durch zusätzliche Neutralisierung des bakteriellen Wasserstoffperoxids durch Katalase erzielt werden.

Da bei hitzeinaktivierten Pneumokokken weder Pneumolysin freigesetzt, noch Wasserstoffperoxid produziert wird, fehlt auch die Nekrose-auslösende Wirkung, jedoch kommt es zur Induktion der Apoptose.

Bakterienzellwände werden in der Autolysephase während des Wachstums in die Umgebung freigesetzt und verfügen ebenfalls über zytotoxisches Potential^{91, 92}. Da Pneumolysin und Wasserstoffperoxid bei der Apoptoseinduktion durch hitzeinaktivierte Pneumokokken nicht als Auslöser in Frage kommen, wurden die Neutrophilen Granulozyten auch mit PCW stimuliert.

PCW hatten im Gegensatz zum LPS keine eindeutig verzögernde Wirkung auf die Apoptose. In den durchflußzytometrischen Experimenten konnte sowohl Apoptose als auch Nekrose der Neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Der Anteil apoptotischer Zellen war dabei vergleichbar demjenigen in Zellkulturen ohne Stimulation. Diese Beobachtung wurde bereits von Leblebicioglu et al.⁴² beschrieben. Die zusätzlich induzierte Nekrose könnte auf die Wirkung der PCW zurückgeführt werden. Die im Apoptose-ELISA vermindert aufgetretenen Histon-assoziierten DNA-Fragmente können zum einen als verzögert einsetzende Apoptose oder als bereits abgelaufene Nekrose interpretiert werden. In Verbindung mit den Ergebnissen der durchflußzytometrischen Experimente erscheint die eingetretene Nekrose als die wahrscheinlichere Erklärung.

In vivo wird Apoptose als diejenige Form des Zelltodes angesehen, die zur Terminierung einer Entzündungsreaktion beiträgt. Sobald es nach Abtötung der Bakterien zur Phagozytose durch Neutrophile Granulozyten gekommen ist, haben diese ihre Aufgabe erfüllt und können von dem Ort des akuten Entzündungsgeschehens beseitigt werden. Durch die Aufnahme der getöteten Bakterien wird die Apoptose induziert, weshalb auch die experimentelle Stimulation der Neutrophilen mit hitzeinaktivierten Bakterienzellen zu einer Induktion der Apoptose führt. Die apoptotischen Körperchen werden dann durch Makrophagen erkannt und aufgenommen^{60, 81}. Auf diese Weise wird vermieden, daß die zugrundegehenden Granulozyten einen weiteren proinflammatorischen Effekt ausüben, denn die Freisetzung von Enzymen mit

gewebsschädigendem Potential (Elastase, Myeloperoxydase) wird bei apoptotischem Zelltod im Gegensatz zur Nekrose verhindert⁶⁰.

In dem Liquor von Patienten mit bakterieller Meningitis ist ein Anteil von bis zu 40% an Neutrophilen in Apoptose beschrieben worden. In einem Tiermodell für bakterielle Meningitis hat der Anteil apoptotischer Neutrophiler Granulozyten 8 h nach Beginn der Behandlung mit einem β -Lactam-Antibiotika seinen Höhepunkt erreicht⁶⁰. Diese Ergebnisse belegen, daß abgetötete Pneumokokken, sowie die Freisetzung von zytotoxischen Pneumokokkenprodukten die Neutrophilenapoptose in vivo auslösen.

4.4 Zusammenhang zwischen Radikalproduktion und Apoptose

Die Stellung der Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) bei der Induktion der Apoptose ist noch nicht endgültig geklärt.

Viele chemische und physikalische Reize, die zur Induktion der Apoptose führen sind Oxidantien oder lösen ebenfalls den *oxidative burst* aus, so z.B. ionisierende oder Bestrahlung mit UV-Licht⁸. Auch das Zytokin TNF- α , ein potenter Stimulator des *oxidative burst*, führt zur Einleitung der Apoptose^{40, 55}. Diese Ergebnisse deuten auf eine Rolle der ROS als Mediatoren der Apoptose hin⁴⁷. Allerdings sind ROS auch in der Lage, einen nekrotischen Zelluntergang auszulösen, abhängig von der eingesetzten Konzentration der ROS. In sehr hohen Konzentrationen ist der Schaden an den zellulären Strukturen so groß, daß das apoptotische Programm nicht mehr ordnungsgemäß ablaufen kann, was zur Nekrose der Zelle führt^{7, 21}. Diese Konzentrationsabhängigkeit der Art, wie die Zellen zugrundegehen, gilt für andere Stimulantien, die den Zelluntergang auslösen, in gleicher Weise^{45, 86}.

Umgekehrt sind viele Inhibitoren der Apoptose Antioxidantien oder Stoffe, die die Produktion der Antioxidantien verstärken, so z.B. Glutathion, N-Acetylcystein, Vitamin E-Analoga und das Bcl-2 Protein^{8, 21, 35, 86}. Die als Metallchelatoren wirkenden Dithiocarbamate sind ebenfalls in der Lage, die Bildung apoptotischer Körperchen zu reduzieren⁹⁸. Allerdings gibt es auch Studien, in denen Radikalfänger, wie z.B. DMSO, Vitamin E oder Thioharnstoff keine Hemmung der Apoptose zur Folge hatten^{40, 55}.

Gemäß Watson et al.¹⁰² sind ebenfalls sauerstoffradikalabhängige Mechanismen bei der Induktion der Apoptose beteiligt: Nach Phagozytose hitzeinaktivierter *E. coli* durch Neutrophile Granulozyten wurde ein der Apoptose vorausgehender konzentrationsabhängiger *oxidative burst* gemessen, der nach Zugabe von Antioxidantien (DMSO, GSH, NAC) vermindert war. Die apoptoseinduzierende Wirkung der *E. coli* war damit ebenfalls deutlich vermindert. Die eingesetzten Antioxidantien hatten jedoch weder Einfluß auf die Phagozytose noch auf die spontan ablaufende Apoptose der Neutrophilen.

Das Produkt des Protoonkogens *bcl-2* verzögert die Apoptose. Es ist in der Lage, in diversen in vitro und in vivo Systemen die Apoptose zu inhibieren^{86, 107}, was für eine gemeinsame Endstrecke im Auslösemechanismus unterschiedlicher Reize spricht. Hockenbery et al.³⁵

haben gezeigt, daß das Bcl-2-Protein die durch Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose verhindern kann und gefolgert, daß es eine antioxidative Wirkung besitzt. Die sonst beobachtete und zum Zelltod führende Peroxidation der Membranlipide blieb unter dem Einfluß von Bcl-2 aus. Für die Wirkung als Antioxidans spricht auch, daß das Bcl-2-Protein an den Stellen der ROS-Produktion der Zellen lokalisiert werden kann:

1. an den Mitochondrien, wo ROS aus der Atmungskette anfallen,
2. am endoplasmatischem Retikulum, dem Sitz des Zytochrom P-450 Systems und
3. an der Kernmembran.

Kane et al.³⁶ konnten zeigen, daß Bcl-2 in Nervenzelllinien mit entleerten Glutathionreserven nicht nur die vorzeitige Apoptose, sondern auch die Nekrose verhindern kann, indem es die zelluläre ROS-Konzentration herabsetzt. Dies kann durch eine direkte Radikalfängerfunktion des Bcl-2 oder durch einen Eingriff in die Produktion der Radikale, beispielsweise als Inhibitor des Elektronentransports von den Komplexen I bis III zum Sauerstoff in der inneren Mitochondrienmembran, erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Hemmung des Kalziumeinstroms in die Zelle durch Bcl-2 dar, denn Ca^{++} -Ionen sind für den Ablauf apoptotischer Prozesse erforderlich⁸⁶.

Als mögliche Mechanismen der Apoptoseauslösung durch freie Radikale kommen nach Schädigung der DNA durch ROS die dadurch hervorgerufene Aktivierung der Poly-ADP-Ribose Transferase einerseits und eine Akkumulation von p53 andererseits in Frage. Im ersten Fall kommt es nach Polymerisation von ADP-Ribose zu einer Entleerung der zellulären NAD/NADH-Speicher und ATP-Vorräte und damit zum Zelluntergang^{8, 40}.

Auch die Oxidation von vielfach ungesättigten Zellmembranlipiden und Cholesterol durch die ROS, deren Akkumulation ebenfalls zur Apoptose führen kann, kommt als Mechanismus in Betracht. Besonders hervorzuheben ist dabei die in Bildung von oxygenierten Arachidonsäurederivaten (HPETE), die als potente Induktoren der Apoptose gelten und deren Beteiligung an der durch TNF ausgelösten Apoptose wahrscheinlich ist^{78, 79}. HPETE führen zu einem erhöhten intrazellulären Kalziumspiegel und können somit zur Aktivierung der kalziumabhängigen Endonuclease beitragen^{8, 55}. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Aktivierung bestimmter Gene durch die ROS, die die Apoptose in Gang setzen^{8, 102}.

Forrest et al.²¹ sind aufgrund der zeitlich verzögerten Auftretens der Apoptose nach Exposition gegenüber Oxidantien ebenfalls der Ansicht, daß nicht die direkte Schädigung der DNA die Apoptose auslöst, sondern daß vielmehr eine Kaskade von Reaktionen in Gang

gesetzt wird, an dem ein Anstieg des intrazellulären Kalziumspiegels beteiligt sein könnte, die die Aktivierung einer Endonuklease mit der daraus resultierenden Apoptose zur Folge hat.

In den eigenen Versuchen erreichte nach Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit hitzeinaktivierten Pneumokokken der *oxidative burst* seinen Peak nach einer Stunde.

Die gleiche Stimulation führte zu einer Induktion der Apoptose. Mit etwa vier bis fünfstündiger Verzögerung zum *oxidative burst* traten signifikante Mengen an Histon-assoziierten DNA-Fragmenten auf, die die Einleitung der Apoptose anzeigten.

Die Inkubation der Neutrophilen Granulozyten mit PCW erwies sich ebenfalls als starker Stimulus für den *oxidative burst*, der bereits nach 30-50 min (je nach eingesetzter Konzentration) sein Maximum erreichte. Dieses betrug ein Vielfaches der bei unstimulierten Neutrophilen Granulozyten gemessenen Werte. Anders als bei Stimulation mit Pneumokokken führten PCW der gleichen Präparation im Apoptose-ELISA jedoch zu nicht zu einer Induktion der Apoptose im Vergleich zu unstimulierten Neutrophilen.

Dieses Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, daß unter den untersuchten Bedingungen eine erhöhte Sauerstoffradikalfreisetzung nicht zwangsläufig die Apoptoseinduktion zur Folge hat.

Gegen die Hypothese der Apoptoseinduktion durch ROS sprechen ebenfalls Untersuchungen von Muschel et al.⁵⁷ mit dem Ergebnis, daß Apoptose auch unter sauerstoffarmen Bedingungen stattfindet. Sie schließen eine Beteiligung der ROS zwar nicht aus, denn in Kultur mit 95% Sauerstoff zeigten alle untersuchten Zellarten apoptotische Zeichen, jedoch stimmten sie nicht mit Hockenberry³⁵ und Kane³⁶ überein, die der Auffassung sind, daß ROS eine gemeinsame Endstrecke bei der Apoptoseeinleitung durch diverse Stimulanzen bilden, weil bei Reduktion des Sauerstoffgehalts in der Kultur auf 0,16% bei einer bestimmten Zellart immer noch Anzeichen der Apoptose festzustellen waren, obwohl die Konzentration der ROS nachweislich deutlich reduziert war.

Sie halten es außerdem für unwahrscheinlich, daß Bcl-2 als Radikalfänger funktioniert, sondern vertreten vielmehr die Ansicht, daß es über Beeinflussung eines anderen Mediators seine Apoptose-hemmende Wirkung ausübt. In Frage kommen hierbei Änderungen der zellulären Kalziumströme, Hemmung der Funktionen des p53 und Funktion des Bcl-2 als Signaltransduktionsprotein.

5 Zusammenfassung

- Vitale und hitzeinaktivierte Pneumokokken, sowie aufgereinigte Pneumokokkenzellwände induzieren den *oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten
- Hitzeinaktivierte Pneumokokken sind stärkere Induktoren des *oxidative burst*, möglicherweise durch Fehlen der inhibitorischen Wirkung des Pneumolysins oder aufgrund der Nekrose-Induktion durch vitale Pneumokokken
- Ob der CD14-Rezeptors bei der Induktion des *oxidative burst* Neutrophiler Granulozyten durch Komponenten grampositiver Bakterien eine bedeutende Rolle spielt, konnte durch die durchgeführten Versuche weder bestätigt noch widerlegt werden
- Vitale Pneumokokken in hoher Konzentration (10^7 CFU/ml) induzieren die Nekrose Neutrophiler Granulozyten durch Pneumolysin und Wasserstoffperoxid und begünstigen somit die Aufrechterhaltung und Ausbreitung einer Entzündungsreaktion
- Inaktivierte Pneumokokken (10^5 bis 10^7 CFU/ml) und vitale Pneumokokken in niedriger Konzentration (10^5 bis 10^6 CFU/ml) induzieren die Apoptose Neutrophiler Granulozyten und tragen zur Terminierung der Entzündungsreaktion bei
- Aufgereinigte Pneumokokkenzellwände verzögern einerseits die Apoptoseinduktion, andererseits scheinen sie die Nekrose der Zellen zu begünstigen
- Ob durch eine bestimmte Stimulation Apoptose oder Nekrose induziert wird, scheint weniger von der Art des Stimulus als vielmehr von seiner Konzentration abhängig zu sein

6 Literaturverzeichnis

1. Andonegui G, Trevani AS, Lopez DH, Raiden S, Giordano M, Geffner JR. Inhibition of human neutrophil apoptosis by platelets. *J.Immunol.* 1997;158:3372-3377.
2. Antal SP, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J, Van KK. Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J.Leukoc.Biol.* 1997;61:721-728.
3. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am.J.Pathol.* 1990;136:593-608.
4. Baran J, Guzik K, Hryniewicz W, Ernst M, Flad HD, Pryjma J. Apoptosis of monocytes and prolonged survival of granulocytes as a result of phagocytosis of bacteria. *Infect.Immun.* 1996;64:4242-4248.
5. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett-CC J. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor. *J.Trauma.* 1996;40:575-578.
6. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J.Biol.Chem.* 1992;267:23301-23308.
7. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92:7162-7166.
8. Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol.Today* 1994;15:7-10.
9. Cauwels A, Wan E, Leismann M, Tuomanen E. Coexistence of CD14-dependent and independent pathways for stimulation of human monocytes by gram-positive bacteria. *Infect.Immun.* 1997;65:3255-3260.

10. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-2020.
11. Cox G, Gauldie J, Jordana M. Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in vitro. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1992;7:507-513.
12. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils. Separation of survival and activation outcomes. *J.Immunol.* 1995;154:4719-4725.
13. Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;12:232-237.
14. Cox G. IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *Am.J.Physiol.* 1996;271:L566-L571
15. de Jonge B, Chang YS, Gage D, Tomasz A. Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *J.Biol.Chem.* 1992;267:11248-11254.
16. Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 1995;85:3264-3273.
17. Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect.Immun.* 1993;61:4392-4397.
18. Dziarski R. Peptidoglycan and lipopolysaccharide bind to the same binding site on lymphocytes. *J.Biol.Chem.* 1991;266:4719-4725.
19. Dziarski R, Tapping RI, Tobias PS. Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J.Biol.Chem.* 1998;273:8680-8690.

20. Fenoll A, Martin BC, Munoz R, Vicioso D, Casal J. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979-1989. *Rev.Infect.Dis.* 1991;13:56-60.
21. Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, Robinson DH, Ramakrishnan N. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. *Free Radic.Biol.Med.* 1994;16:675-684.
22. Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive.Care Med.* 1995;21:277-285.
23. Gasmi L, McLennan AG, Edwards SW. The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil: platelet interactions during inflammation. *Blood* 1996;87:3442-3449.
24. Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E. The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect.Immun.* 1993;61:1538-1543.
25. Gemsa D, Kalden JR, Resch K. *Immunologie Grundlagen, Klinik, Praxis.* Georg Thieme Verlag, 1997
26. Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 1996;88:3176-3184.
27. Girard D, Paquin R, Beaulieu AD. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem.J.* 1997;325:147-153.
28. Gon S, Gatanaga T, Sendo F. Involvement of two types of TNF receptor in TNF-alpha induced neutrophil apoptosis. *Microbiol.Immunol.* 1996;40:463-465.

29. Hachiya O, Takeda Y, Miyata H, Watanabe H, Yamashita T, Sendo F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol.Immunol.* 1995;39:715-723.
30. Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol.Microbiol.* 1997;25:1113-1124.
31. Haslett C, Lee A, Savill JS, Meagher L, Whyte MK. Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators. *Chest* 1991;99:6S
32. Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond.B.Biol.Sci.* 1994;345:327-333.
33. Heumann D, Barras C, Severin A, Glauser MP, Tomasz A. Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect.Immun.* 1994;62:2715-2721.
34. Hirst RA, Sikand KS, Rutman A, Mitchell TJ, Andrew PW, O'Callaghan C. Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect.Immun.* 2000;68:1557-1562.
35. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.
36. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 1993;262:1274-1277.
37. Kato T, Takeda Y, Nakada T, Sendo F. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat.Immun.* 1995;14:198-208.

38. Kettritz R, Gaido ML, Haller H, Luft FC, Jennette CJ, Falk RJ. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int.* 1998;53:84-91.
39. Kucharzik T, Lugering N, Weigelt H, Adolf M, Domschke W, Stoll R. Immunoregulatory properties of IL-13 in patients with inflammatory bowel disease; comparison with IL-4 and IL-10. *Clin.Exp.Immunol.* 1996;104:483-490.
40. Larrick JW, Wright SC. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* 1990;4:3215-3223.
41. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991;65:859-873.
42. Leblebicioglu B, Walters J. Alkaline conditions accelerate polymorphonuclear leukocyte apoptosis in vitro. *Infect.Immun.* 1999;67:2019-2021.
43. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J.Leukoc.Biol.* 1993;54:283-288.
44. Lee A, Haslett C. Human monocyte-conditioned medium inhibits neutrophil apoptosis in vitro. *Biochem.Soc.Trans.* 1994;22:254S
45. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 1991;24:203-214.
46. Leuenroth S, Lee C, Grutkoski P, Keeping H, Simms HH. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. *Surgery* 1998;124:409-417.
47. Li PF, Dietz R, von HR. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett.* 1997;404:249-252.

48. Lloyd AR, Oppenheim JJ. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol.Today* 1992;13:169-172.
49. Lo SK, Lee S, Ramos RA, Lobb R, Rosa M, Chi RG, Wright SD. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha m beta 2) on human neutrophils. *J.Exp.Med.* 1991;173:1493-1500.
50. Lowe SW, Ruley HE, Jacks T, Housman DE. p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* 1993;74:957-967.
51. Martinez-Martinez L., Timmerman CP, Fleer A, Verhoef J. Chemiluminescence of human polymorphonuclear leucocytes after stimulation with whole cells and cell-wall components of *Staphylococcus epidermidis*. *J.Med.Microbiol.* 1993;39:196-203.
52. Marton A, Gulyas M, Munoz R, Tomasz A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J.Infect.Dis.* 1991;163:542-548.
53. Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, Ulevitch RJ. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J.Immunol.* 1992;149:200-206.
54. Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Lin MT, Han I, Furukawa S, Ikeda S, Muto T. Ratio of bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines PMN fate. *Shock* 1999;12:365-372.
55. Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987;62:153-155.
56. Mulligan MS, Warner RL, Foreback JL, Shanley TP, Ward PA. Protective effects of IL-4, IL-10, IL-12, and IL-13 in IgG immune complex-induced lung injury: role of endogenous IL-12. *J.Immunol.* 1997;159:3483-3489.

57. Muschel RJ, Bernhard EJ, Garza L, McKenna WG, Koch CJ. Induction of apoptosis at different oxygen tensions: evidence that oxygen radicals do not mediate apoptotic signaling. *Cancer Res.* 1995;55:995-998.
58. Nandoskar M, Ferrante A, Bates EJ, Hurst N, Paton JC. Inhibition of human monocyte respiratory burst, degranulation, phospholipid methylation and bactericidal activity by pneumolysin. *Immunology* 1986;59:515-520.
59. Nau R, Zysk G, Prange H. Erregerspektrum, Klinik und Therapie bakterieller Infektionen des Zentralnervensystems. *Nervenheilkunde* 1993;12:187-192.
60. Nau R, Zettl U, Gerber J, Trostdorf F, Michel U, Bottcher T, Schmidt H, Adler S, Bruck W. Granulocytes in the subarachnoid space of humans and rabbits with bacterial meningitis undergo apoptosis and are eliminated by macrophages. *Acta Neuropathol.Berl.* 1998;96:472-480.
61. Paton JC, Ferrante A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect.Immun.* 1983;41:1212-1216.
62. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu.Rev.Microbiol.* 1993;47:89-115.
63. Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, Djeu JY. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur.J.Immunol.* 1994;24:440-444.
64. Perry FE, Elson CJ, Greenham LW, Catterall JR. Interference with the oxidative response of neutrophils by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 1993;48:364-369.
65. Perry FE, Elson CJ, Mitchell TJ, Andrew PW, Catterall JR. Characterisation of an oxidative response inhibitor produced by *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 1994;49:676-683.

-
66. Powell LJ. C-reactive protein--a review. *Am.J.Med.Technol.* 1979;45:138-142.
67. Pugin J, Heumann ID, Tomasz A, Kravchenko VV, Akamatsu Y, Nishijima M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1994;1:509-516.
68. Quagliariello VJ, Wispelwey B, Long-WJ J, Scheld WM. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. *J.Clin.Invest.* 1991;87:1360-1366.
69. Ramilo O, Saez LX, Mertsola J, Jafari H, Olsen KD, Hansen EJ, Yoshinaga M, Ohkawara S, Nariuchi H, McCracken-GH J. Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J.Exp.Med.* 1990;172:497-507.
70. Reichmann P, Varon E, Gunther E, Reinert RR, Luttiken R, Marton A, Geslin P, Wagner J, Hakenbeck R. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Germany: genetic relationship to clones from other European countries. *J.Med.Microbiol.* 1995;43:377-385.
71. Reinert RR, Queck A, Kaufhold A, Kresken M, Lutticken R. Antibiotic sensitivity of *Streptococcus pneumoniae* isolated from normally sterile body sites: first results of a multicenter study in Germany. *Infection* 1994;22:113-114.
72. Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, Schlapbach R, Schweizer M, Suter M, Walter P, Yaffee M. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;1271:67-74.
73. Riede UN, Schäfer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, 1995
74. Ring A, Novak R, Schmitz FJ, Heinz HP. Klassische und aktuelle Aspekte zur Meningitis purulenta. *Nervenarzt.* 1996;67:630-638.

75. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Georg Thieme Verlag, 1995
76. Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. Mol.Microbiol. 1997;25:819-829.
77. Rubins JB, Janoff EN. Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. J.Lab.Clin.Med. 1998;131:21-27.
78. Sandstrom PA, Tebbey PW, Van CS, Buttke TM. Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. J.Biol.Chem. 1994;269:798-801.
79. Sandstrom PA, Pardi D, Tebbey PW, Dudek RW, Terrian DM, Folks TM, Buttke TM. Lipid hydroperoxide-induced apoptosis: lack of inhibition by Bcl-2 over-expression. FEBS Lett. 1995;365:66-70.
80. Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, Wolpe S, Sherry B, Cerami A, Tuomanen E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. J.Exp.Med. 1990;171:439-448.
81. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. J.Clin.Invest. 1989;83:865-875.
82. Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. Res.Immunol. 1992;143:11-15.
83. Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. J.Immunol. 1991;147:1522-1529.

84. Sendo F, Tsuchida H, Takeda Y, Gon S, Takei H, Kato T, Hachiya O, Watanabe H. Regulation of neutrophil apoptosis--its biological significance in inflammation and the immune response. *Hum.Cell* 1996;9:215-222.
85. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J.Immunol.* 1993;150:5501-5510.
86. Slater AF, Nobel CS, Orrenius S. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;1271:59-62.
87. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J.Leukoc.Biol.* 1994;56:672-686.
88. Smith RP, Lipworth BJ. C-reactive protein in simple community-acquired pneumonia. *Chest* 1995;107:1028-1031.
89. Spellerberg B, Tuomanen E. The pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Trends.Mol.Med.* 1994;26:411-418.
90. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-434.
91. Steinfort C, Wilson R, Mitchell T, Feldman C, Rutman A, Todd H, Sykes D, Walker J, Saunders K, Andrew PW, et al. Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect.Immun.* 1989;57:2006-2013.
92. Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mader M, Nau R. Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to beta-lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1998;42:277-281.
93. Takeda Y, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Saito S, Sendo F. Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int.Immunol.* 1993;5:691-694.
94. Timmerman CP, Mattsson E, Martinez ML, De GL, Van SJ, Verbrugh HA, Verhoef J, Flier A. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes

- by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect.Immun.* 1993;61:4167-4172.
95. Tunkel AR, Wispelwey B, Scheld WM. Bacterial meningitis: recent advances in pathophysiology and treatment. *Ann.Intern.Med.* 1990;112:610-623.
96. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *J.Infect.Dis.* 1985;151:859-868.
97. van Furth AM, Verhard SE, Langermans JA, van DJ, van FR. Anti-CD14 monoclonal antibodies inhibit the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 by human monocytes stimulated with killed and live *Haemophilus influenzae* or *Streptococcus pneumoniae* organisms. *Infect.Immun.* 1999;67:3714-3718.
98. Verhaegen S, McGowan AJ, Brophy AR, Fernandes RS, Cotter TG. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. *Biochem.Pharmacol.* 1995;50:1021-1029.
99. Verhoef J, Mattsson E. The role of cytokines in gram-positive bacterial shock. *Trends.Microbiol.* 1995;3:136-140.
100. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutlingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J.Immunol.Methods* 1995;184:39-51.
101. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Bouchier HD. Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock* 1996;5:47-51.
102. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condrón C, Bouchier HD. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J.Immunol.* 1996;156:3986-3992.

103. Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J.Immunol.* 1997;158:945-953.
104. Weidemann B, Brade H, Rietschel ET, Dziarski R, Bazil V, Kusumoto S, Flad HD, Ulmer AJ. Soluble peptidoglycan-induced monokine production can be blocked by anti-CD14 monoclonal antibodies and by lipid A partial structures. *Infect.Immun.* 1994;62:4709-4715.
105. Weidemann B, Schletter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer AJ. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyldipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect.Immun.* 1997;65:858-864.
106. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N.Engl.J.Med.* 1989;320:365-376.
107. Wood KA, Youle RJ. Apoptosis and free radicals. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1994;738:400-407.
108. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J.Clin.Invest.* 1998;101:311-320.
109. Yamamoto C, Yoshida S, Taniguchi H, Qin MH, Miyamoto H, Mizuguchi Y. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect.Immun.* 1993;61:1972-1979.
110. Yang YF, Sylte MJ, Czuprynski CJ. Apoptosis: a possible tactic of *Haemophilus somnus* for evasion of killing by bovine neutrophils? *Microb.Pathog.* 1998;24:351-359

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Levente Bejo
Wohnort: Liebigstr. 11
31135 Hildesheim
Tel.: 05121/703663

geboren: am 10.02.1972 in Győr, Ungarn
Staatsangehörigkeit: deutsch und ungarisch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08/1978 - 07/1980: Grundschule in Győr und Budapest, Ungarn
08/1980 - 07/1983: Grundschule in Duisburg
08/1983 - 06/1992: Abtei-Gymnasium in Duisburg
08/1989 - 02/1990: Juanita High School in Kirkland, WA, USA
06/1992: Abitur

Studium:

4/1993 – 11/1999 Medizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Examina:

03/1995: Ärztliche Vorprüfung
03/1996: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1996: USMLE Step 1
08/1998: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/1999: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit:

seit 06/00: Arzt im Praktikum in der Kinderklinik des
Städtischen Krankenhauses Hildesheim

Einfluß von *Streptococcus pneumoniae* auf den *oxidative burst* und den Zelltod von Neutrophilen Granulozyten

vorgelegt von Levente Bejo

Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung von Pneumokokken in vitaler und inaktiverter Form sowie Pneumokokkenzellwänden auf die Aktivität und den Zelltod humaner Neutrophiler Granulozyten untersucht. Als Aktivitätsparameter wurde die Sauerstoffradikalfreisetzung (*oxidative burst*) gemessen. Neutrophile Granulozyten wurden sowohl durch vitale und inaktivierte Pneumokokken, als auch durch aufgereinigte Pneumokokkenzellwände zu vermehrter Sauerstoffradikalfreisetzung angeregt. Bei Stimulation mit vitalen Pneumokokken fiel die Aktivierung schwächer aus, da hierbei wahrscheinlich der *oxidative burst* durch das bakterielle Toxin Pneumolysin gehemmt wurde. Pneumolysin wird bei der Inaktivierung der Bakterien denaturiert, so entfiel der hemmende Effekt bei Stimulation der Neutrophilen Granulozyten mit inaktivierten Pneumokokken.

Das Auftreten von apoptotischem Zelltod und Nekrose der Neutrophilen Granulozyten wurde mittels ELISA und Durchflußzytometrie erfasst und differenziert. Durch den ELISA wurden Histon-assoziierte DNA-Fragmente bestimmt, mittels Durchflußzytometrie konnte durch eine Färbung der Neutrophilen Granulozyten mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid der Zelltod quantifiziert werden. Zusätzlich wurden die Zellen nach *in situ tailing* mikroskopisch auf das Vorliegen von Apoptose untersucht. Vitale Pneumokokken in niedriger Konzentration (10^5 bis 10^6 CFU/ml) und hitzeinaktivierte Pneumokokken (10^5 bis 10^7 CFU/ml) induzierten die Apoptose Neutrophiler Granulozyten. Vitale Pneumokokken in höherer Konzentration (10^7 CFU/ml) lösten die Nekrose der Neutrophilen aus. Damit konnte gezeigt werden, daß Pneumokokken den Zelltod Neutrophiler Granulozyten induzieren. Es ist dabei abhängig von der Konzentration der Bakterien, ob Apoptose oder Nekrose ausgelöst wird. Durch Stimulation mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken und Neutralisierung des bakteriellen Wasserstoffperoxids mittels Katalase ist es gelungen, den Anteil vitaler Granulozyten nach 19-stündiger Kultur von 2 % auf 20 % zu erhöhen. An der Vermittlung zytotoxischer Effekte von Pneumokokken auf Neutrophile Granulozyten sind Pneumolysin und Wasserstoffperoxid demnach maßgeblich beteiligt.