UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Direktor der Einrichtung Univ.-Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Pneumokokken induzieren ein Ca²⁺-Signal in pulmonalen Endothelzellen *in vitro* und *in situ*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

> vorgelegt von: Anton Caspar Albrecht Hamburg

> > Hamburg 2014

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 17.12.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Rainer Kiefmann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Rainer Böger

Meiner Oma Ruth Beate Nilsson († 4. Oktober 2013)

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	4
2.	Einleitung	8
2.7	1. Pneumokokken	8
	2.1.1. Virulenzfaktoren	10
2.2	2. Calcium	15
	2.2.1. Calciumhomöostase	15
	2.2.2. Endoplasmatisches Retikulum	16
	2.2.3. Mitochondrium	17
	2.2.4. Extra- und intrazelluläre Ca ²⁺ -Homöostase	17
2.3	3. Fragestellung und Zielsetzung	20
3.	Materialien und Methodik	21
3.1	1. Materialien	21
	3.1.1. Allgemeine Reagenzien	21
	3.1.2. Allgemeine Geräte	21
3.2	2. Materialen für <i>in vitro</i> Versuche	23
	3.2.1. Reagenzien/Medikamente	23
	3.2.2. Lösungen	23
	3.2.3. Material	23
	3.2.4. Geräte	24
3.3	3. Materialien für Tierversuche	24
	3.3.1. Medikamente	24
	3.3.2. Lösungen	25
	3.3.3. Materialien	25
	3.3.4. Geräte	27

3.4.	Materialen für die Pneumokokkenkultivierung	29
3.4	4.1. Reagenzien/Medikamente	29
3.4	4.2. Materialien	29
3.4	4.3. Geräte	29
3.5.	Pneumokokken	
3.6.	Pneumolysin	30
3.7.	Bakterienkultur	
3.8.	Intrazelluläre Calciummessung mittels Fluoreszenzmikroskopie	31
3.8	3.1. Fura-2-AM	31
3.8	3.2. Kalibration	32
3.8	3.3. Software	32
3.9.	In vitro Mikroskopie von HPMEC	34
3.9	9.1. Kultivierung	34
3.9	9.2. Experimentelles Versuchsprotokoll	34
3.9	9.3. Mikroskopie	
3.9	9.4. Messparameter	40
3.10.	. In situ Mikroskopie von Endothelzellen subpleuraler kapillarer Vend	olen
	in der isoliert perfundierten Rattenlunge	41
3.1	10.1. Versuchstiere	41
3.1	10.2. Funktion und Aufbau des Perfusionssystems	41
3.1	10.3. Anästhesie und Beatmung	43
3.1	10.4. Hämodynamik	44
3.1	10.5. Mikrokatheterisierung	44
3.1	10.6. Experimentelles Versuchsprotokoll	45
3.1	10.7. Mikroskopie	47
3.1	10.8. Messparameter	47
3.11.	Statistik	

4.	Ergebniss	e					49
2	4.1. In vitro \	/ersuche an H	IPMEC				
	4.1.1. Effekt	einer Inkubat	ion mit Pr	eumokokke	en auf [Ca ²⁺]	zyt·····	
	4.1.2. Unters Virule	suchung nzfaktoren au	der f die [Ca ²⁻	Rolle [†]] _{max}	Pneumokok	ken-spezifischer	53
	4.1.3. Unters an Zel	suchung zur A llen einer Gru	nzahl rea	gibler Zelle	n anteilig an	der Gesamtzahl	54
	4.1.4. Unters Auftre	suchung zur ten des erstei	Latenz v n Ca ²⁺ -Siç	von Beginr gnals	n der Interv	rention bis zum	55
	4.1.5. Unters Versue	suchung zur	Frequenz	des Ca ²⁺ -	Signals übe	r die Dauer des	56
	4.1.6. Rolle des Pi	von extra- un neumokokker	d intrazell i-induziert	ulären Ca ²⁺ en Ca ²⁺ -Siç	-Speichern l gnals	bei der Induktion	57
2	4.2. <i>In situ</i> perfundi	Versuche erten Rattenlı	in subp Inge	leuralen E	Endothelzelle	en der isoliert	64
	4.2.1. Effekt	einer Inkubat	ion mit Pr	eumokokke	en auf [Ca ²⁺]	_{zyt} in situ	65
	4.2.2. Unters Virule	suchung nzfaktoren au	der f die [Ca ²⁻	Rolle] _{max} in situ.	Pneumokok	ken-spezifischer	66
	4.2.3. Unters von Ze	suchung zur A ellen einer Gr	unzahl rea uppe <i>in si</i>	gibler Zelle tu	n anteilig an	der Gesamtzahl	68
	4.2.4. Unters Auftre	suchung zur ten des erstei	Latenz N n Ca ²⁺ -Sig	von Beginr gnals <i>in situ</i>	n der Interv	rention bis zum	69
	4.2.5. Unters Versue	suchung zur chs <i>in situ</i>	Frequenz	des Ca ²⁺ -	Signals übe	r die Dauer des	70
5.	Diskussior	۱					71
Ę	5.1. Fluoresz	enzmessung	mittels Fu	ıra-2			71
	5.1.1. Isolier	t perfundierte	Rattenlur	nge			72
Ę	5.2. Pneumo pulmona	kokken induz ilen Endothelz	ieren ein zellen <i>in v</i>	zytosolisch itro	nes Ca ²⁺ -Sig	nal in humanen	73

5.2.1. Die Kapsel als Virulenzfaktor von Pneumokokken moduliert das	
Ca ²⁺ -Signal in Endothelzellen nicht	74
5.2.2. Das Pneumokokken-induzierte Ca ²⁺ -Signal ist PLY-abhängig	74
5.2.3. Die Bedeutung des Ca ²⁺ -Signals für die Zelle	76
5.2.4. Das Ca ²⁺ -Signal wird durch einen Ca ²⁺ -Einstrom von extrazellulär	
und dem Ausstrom aus intrazellulären Ca ²⁺ -Speichern generiert	78
5.2.5. Das Ca ²⁺ -Signal wird von der Endothelzelle aktiv generiert	82
5.3. Pneumokokken induzieren ein zytosolisches Ca ²⁺ -Signal in subpleuralen Endothelzellen der isolierten Rattenlunge	84
5.3.1. Die Erkenntnisse über das Ca ²⁺ -Signal in vitro sind auf subpleurale	
Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge übertragbar	85
5.3.2. Die Entdeckung des charakteristischen Ca ²⁺ -Signals in	
Endothelzellen eröffnet neue Perspektiven und Möglichkeiten für die	
Erforschung Pneumokokken-induzierter Erkrankungen	87
6. Zusammenfassung	
 Zusammenfassung	
 Zusammenfassung	90
 Zusammenfassung	90 92
 Zusammenfassung	90 92 . 103
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106 . 107
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106 . 107 hiert.
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106 . 107 hiert.
 Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106 . 107 hiert. hiert.
 6. Zusammenfassung	90 92 . 103 . 105 . 106 . 107 hiert. hiert.

2. Einleitung

2.1. Pneumokokken

Streptokokkus pneumoniae ist ein gram-positives Bakterium, welches typischerweise den Nasen-Rachenraum besiedelt. Im klinischen Alltag und auch in der Wissenschaft ist die entsprechende Kurzform "Pneumokokken" etabliert.

Im Jahr 2000 gab es 14,5 Millionen schwere Infektionen mit Pneumokokken bei unter 5-jährigen Kindern, und 826.000 Erkrankte verstarben an den Folgen der Infektion (O'Brien et al. 2009). Andere Schätzungen gehen davon aus, dass Pneumokokken jedes Jahr für 1,6 Millionen Todesfälle verantwortlich sind (Lynch et al. 2009). Da Impfstoffe nicht für alle Kapsel-Serotypen vorhanden sind und resistente Keime immer häufiger auftreten, stellen Infektionen mit Pneumokokken überall auf der Welt eine Herausforderung dar und werden dies auch in Zukunft tun.

Zu den Erkrankungen, welche durch Pneumokokken verursacht werden, zählen relativ harmlose Infektionen, welche mit existierenden adäquaten Therapien zuverlässig behandelt werden können, wie z.B. die Otitis media oder auch die Sinusitis. Aber auch bei schweren und lebensbedrohlichen Erkrankungen zählen Pneumokokken zum Erregerspektrum. Pneumokokken sind der häufigste Erreger ambulant erworbener Pneumonien in allen Altersgruppen und damit der wichtigste Auslöser der am häufigsten zum Tode führenden Infektionskrankheit in den Industrieländern (Höffken et al. 2009).

Besonders schwere Krankheitsbilder sind neben der Pneumonie z.B. die Meningitis und die Sepsis, für die Pneumokokken der häufigste gram-positive Erreger sind (Angus et al. 2013).

Die Pneumokokkensepsis wird durch Migration von Pneumokokken, von einem lokalen Infektionsherd ausgehend, durch die Invasion der Bakterien in das Blut verursacht. Die im Blutkreislauf zirkulierenden Erreger können dann metastatische Infektionen auslösen und systemisch zur akuten Sepsis führen. Auf diesem Wege können Pneumokokkeninfektionen neben einer isolierten Infektion der Lunge, welches die häufigste Eintrittspforte für systemische Pneumokokkeninfektionen ist (Angus et al. 2013), zu einem Lungenschaden im Rahmen einer invasiven Infektion

führen, zum Beispiel zur *acute lung injury* (ALI) oder dem *acute respiratory distress syndrom* (ARDS).

Für diese beiden schweren Erkrankungen gilt die Definition des American-European Concensus Conference Committee von 1994, in der zwischen dem Bild der ALI mit weniger schwerer Hypoxämie und dem ARDS mit entsprechend stärker ausgeprägter Hypoxämie unterschieden wird. Außerdem ist der Nachweis von beidseitig diffusen Infiltraten im Röntgenthoraxbild und zusätzlich ein pulmonalarterieller Druck (>18mmHg) bei gleichzeitig fehlendem klinischem Anhalt für einen linksatrialen Hypertonus für die Diagnose von Bedeutung (Murray et al. 1988). Die ALI sowie das ARDS sind akute Entzündungen, bei denen die epitheliale sowie die endotheliale Barrierefunktion eingeschränkt sind. Die alveolo-kapilläre Membran besteht aus den drei Schichten mikrovaskulärem Endothel, Interstitium und Alveolarepithel und trennt den luftgefüllten Alveolarraum vom Gefäßlumen. Pathologische Merkmale von ALI/ARDS sind die Zerstörung der alveolo-kapillären Membran, ausgeprägte transendotheliale Migration von neutrophilen Leukozyten sowie die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren (Matthay et al. 2005).

Eine intakte Endothelbarriere reguliert den Austausch von Flüssigkeiten, Proteinen und anderen gelösten Stoffen. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kann die Barriere, die durch Endothelzellen gebildet wird, dieser Aufgabe nicht mehr im vollen Maße nachkommen. Es tritt Flüssigkeit aus dem Gefäßlumen in das Parenchym und dann in das Lumen des Alveolus über, es entwickelt sich ein Lungenödem. Die eingeschränkte Barrierefunktion des Lungenendothels bzw. das Lungenödem sind von entscheidender prognostischer Bedeutung (Ware et al. 2000).

In dieser lebensbedrohlichen Phase einer Pneumokokkeninfektion fällt den Endothelzellen eine wichtige Schlüsselposition in mindestens zwei krankheitsdefinierenden Schritten zu. Das Bakterium muss bei dem Übertritt aus dem Alveolarraum in das Blut die Endothelbarriere passieren. Während der Zirkulation im Blutkreislauf kommt es außerdem zu weiteren Interaktionen mit den wandbildenden Endothelzellen des Gefäßsystems.

Wie wichtig die Erforschung und Behandlung der Pathomechanismen von Pneumokokkeninfektionen ist, wird deutlich anhand einer Studie von Austrian und Gold aus dem Jahr 1964 zur Sterblichkeit von Patienten mit Pneumokokkenbakteriämie (Austrian et al. 1964). Es wurde beobachtet, dass die

Sterblichkeit in den ersten fünf Tagen unabhängig davon blieb, ob mit Penicillin, Serum oder gar nicht therapiert wurde. Die Autoren schlussfolgerten, dass die antibiotische Therapie in der frühen Erkrankungsphase keinen oder nur einen Einfluss die Sterblichkeit hat. die geringen auf da Pathogene eine Entzündungsreaktion anstoßen, die, einmal begonnen, unabhängig von der Anwesenheit von Bakterien zu multiplem Organversagen und Tod führen kann. Darüber hinaus werden einige Pathogenitätsfaktoren sogar gerade durch die antibiotische Therapie und die damit verbundene Lyse von Pneumokokken freigesetzt (Spreer et al. 2003). Diese Studien machen deutlich, dass trotz einer Therapie bei leitliniengerechten antibiotischen Behandlung von schweren Pneumokokkeninfektionen schwerwiegende Komplikationen auftreten können. Das gesamte Krankheitsgeschehen muss verstanden werden, um eine gezielte Therapie zu entwickeln.

2.1.1. Virulenzfaktoren

Pneumokokken haben eine Reihe von Virulenzfaktoren, welche für die Pathogenität des Bakteriums verantwortlich sind. Innerhalb der Virulenzfaktoren scheinen die Kapsel und das Pneumolysin (PLY) für die Pathogenese von herausragender Bedeutung zu sein. Es existieren aber darüber hinaus eine große Anzahl verschiedener Mechanismen, die auf vielfältige Weise im Prozess der Besiedlung des Wirtes und der Infektion wirken.

Zu den Virulenzfaktoren zählen mehrere Proteasen wie z.B. die Neuraminidasen (NanA, NanB), die Immunoglobulin A-Protease und die Zink-Metalloproteinasen Zu den wichtigen Oberflächenproteinen zählt das PspA (ZmpB, ZmpC). alternativen (Pneumococcal surface proteins A), das den Weg der Komplementaktivierung inhibiert, sowie das PspC (*Pneumococcal surface protein C*) und das PavA (Pneumococcal adherence and virulence factor A), die beide für die Adhäsion an das Epithel von Bedeutung sind (Preston et al. 2008). Eine relativ neue Entdeckung ist die Ausbildung von Pili durch fast alle Pneumokokkenstämme, die ebenfalls zur Adhäsion an Epithelzellen des Wirtes dienen (Barocchi et al. 2006).

Die CBPs (cholin binding proteins) sind eine Reihe von Proteinen, die direkt an Cholin in der bakteriellen Zellwand binden. Zu dieser Gruppe gehören mehrere relevante hydrolytisch wirkende Proteine wie z.B. das Autolysin (LytA), durch das sich das Bakterium selbst auflösen kann.

Da Pneumokokken bei der dauerhaften Besiedlung des oberen Respirationstraktes mit anderen Erregern konkurrieren, bilden sie eine Reihe von Bacteriocinen (z.B. BlpM) und können mit ihrer Pyruvat-Oxidase (SpxB) Hydrogenperoxid bilden. Außerdem bilden Pneumokokken *hyaluronate lyase*, die sich in der Zellwand befindet und die extrazelluläre Matrix des Wirts zerstört.

2.1.1.1. Kapsel

Da es sich um gram-positive Bakterien handelt, verfügen Pneumokokken über eine dicke Mureinhülle. Außerdem ist das Bakterium von einer Kapsel geschützt. Diese besteht aus Polysacchariden und bietet eine sehr große Variabilität, durch die Pneumokokken in über 90 verschiedenen Subtypen eingeteilt werden können. Die Kapsel ist aus mehreren Gründen einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von Pneumokokken. Pneumokokkenmutanten, welche keine Kapsel besitzen, sind deutlich weniger virulent als der Wildtyp (WT) und können keine Pneumonie verursachen (Briles et al. 1992). Eine besonders große Rolle spielt die Kapsel bei der Opsonierung durch Proteine des Komplementsystems und durch Immunglobuline. So wurde bei Pneumokokken des Stammes D39 ohne Kapsel eine deutlich erhöhte Aktivität des Komplementsystems sowie eine vermehrte Phagozytose durch neutrophile Granulozyten im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Dies wurde sowohl über den klassischen Weg der Komplementaktivierung als auch über den alternativen Weg vermittelt (Hyams et al. 2010).

Auch eine direkte Beeinflussung von 322 verschiedenen Genen, die z.B. für verschiedene Interleukine kodieren, durch die Kapsel von Pneumokokken des Stammes D39 konnte an Detroit 562 Epithelzellen nachgewiesen werden (Bootsma et al. 2007).

Des Weiteren reduziert die Kapsel die mechanische Beseitigung der Pneumokokken durch das Epithel des Respirationstraktes selbst. Auch die Autolyse und die Exposition gegenüber Antibiotika werden durch die Kapsel beeinflusst (Mitchell et al. 2010). Sie vermindert die Adhäsion der Pneumokokken an die Oberflächenzellen des Wirts, was ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Infektion ist (Talbot et al. 1996). Es wird vermutet, dass mehrere zellwandständige Adhäsionsmoleküle effektiver binden können, wenn keine Kapsel vorhanden ist.

Die Signalkaskade, die durch den Kontakt einer Zelle mit der Kapsel ausgelöst wird, ist bisher nur in Teilen bekannt. Die Beeinflussung der Genexpression wird beispielsweise über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) vermittelt (Bootsma et al. 2007). Ein Einfluss auf die zytosolische Calciumkonzentration ([Ca²⁺]_{zyt}) wurde bisher nicht untersucht. Auch spezifische Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen der Pneumokokkenkapsel und Endothelzellen fehlen bisher.

Eine besonders große klinische Bedeutung hat die Kapsel als wichtigster Ansatzpunkt für bereits existierende und aktuell in der Entwicklung stehende Impfstoffe (Ortqvist et al. 2005). Gerade die große Anzahl verschiedener Kapsel-Serotypen und auch die stetige Veränderung der bereits bekannten Subtypen stellt dabei eine große Herausforderung dar.

2.1.1.2. Pneumolysin

PLY wird von allen klinischen Pneumokokkenstämmen exprimiert. Es ist ein 53kD großes Protein, das aus 471 Aminosäuren besteht und meist als Monomer vorliegt (Marriott et al. 2008). Das C-terminale Ende kann an Cholesterol in der Zellmembran binden und durch die Oligomerisierung von bis zu 80 Proteinen Poren in der eukaryotischen Wirtsmembran bilden (Johnson et al. 1980 und Tilley et al. 2005). Diese können einen Durchmesser von 30-35nm haben und sind im Elektronenmikroskop sichtbar (Rubins et al. 2011).

PLY liegt im Pneumokokkus intrazellulär im Zytosol vor und es wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass PLY nur durch die Lyse von Pneumokokken freigesetzt wird. Die Freisetzung von PLY durch Pneumokokken kann sowohl durch Autolysin (Berry et al. 1989) als auch durch die Bakterienlyse, z.B. durch Antibiotika, geschehen (Spreer et al. 2003). Neuere Erkenntnisse machen allerdings deutlich, dass es möglicherweise auch Mechanismen der Freisetzung von PLY gibt, die unabhängig von der Lyse des Bakteriums und Autolysin sind (Balachandran et al. 2001).

Die Wirkung von PLY - besonders auf die Epithelzellen des oberen Respirationstraktes als häufigstem Ausgangspunkt von Pneumokokkeninfektionen -

12

ist intensiv erforscht. Schon in der ersten Phase der Infektion mit Pneumokokken spielt PLY eine wichtige Rolle, da PLY einen Einfluss auf die Invasion des Bakteriums in den Wirtskörper nimmt.

PLY hat einen direkten Einfluss auf das Flimmerepithel, das als erste mechanische Barriere gegen Krankheitserreger dient. Es vermindert die Peristaltik des Flimmerepithels, welches Krankheitserreger aus der Lunge hinausbefördert (Steinfort et al. 1989).

Ein weiterer Pathomechanismus ist die Zerstörung der *tight junctions* zwischen den Epithelzellen durch PLY und damit die Störung der Integrität der Epithelbarriere, was eine Invasion in die tiefer liegenden Gewebeschichten ermöglicht. Die direkte Zytotoxizität von PLY auf Epithel- und Endothelzellen zerstört ebenfalls die Integrität der Barrierefunktion. Durch die beschriebene Porenbildung entstehen Defekte in der Zellmembran, die unter anderem durch den unkontrollierten Einstrom von Bestandteilen des Extrazellularraumes zum Zelluntergang führen können. Dieser Effekt ist an einer Vielzahl von Zelltypen in verschiedenen Spezies beschrieben, unter anderem auch den Epithel- und Endothelzellen, welche in dieser Arbeit untersucht werden (J. Rubins et al. 1993 und J. Rubins et al. 1992).

Des Weiteren spielt PLY eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung des Immunsystems des Wirts während der Infektion und Vermehrung der Erreger in den Alveolen. Über die zytotoxische Wirkung an immunkompetenten Zellen können deren Phagozytoseaktivität und Immunantwort vermindert werden. Über diesen direkten Effekt hinaus reduziert PLY in einer Konzentration von 2 ng/ml im Agarosegel die Migration von Leukozyten durch Chemotaxis sowie die Freisetzung von H₂O₂ aus Leukozyten und damit die bakteriolytische Wirkung dieser (Paton et al. 1983). Auch konnte durch die Inkubation von Lymphozyten mit sublytischen PLY-Konzentrationen eine Reduktion ihrer Proliferationsrate und der Bildung sämtlicher Immunglobuline gezeigt werden (Ferrante et al. 1984). Zusätzlich besitzt PLY die Fähigkeit, Immunglobuline zu binden und so das Komplementsystem auf dem klassischen Weg über das Plasmaprotein C1q zu aktivieren (J. Rubins et al. 1996 und J.C. Paton et al. 1984).

Die Bedeutung von PLY als Virulenzfaktor bei der Infektion mit Pneumokokken ist in Bezug auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität eindeutig belegt. Nach der intraperitonealen Injektion von PLY-defizienten Pneumokokken ist der Krankheitsverlauf deutlich milder und die Mortalität signifikant reduziert im Vergleich zu einer entsprechenden Injektion von WT-Pneumokokken (Berry et al. 1992). Darüber hinaus ist PLY maßgeblich für die Eigenschaft von Pneumokokken verantwortlich, sich in Blutgefäßen im Organismus auszubreiten. Studien haben gezeigt, dass PLY-defiziente Pneumokokken *in vivo* nicht mehr in der Lage sind, das Pneumokokken-induzierte akute Sepsissyndrom als schwerwiegende Komplikation einer Pneumokokkeninfektion auszulösen (Benton et al. 1995).

Pneumolysin hat strukturelle Ähnlichkeiten mit Toxinen anderer gram-positiver Bakterien (z.B. Clostridien, Streptokokken und Listerien) und gehört zur Gruppe der CDCs (*Cholesterol-dependent cytolysins*; auch bekannt als *thiol-activated toxins* oder *cholesterol-binding toxins*). Zu dieser Gruppe gehören auch die Toxine Perfringolysin, Streptolysin und Listeriolysin.

Ein wichtiges Alleinstellungsmerkmal von Pneumolysin im Vergleich zu den anderen Toxinen der CDC-Gruppe ist das Fehlen einer für die aktive Sezernierung benötigten N-terminalen Sequenz. Dadurch kann Pneumolysin als einziges Toxin dieser Gruppe nicht auf eine vergleichbare Weise aktiv sezerniert werden. Neben anderen Arten der Freisetzung wird ein großer Teil durch Zelllyse und das Protein Autolysin freigesetzt (Berry et al. 1992).

Die CDCs nehmen eine zentrale Rolle bei der durch das jeweilige Bakterium verursachten Infektion ein und es konnte bereits für mehrere ein Einfluss auf [Ca²⁺]_{zyt} nachgewiesen werden. So ist es zum Beispiel bei der Erforschung des Endotoxins von Listerien, dem Listeriolysin, gelungen zu zeigen, dass dieses direkt ein Ca²⁺-Signal verursacht, das nicht alleine durch die Bildung von Poren in der Zellmembran entsteht (Repp et al. 2002), sondern die Entleerung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher induziert (Gekara et al. 2008).

Auch für PLY konnte in verschiedenen Zelltypen eine Wirkung auf $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und Ca^{2+} -Signalwege nachgewiesen werden. Nach der Inkubation von humanen Neuroblastomzellen mit 0,5µg/ml PLY erfolgte nach 10 min bei etwa der Hälfte der Zellen ein rapider Ca^{2+} -Anstieg, der 30 sec bis 4 min anhielt. Danach blieb $[Ca^{2+}]_{zyt}$ stark erhöht und kehrte im Zeitraum von 60 min nicht wieder auf das Ausgangsniveau zurück (Stringaris et al 2002). An HMC (*human microglial cell line*) führt PLY (0,1-10 µg/ml) über einen Ca^{2+} -Einstrom zur Apoptose (Braun et al. 2002). Die primäre Invasion von Pneumokokken in das Epithel des Nasopharynx wurde ebenfalls bereits mit PLY und $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in Verbindung gebracht. PLY induziert in epithelialen Zellen des Nasopharynx (Detroit 562) eine Freisetzung des Interleukins CXCL8. Die Freisetzung kann durch den intrazellulären Ca²⁺-Chelator BAPTA signifikant reduziert werden, sodass auch hier PLY einen zellulären Vorgang über Ca²⁺ zu beeinflussen scheint (Dogan et al. 2011).

2.2. Calcium

Ca²⁺-Ionen dienen intrazellulär als *second messenger* und sind in dieser Funktion Teil einer Vielzahl von Signalwegen. Über das Protein Calmodulin, das 1% aller Proteine in tierischen Zellen ausmacht, kann Ca²⁺ verschiedene Kinasen und Phosphatasen aktivieren und ist damit eine gemeinsame Endstrecke z.B. von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Ca²⁺-Kanälen (Heinrich et al. 2003).

In T-Lymphozyten konnte durch das Auslösen von Spikes von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ eine modifizierte Expression mehrerer Gene nachgewiesen werde (Li et al. 1998). Auch auf die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen hat Ca²⁺ einen direkten Einfluss (Nilius et al. 2001). Auch Zell-Zell-Kontakte sowie die Endothelbarriere werden über $[Ca^{2+}]_{zyt}$ reguliert (Dejana et al. 1995).

Diese Beispiele sollen die herausragende Bedeutung von Ca²⁺ exemplarisch aufzeigen, die praktisch jede Funktion der Zelle direkt oder indirekt betrifft, und bilden gemeinsam mit den bereits bekannten Fakten zur Wirkung der CDCs generell und PLY speziell auf [Ca²⁺]_{zyt}, den Grund, warum in dieser Arbeit Ca²⁺ untersucht werden soll.

2.2.1. Calciumhomöostase

 $[Ca^{2+}]_{zyt}$ beträgt normalerweise ~100 nM, stimuliert hingegen kann $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Werte von 0,5-2 µM ansteigen (Tran et al. 2000). Dabei kann $[Ca^{2+}]_{zyt}$ sowohl in der gesamten Zelle homogen ansteigen als auch nur in bestimmten Bereichen. Anstiege von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ können durch einen Ca^{2+} Einstrom von extrazellulär, aber auch durch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern erfolgen. Ca^{2+} wird gleich in mehreren Zellorganellen angereichert. Die vermutlich wichtigsten Zellorganellen hierfür sind das Endoplasmatische Retikulum (ER) sowie die Mitochondrien; aber auch dem Zellkern, dem Golgi-Apparat und der Ca²⁺-Anreicherung direkt unter der Plasmamembran wird eine wichtige Funktion in der Ca²⁺-Homöostase zugeschrieben.

In vielen Fällen ist aber nicht die Freisetzung von Ca²⁺ aus einem einzelnen Speicher für ein Ca²⁺-Signal verantwortlich, sondern die Orchestrierung aus mehreren Zellorganellen (Dolor et al. 1992), die im Folgenden weiter erläutert werden.

2.2.2. Endoplasmatisches Retikulum

Das ER ist die Zellorganelle, in $[Ca^{2+}]_{zyt}$ am höchsten ist. Die Angaben für $[Ca^{2+}]$ im ER schwanken in der Literatur je nach Zelltyp deutlich und liegen vermutlich bei ~500 μ M (Palmer et al. 2004 und Alonso et al. 1999), können aber auch Werte von bis zu 3 mM erreichen. Damit ist das ER für die Speicherung von bis zu 75% des gesamten intrazellulären Ca²⁺ verantwortlich (Tran et al. 2000).

Die Anreicherung findet mittels Ca²⁺⁻Pumpen des Sarkoplasmatischen und Endoplasmatischen Retikulums (SERCA) statt, die Ca²⁺-Ionen gegen einen Konzentrationsgradienten unter ATP-Verbrauch in das ER befördern. Innerhalb des ER wird Ca²⁺ zum Teil an Proteine, wie zum Beispiel an Calsequestrin und Calreticulin, gebunden und gespeichert (Pozzan et al. 1994).

Wichtige Proteine für die Ca²⁺-Ausschüttung aus dem ER sind die Inositol 1,4,5triphosphat-Rezeptoren (IP3Rs) und die Ryanodin-Rezeptoren (RYR), welche vor allem in Muskelzellen von großer Bedeutung sind.

IP3Rs sind ligandenaktivierte Ca²⁺⁻Kanäle in der Membran des ER und besitzen sechs Transmembrandomänen, eine intrazelluläre Bindungsstelle für IP3 (Inositol 1,4,5-triphosphate) sowie eine Bindungsstelle für Regulatoren. Die Rezeptoren werden nicht nur durch Phosphorylierung, ATP, die H⁺- und die IP3-Konzentration reguliert, sondern auch durch Ca²⁺ selbst. IP3 bewirkt am IP3R eine Modifikation der Ca²⁺-Sensibilität und kann so einen Ca²⁺-Strom aus dem ER in das Zytosol induzieren (Foskett et al. 2007). IP3Rs haben ebenfalls eine wichtige Funktion in der Zellmembran für komplexe Ca²⁺-Signale.

Weitere Proteine von herausragender Bedeutung für die Ca²⁺-Homöostase sind die STIM und Orai Proteine (siehe Abschnitt "Extra- und intrazelluläre Ca²⁺-

Homöostase").

2.2.3. Mitochondrium

Das Mitochondrium ist quantitativ ein kleinerer Ca²⁺-Speicher als das ER. Trotzdem hat das Mitochondrium wichtige Funktionen in der Ca²⁺-Homöostase der Zelle, für z.B. Nekrose- und Apoptosevorgänge. Auch bei der Regulation von Enzymen im Mitochondrium selbst ist Ca²⁺ ein bedeutender Botenstoff. Die treibende Kraft für die Ansammlung von Ca²⁺ im Matrixraum des Mitochondriums ist das Membranpotential über der inneren Mitochondrienmembran. Über die Atmungskette werden H⁺-Ionen aus dem Matrixraum in den Membranzwischenraum gepumpt, wodurch ein negativ geladener Matrixraum im Inneren des Mitochondriums entsteht. Diese negative Ladung ist die treibende Kraft für die Ansammlung von positiv geladenen Ionen, wie z.B. Ca²⁺, im Mitochondrium (Drago et al. 2011).

Wichtige Transportproteine für die Verschiebung von Ca^{2+} über die Mitochondrienmembranen sind der *Na⁺/Ca²⁺-antiporter* (NCX) und der *mitochondrial Ca²⁺ uniporter* (MCU), die erst in den letzten Jahren entdeckt wurden und zu einem deutlich besseren Verständnis der mitochondrialen Ca²⁺-Homöostase geführt haben (Palty et al. 2010 und Baughman et al. 2011).

2.2.4. Extra- und intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase

Im Gegensatz zu [Ca²⁺]_{zyt} von ~100 nM beträgt die [Ca²⁺] im extrazellulären Raum bei allen Säugetieren ~1 mM. Um diesen Konzentrationsgradienten aufrechtzuerhalten, muss dauerhaft Ca²⁺ aus der Zelle gepumpt werden. Dabei spielen zellmembranständige Ca²⁺-ATPasen eine wichtige Rolle, die unter ATP-Verbrauch Ca²⁺ in den Extrazellularraum verschieben. Der zuvor erwähnte NCX kann ebenfalls Ca²⁺ aus der Zelle herauspumpen. Dieser Antiporter macht sich den Na⁺-Gradienten zunutze und kann jeweils ein Ca²⁺-Ion nach extrazellulär für 3 Na⁺-Ionen nach intrazellulär austauschen.

Für den Einstrom von Ca²⁺-Ionen über die Plasmamembran gibt es mehrere Mechanismen. Die spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle, welche z.B. in glatten

Muskelzellen eine wichtige Rolle spielen, sind in Endothelzellen vermutlich nur von untergeordneter Bedeutung (Li et al. 1999). Funktionell entscheidender ist eine Reihe von Kationenkanälen, die direkt von anderen Molekülen und Proteinen aktiviert werden. Ein Beispiel hierfür sind die IP3Rs, die bereits vom ER bekannt sind, aber auch in der Plasmamembran vorkommen und durch IP3 aktiviert werden (Putney et al. 1999). Außerdem kommen als nicht-selektive Kationenkanäle verschiedene *Transient Receptor Potential* Kanäle (TRP-Kanäle) in der Zellmembran vor, durch die ebenfalls Ca²⁺-Ionen in die Zelle einströmen können. Erst in den letzten Jahren wurden die sogenannten Orai-Proteine entdeckt. Diese können sich in der Zellmembran zu hoch selektiven Ca²⁺-Kanälen zusammenschließen (Feske et al. 2006). Diese Kanäle spielen eine besonders wichtige Rolle im sogenannten *storeoperated Ca²⁺ entry* (SOC). Es wird vermutet, dass es sich bei dem SOC um den wichtigsten Agonisten-induzierten Ca²⁺-Einstrom in vaskulären Endothelzellen handelt (Dolor et al. 1992).

Über Dieser Einstrom wird über mehrere Stufen vermittelt. G-Protein (Guaninnucleotid-bindendes Protein) oder Tyrosin-Kinase-gekoppelte Rezeptoren entsteht an der Plasmamembran IP3. Dieses löst am ER über IP3Rs eine Ausschüttung von Ca²⁺-Ionen aus. Der Abfall der [Ca²⁺] im ER wird von dem Transmembranprotein STIM detektiert, welches in der Membran des ER liegt. Zur Gruppe der STIM-Proteine gehören STIM 1 und STIM 2. Von diesen ist STIM 1 für den SOC von besonders großer Bedeutung. STIM 1 hat eine hohe Potenz, Orai-Proteine in der Zellmembran zu aktivieren, die hoch selektive Poren bilden, durch die Ca²⁺-Ionen nach intrazellulär strömen (Roos et al. 2005). STIM 2 hat eine deutlich größere Sensitivität für Veränderungen der [Ca²⁺] im ER, aber eine geringere Potenz, Orai-Proteine zu aktivieren (Smyth et al. 2010).

Der Einstrom durch die SOC-Kanäle limitiert sich selbst, indem das Ca²⁺ gleichzeitig seinen eigenen Einstrom hemmt. Außerdem wird zytosolisches Ca²⁺ zurück in das ER gepumpt, um die intrazellulären Ca²⁺-Speicher wieder zu füllen. So entsteht ein biphasisches Ca²⁺-Signal aus einem sehr raschen Ca²⁺-Anstieg durch die Freisetzung aus dem ER, gefolgt von dem etwas länger anhaltenden Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär. Insgesamt spielt sich dieses Signal in einem Zeitraum von Sekunden bis Minuten ab (Tiruppathi 2002).

Obwohl der SOC-Mechanismus in den letzten drei Jahrzehnten intensiv erforscht

wurde, gibt es weiterhin Unklarheiten. Es werden viele verschiedene Agonisten, die membranständige Kationenkanäle aktivieren, als mögliche Botenstoffe für den SOC-Mechanismus diskutiert.

Weitere Komplexität bekommen Ca²⁺-Signale in der eukaryotischen Zelle dadurch, dass sie oft nicht einmalig, sondern meist als rasch aufeinanderfolgende und in der Frequenz und Amplitude variierende Erhöhungen von [Ca²⁺]_{zyt} auftreten.

Es scheint, als ob dieses Phänomen der sogenannten Ca²⁺-Oszillation häufiger die physiologischere Reaktion auf Agonisten ist als die einmaligen Erhöhungen von [Ca²⁺]_{zyt}. Ca²⁺-Oszillationen sind seit der Mitte der siebziger Jahre bekannt und seither intensiv erforscht worden.

Der Zusammenhang von [Ca²⁺]_{zyt}-Schwankungen und den STIM-Proteinen, welche die [Ca²⁺] im ER messen, ist nachgewiesen, ebenso wie deren Beziehung zum SOC-Mechanismus (Dupont et al. 2011). Eine zentrale Rolle für Ca²⁺-Oszillationen spielen außerdem das schon mehrfach erwähnte IP3 und die damit verbundenen IP3Rs (Dupon et al. 1993).

2.3. Fragestellung und Zielsetzung

Die Statistik von Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen des Menschen, im Speziellen der Lunge, spricht für sich und macht deutlich, dass die Behandlungsmöglichkeiten bei schwersten Infektionen teilweise mangelhaft sind, und dass sowohl in den Industrienationen als auch im Rest der Welt viele Menschen von besseren Therapien profitieren könnten. Eine bessere Behandlung kann aber nur aus einem besseren Verständnis der Pneumokokkeninfektion und des Bakteriums selbst resultieren. Die genaue Erforschung der Virulenzfaktoren und ihrer Interaktionen muss daher vorangetrieben werden. Die Invasion des Bakteriums über die Blutbahn und die Wechselwirkungen mit dem Endothel, insbesondere dem Lungenendothel, spielen bei lebensbedrohlichen Pneumokokkeninfektionen eine entscheidende Rolle. Der genaue Blick auf [Ca²⁺]_{zvt} ist in diesem Kontext einmal aufgrund der Bedeutung für Vorgänge in der Endothelzelle, die für den Krankheitsverlauf entscheidend sind, von besonderer Relevanz. Des Weiteren wurde der Einfluss auf [Ca²⁺]_{zvt} durch die Bildung von Poren bereits dargelegt. Die Abgrenzung eines neuen aktiven Signals zu dieser Porenbildung soll durch die weitere Untersuchung von [Ca²⁺]_{zvt} erfolgen.

Speziell Oszillationen von [Ca²⁺]_{zyt} sind nach aktuellsten Erkenntnissen Abbild zellulärer Signalweiterleitung in physiologischen und pathologischen Situationen und damit ein möglicher Schlüssel für das Verständnis und die zukünftige Behandlung von Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit detailliert [Ca²⁺]_{zyt} in Endothelzellen in Reaktion auf Pneumokokken und ihre Virulenzfaktoren untersucht.

Hierzu sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Haben Pneumokokken bzw. Pneumokokken-spezifische Virulenzfaktoren einen Einfluss auf [Ca²⁺]_{zyt}, der über die bereits bekannte Bildung von Poren hinausgeht und ein aktives Signal innerhalb der Zelle darstellt?
- 2. Welcher Mechanismus liegt diesem Signal zugrunde?
- 3. Sind die Ergebnisse auf die intakte Lunge übertragbar?

3. Materialien und Methodik

3.1. Materialien

3.1.1. Allgemeine Reagenzien

Name	<u>Hersteller</u>
Aqua ad injectabila	Baxter Deutschland GmbH,
	Unterschleißheim, Deutschland
Adenosintriphosphat	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dextran 70.000 kDa	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fura-2 AM	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien,
	USA
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
ethansulfonsäure (HEPES)	
Isotone NaCI-Lösung	Baxter Healthcare SA, Zurich, Schweiz
KCI	Merck, Darmstadt, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	J. T. Backer, Deventer, Holland
Pluronic	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien,
	USA
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotenone	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.1.2. Allgemeine Geräte

Eppendorf Reference 20 Pipette Eppendorf Research 10 Pipette Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf Research 100 Pipette Eppendorf Research 1000 Pipette Zentrifuge Hettich Hämatokrit Typ 201

Zentrifuge Biofuge 28 RS

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

3.2. Materialen für in vitro Versuche

3.2.1. Reagenzien/Medikamente Trypanblau Lösung (0,4%) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland Endothelial Cell Growth Medium Promocell Gmbh, Heidelberg, Deutschland Promocell Gmbh, Heidelberg, Supplement Mix Deutschland Phosphate Buffered Saline (PBS) Biochrom AG, Berlin, Deutschland PAA Laboratories Gmbh, Pasching, Accutase Austria Penicillin/Streptomycin Biochrom AG, Berlin, Deutschland 10000IE/ml/10000µg/ml

3.2.2. Lösungen

HBS	20mM HEPES; 1mM CaCl ₂ ; 1mM MgCl ₂ ;
	5mM KCI; 150mM NaCI; 10mM Glucose;
	ad 1L ddH ₂ O; pH 7,4; 295 mOsm
Endothelzell Nährmedium (MV)	Endothelial Cell Growth Medium MV;
	SupplementMix; 100IE/ml Penicillin;
	100µg/ml Streptomycin

3.2.3. Material

Objektträger BD Falcon Culture Slides	BD Biosciences Europe, Erembodegen,		
	Belgien		
Kulturflaschen 25cm ² (T75)	Sarstedt inc., Newton, USA		
Neubauer Zählkammer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim,		
	Deutschland		

3.2.4. Geräte

CCD-Kamera	CoolSnap HQ, Roper Scientific, USA
Lampe Olympus U-RFL-T	Olympus Europa Holding GmbH,
	Hamburg, Deutschland
Mirkoskop Olympus BX40	Olympus Europa Holding GmbH,
	Hamburg, Deutschland
Objektiv Achroplan 40x0,80 W	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Filterrad und Shutter Lambda 10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht,
	Deutschland

3.3. Materialien für Tierversuche

3.3.1. Medikamente

B. Braun Melsungen AG, Melsungen,
Deutschland
Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Baxter Deutschland GmbH,
Unterschleißheim, Deutschland
Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden,
Deutschland
Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
Deutschland
Pfizer Pharma GmbH, Berlin,
Deutschland

3.3.2. Lösungen

HBS-Puffer	20mM HEPES; 1mM CaCl ₂ ; 1mM MgCl ₂ ;
	5mM KCI; 150mM NaCI; 10mM Glucose;
	0,16mM Dextran 70.000; ad 1L ddH ₂ O; pH
	7,4; 295 mOsm
Isotone Kochsalzlösung	Natriumchlorid 9,0 %
Human Albumin	50g/L Human Albumin; Natriumcaprylat
	4mmol/l (0,7g/L); Natriumacetyltryptohanat
	4mmol/l (1,1g/L); Natriumionen 130-
	160mmol/l; Natriumchlorid 7,5g/L ad 1L

 ddH_2O

3.3.3. Materialien

Perma-Handseide Fadendicke 0	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
10ml BD Discardit II Spritze	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
20ml / Luer Solo Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
2ml / Luer Solo Spritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
5ml BD Discardit II Spritze	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
Baysilone-Paste 35g	GE Bayer Silicones, Leverkusen, Deutschland
BD Eclipse Needle 23G 1	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
BD Microlance 3 20G	Becton Dickinson S.A., Fraga, Spanien
BD Plastipak 1ml	Becton Dickinson S.A., S. Augustin del Guadalix, Madrid, Spanien

Cellstar PP-Test Tubes 15ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Combi Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Deckgläser 24mm Ø	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Discofix-3	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Druckleiter	Smith Medical International Ltd. Hythe, Kent, England
Edisonite Classic alkalischer Schnellreiniger	Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, Deutschland
EpT.I.P.S. Standard 200µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EpT.I.P.S. Standard 50-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon Petri Dish 50x9mm Style	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson Frankreich S.A., Le Pont De Claix, Frankreich
Falcon Petri Dish 90x20mm Style	Becton Dickinson Labware Europe, Becton Dickinson Frankreich S.A., Le Pont De Claix, Frankreich
Micro-Flo Luer-Lock 30cm	DKS Loversan SpA, Germonio, Italien
Mikrokatheter Polythene Tubing 0,28mm ID 0,61mm OD	Smith Medical International Ltd. Hythe, Kent, England
Schienungskatheter Polythene Tubing 0,86mm ID 1,27mm OD	Smith Medical International Ltd. Hythe, Kent, England
Mini-Spike Plus	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Mullkompressen 5x5cm 12-fach	Fuhrmann Verbandstoffe GmbH, Much, Deutschland

Peha-soft Puderfreie Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Eppendorf-Reagenzgefäß 1,5ml	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Rotilabo-Fertigstopfen aus Naturgummi	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SafeSeal Gefäß 1,5ml braun	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co., Nürnbrecht, Deutschland
Saran Verpackungsfolie	Dow Deutschland Anlagengesellschaft mbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Silicon Schlauch 2,0x1x4,0mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Silicon Schlauch 4,0x1,5x7,0mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Polyethylen Schlauch ID 1,5mm WS 0,6mm	Smith Medical International Ltd. Hythe, Kent, England
Nasensondenschlauch OD 3,3mm 10ch	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tygon 4,0mmx5,6mm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Chirurgisches Skalpell	Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
T-Schlauchverbindungsstück 4-5mm	Kartell Spa, Noviglio (Milano), Italien
Wattestäbchen	Karl Beese GmbH & Co., Barsbüttel, Deutschland

3.3.4. Geräte

<u>Name</u>

<u>Hersteller</u>

Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH,
	Burgwedel, Deutschland
Beatmungsgerät Harvard Rodent Ventilator	Harvard Apperatus GmbH, Holliston,
Modell 683	Massachusetts, USA
Hochgeschwindigkeitsfilterrad	Shutter, USA
Höhenverstellbarer Aluminium Tisch	VWR International, West Chester,
	Pennsylvania, USA
Computer Imaging Microscopy	Visitron Systems GmbH, Puchheim,
	Deutschland
LCD Monitor Imaging Microscopy	Visitron Systems GmbH, Puchheim,
	Deutschland
Lampe KL 1500 Elektronik	Schott AG, Mainz, Deutschland
LCD Monitor	Fujitsu Computers Siemens, München,
	Deutschland
Druckwandler Marquette Tram 600sl	GE Medical Systems, Freiburg,
	Deutschland
Monitor Marquette Transcope 12	GE Medical Systems, Freiburg,
	Deutschland
Wasserbad Medingen WB 6	P-D Industriegesellschaft mbH, Dresden,
	Deutschland
Wage Mettler P6N	Mettler Wagen GmbH, Giessen,
	Deutschland
Nalgene 5311 Desiccator	Thermo Fisher Scientific, Roskilde,
	Dänemark
Objektiv Achroplan 40x0,80 W	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Perfusor 11Plus	Harvard Apperatus GmbH, Holliston,
	Massachusetts, USA
Shutter Lambda 10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht, Deutschland
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel GmbH & Co KG IKA
	Labortechnik, Staufen i. Br., Deutschland
Kaltlichtlampe VSB HBO 100	Leistungselektronik Jena GmbH, Jena,
	Deutschland

Rollerpumpe Watson-Marlow 520S	Watson-Marlow Bredel Pumps, Falmouth,
	United Kingdome
WSB Piezodrive 05	Carl Zeiss Werk Göttingen, Göttingen,
	Deutschland
Druckwandler LogiCal Medex	Smiths Medical, Grasbrunn, Deutschland
CCD-Kamera	CoolSnap HQ, Roper Scientific, USA
Reflektorschieber 3 FL	Carl Zeiss Werk Göttingen, Göttingen,
	Deutschland
Filterset für Fura 2 F71-000	AHF analysentechnik AG, Tübingen,
	Deutschland
Mikroskop Axiotech Vario 451032	Carl Zeiss Werk Göttingen, Göttingen,
	Deutschland

3.4. Materialen für die Pneumokokkenkultivierung

3.4.1. Reagenzien/Medikamente

BD Sensi-Disc™ Erythromycin, 15 μg	BD, Franklin Lakes, NJ USA
BD Sensi-Disc™ Chloramphenicol, 30 µg	BD, Franklin Lakes, NJ USA
Kanamycin	

3.4.2. Materialien

Blutagar col sb+	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ausstrichösen	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

3.4.3. Geräte

Brutschrank Heraeus GmbH, Hanau, Deutschla
--

3.5. Pneumokokken

Der Pneumokokkenstamm D39 wurde freundlicherweise durch die Abteilung "Genetik der Mikroorganismen" von Prof. Dr. Hammerschmidt des "Interfakultären Instituts für Genetik und Funktionelle Genomforschung" an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald zur Verfügung gestellt. Der Stamm D39 wurde bereits 1916 klinisch isoliert und ist bis heute der am häufigsten verwendete und der am besten erforschte humanpathogene Pneumokokkenstamm (Avery et al. 1943 und Lanie et al. 2007), weswegen er auch in dieser Arbeit genutzt wurde. Folgende Mutanten wurden verwendet:

Tabelle 1: Pneumokokkenstämme und Resistenzen

Name	Mutation	Resistenz
D39 WT	Wildtyp	-
D39 APLY	Pneumolysin defizient	Erythromycin
D39 ΔCPS	Kapsel defizient	Chloramphenicol

Die entsprechenden Resistenzen der Stämme D39 WT, D39 ΔCPS und D39 ΔPLY wurden durch Ausplattierung erfolgreich nachgewiesen.

3.6. Pneumolysin

Das aus dem Pneumokokkenstamm D39 isolierte Pneumolysin wurde ebenfalls von unserem Kooperationspartner, der Abteilung "Genetik der Mikroorganismen" von Prof. Dr. Hammerschmidt des "Interfakultären Instituts für Genetik und Funktionelle Genomforschung" an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald, hergestellt und uns überlassen.

3.7. Bakterienkultur

Um die Vitalität, die Reproduktionsfähigkeit und die entsprechenden Mutationen zu

überprüfen, wurden alle Pneumokokken-Mutanten auf Blutagarplatten ausplattiert, welche mit den entsprechenden Antibiotika bzw. Antibiotikaplättchen bestückt waren. Es wurde ein Dreiösenausstrich durchgeführt.

Die Platten wurden im "Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene" des Universitätsklinikums Eppendorf im Labor der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. H. Rohde in einem Brutschrank bei 33° C und 5% CO₂ für 48 Stunden inkubiert und anschließend auf Wachstum und Hemmhöfe hin ausgewertet.

3.8. Intrazelluläre Calciummessung mittels Fluoreszenzmikroskopie

3.8.1. Fura-2-AM

Der Farbstoff Fura-2 ist ein Indikator für die Messung von [Ca²⁺]_{zyt}, der durch UV-Licht angeregt wird. Fura-2 bindet Calcium als Chelatkomplex und verändert dadurch seine Konformation und damit wiederum auch die Wellenlänge, mit der eine maximale Anregung erreicht wird. Die Wellenlänge mit der maximalen Anregung von Fura-2 liegt in Ca²⁺-reicher Umgebung bei 335 nm und in Ca²⁺ freier Umgebung bei 363 nm. Die maximale Emission beider Konformationen liegt dicht beieinander bei ca. 500 nm. Für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurde die Emission sowohl bei einer Exitation mit 340 nm als auch mit 380 nm gemessen. [Ca²⁺]_{zyt} wird aus der computergenerierten 340:380 Ratio gebildet, basierend auf einem K_d-Wert von 224 nmol/l und einer entsprechenden Kalibration.

Fura-2 kann die Zellmembran nicht passieren. Um Ca²⁺ im Zytosol zu messen, muss Fura-2 membrangänging gemacht werden. Eine Methode, um Fluoreszenzfarbstoffe in intakten Zellen anzureichern, ist, hydrophobe Esterderivate (gängig ist die Verwendung von Acetoxymethyl), welche die Zellmembran passieren können, an den Farbstoff zu binden. Diese werden dann von intrazellulären unspezifischen Esterasen hydrolysiert, und der Farbstoff liegt so wieder in seiner nicht membrangängigen Form als Polycarboxylat Anion vor (Tsien et al. 1982).

3.8.2. Kalibration

Die Kalibration erfolgte nach der Grynkiewicz-Gleichung (Grynkiewicz et al. 1985).

$$\left[Ca^{2+}\right] = K_d \times \left(\frac{S_{f2}}{S_{b2}}\right) \times \left(\frac{R - Visc \times R_{\min}}{Visc \times R_{\max} - R}\right)$$

Tabelle 2: Variablen in der Kalibration nach Grynkiewicz

- K_d Dissoziationskonstante, die bei Fura bei 37°C 224 nmol/l
- λ1 340 nm
- λ2 380 nm
- $F_{\lambda 1}$ Fluoreszenzintensität bei 340nm Exitation
- Fluoreszenzintensität bei 380nm Exitation
- R aus der Fluoreszenzintensität, die sich aus $F_{\lambda 1}/F_{\lambda 2}$ ergibt
- S_{f2} Intensität $\lambda 2$ 380 nm in Ca²⁺-freier Umgebung
- S_{b2} Intensität bei $\lambda 2$ 380 nm in Ca²⁺-haltiger Umgebung
- Visc Viskositätskoeffizienten mit dem Wert 1 für wässrige Lösungen: der je nach Versuchsprotokoll zwischen 0,7 und 0,85 liegt

Bei der Kalibration werden bei identischer Belichtungszeit, Filtereinstellung und Grundlinien-Ratio durch Messungen der Emission nach Exzitation bei λ 340 nm sowie λ 380 nm Werte für R_{max}, S_{b2}, R_{min} und S_{f2} ermittelt. Zu diesem Zweck erfolgen zwei getrennte Versuche mit Ca²⁺-freiem Puffer und Ca²⁺-haltigem Puffer. Diese Versuche ergaben für R_{min} 0,4, R_{max} 7, S_{f2} 720 und S_{b2} 40.

3.8.3. Software

Die Bildung der Ratio sowie die Berechnung der [Ca²⁺] aus der kalibrierten Grynkiewicz-Gleichung übernimmt das Programm MetaFluor® (© 2004 – 2006 Molecular Devices Corporation, Silicon Valley, USA). Dieses Programm ist speziell für die Messung von intrazellulären Ionenkonzentrationen mittels

Fluoreszenzmessung konzipiert. Es können parallel ein oder zwei Wellenlängen gemessen werden. Metafluor kann gleichzeitig sowohl die Originalintensitäten beider Wellenlängen als auch die errechneten Ratiobilder darstellen. Außerdem können alle Messwerte in Echtzeit als Graphen ausgegeben werden, um die optimale Verfolgung des Versuchsablaufes zu gewährleisten.

3.9. In vitro Mikroskopie von HPMEC

3.9.1. Kultivierung

Es wurden *Human Pulmonary Microvascular Endothelilal Cells* (HPMEC) der Firma *PromoCell* verwendet. Die Kultivierung fand unter standardisierten Bedingungen in spezifischem Endothelzellmedium mit Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5%CO₂ statt.

Die Zellen wurden bei ca. 90% Konfluenz mit Accutase von der Oberfläche der Kulturflaschen (T25²) gelöst und mit einer definierten Dichte neu ausgesät. Dabei wurden maximal Zellen bis zu einer Passagezahl von 7 verwendet, bei einer vom Hersteller garantierten Zelltyp-Spezifität bis mindestens 15 Populationsverdopplungen.

Die HPMEC wurden für die *in vitro*-Mikroskopie auf spezielle Objektträger (BD Falcon Cultur Slides) ausgesät und unter den genannten Bedingungen für 48-96 Stunden. nochmals kultiviert, bis die Zellen einen 90% konfluenten einfachen Zellrasen ausgebildet hatten.

3.9.2. Experimentelles Versuchsprotokoll

3.9.2.1. Versuchsablauf

Zum Anfärben der HPMEC wurde der Objektträger für 45 Minuten mit 500 μ I 5 μ M Fura-2-AM Lösung in HBS bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach dem Abwaschen des Farbstoffes erfolgte die Messung von [Ca²⁺]_{zvt} zu Ausgangsbedingungen in Ca²⁺-haltigem bzw. Ca²⁺-freiem HBS. Es folgte die 5*10⁵ mit CFU/ml WT-Pneumokokken Inkubation (WT), PLY-defizienten Pneumokokken (ΔPLY), Kapsel-defizienten Pneumokokken (ΔCPS) oder 5 ng/ml isoliertem Pneumolysin (PLY) über 45 min. Außerdem wurden Versuche nach Vorinkubation mit Thapsigargin (TG), einem Inhibitor der ATPase des Endoplasmatischen Retikulums, und 50µM Rotenone (RO), einem Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette, durchgeführt. Entsprechende Kontrollgruppen wurden ebenfalls etabliert, um mögliche Fehler zu erkennen bzw. Vergleichbarkeit zu schaffen. Die Versuche wurden technisch bedingt unter Raumtemperatur durchgeführt.

3.9.2.2. Versuchsgruppen

Definition	Anzahl der Versuche (n)	Gruppe
Kontrolle	6	Kontrolle
Wildtyp-Pneumokokken	7	WT
Kapsel-defizient	7	ΔCPS
Pneumolysin-defizient	6	ΔPLY
Pneumolysin	6	PLY
Kontrolle Ca ²⁺ -frei	4	K- ØCa ²⁺
Wildtyp-Pneumokokken Ca ²⁺ -frei	9	WT-ØCa ²⁺
Pneumolysin Ca ²⁺ -frei	7	PLY-ØCa ²⁺
Kontrolle Thapsigargin	4	K-TG
Wildtyp-Pneumokokken Thapsigargin	5	WT-TG
Pneumolysin Thapsigargin	5	PLY-TG
Kontrolle Rotenone	5	K-RO
Wildtyp-Pneumokokken Rotenone	7	WT-RO

Tabelle 3: Versuchsgruppen der in vitro Versuche

Um eine Veränderung von [Ca²⁺]_{zvt} in Reaktion auf Pneumokokken in HPMEC zu untersuchen, wurde [Ca²⁺]_{zvt} mittels eines Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes gemessen. Aus diesen Messungen wurden die Anzahl reagibler Zellen, die durchschnittlich maximale $[Ca^{2+}]_{zvt}$ ($[Ca^{2+}]_{max}$) unter Ausgangsbedingungen und während der Interventionsphase sowie die Latenz bis zum ersten Ca²⁺-Anstieg und die Anzahl aller Ca²⁺-Anstiege während der Interventionsphase (Frequenz) bestimmt, um das Signal charakterisieren zu können. Um den Einfluss des jeweiligen erfolgte Virulenzfaktors beurteilen zu können, die Untersuchung der Versuchsgruppen ΔCPS , ΔPLY und PLY.

In den Versuchsgruppen Kontrolle, WT, ΔCPS, ΔPLY und PLY wurden insgesamt 32 Objektträger in Ca²⁺-haltigem HBS untersucht:



Abbildung 1: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC in HBS-Puffer. Dargestellt sind die Versuchsgruppen Kontrolle (Kontrolle), Wildtyp (WT), Pneumolysin-Defizient (Δ PLY) und isoliertes PLY (PLY). In allen Versuchsgruppen erfolgte eine Aufzeichnung der [Ca²⁺] zu Ausgangsbedingungen bei Inkubation mit HBS über 10 min (hellgrau hinterlegt). Während der Intervention wurden die HPMEC über 45 min entsprechend der Gruppe mit je 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken D39 WT, D39 Δ CPS und D39 Δ PLY bzw. 5 ng/ml isoliertem PLY Inkubiert (dunkelgrau hinterlegt).
Um die Rolle von extrazellulärem Ca²⁺ zu untersuchen, wurde der Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär ins Zytosol durch die Verwendung von Ca²⁺-freiem Puffer verhindert. In den Versuchsgruppen K-ØCa²⁺, WT-ØCa²⁺, PLY-ØCa²⁺ wurden 20 Objektträger in Ca²⁺-freiem HBS untersucht:



Abbildung 2: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC in Ca²⁺-freier Umgebung. Dargestellt sind die Versuchsgruppen Kontrolle in Ca²⁺-freier Umgebung (K- $ØCa^{2+}$), WT-Pneumokokken in Ca²⁺-freier Umgebung (WT- $ØCa^{2+}$) und isoliertes PLY in Ca²⁺-freier Umgebung (PLY- $ØCa^{2+}$). In den Versuchsgruppen erfolgte eine Aufzeichnung der [Ca²⁺]_{zyt} zu Ausgangsbedingungen bei Inkubation mit Ca²⁺-freiem HBS-Puffer über 5 min (hellgrau hinterlegt). Während der Intervention wurden die HPMEC über 45 min entsprechend der Gruppe mit Ca²⁺-freiem HBS alleine oder mit 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken des Stammes D39 WT oder 5 ng/ml isoliertem PLY, jeweils in Ca²⁺-freiem HBS resuspendiert, inkubiert (dunkelgrau hinterlegt).

Um die Bedeutung des ERs für das Ca²⁺-Signal zu analysieren, wurde im Vorhinein das endoplasmatische Retikulum als Ca²⁺-Speicher durch die Vorinkubation mit 10 μ M TG entleert. In den Versuchsgruppen K-TG, WT-TG und PLY-TG wurden insgesamt 14 Objektträger in Ca²⁺-haltigem HBS mit TG untersucht:



Abbildung 3: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC nach Stimulation mit Thapsigargin (TG). Dargestellt sind die Versuchsgruppen, TG Kontrolle (K-TG), WT-Pneumokokken nach TG Stimulation (WT-TG) und isoliertes PLY nach TG Stimulation (PLY-TG). In allen Versuchsgruppen erfolgte eine Aufzeichnung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu Ausgangsbedingungen bei Inkubation mit HBS über 5 min (hellgrau hinterlegt). Dann wurden die Zellen über 25 bzw. 75 min mit 10 µM TG in HBS inkubiert (grau hinterlegt). In den Gruppen WT-TG und PLY-TG folgte nach 30 min die Inkubation mit 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken des Stammes D39 WT bzw. 5 ng/ml isoliertem PLY für 45 min (dunkelgrau hinterlegt).

Die Rolle von Mitochondrien wurde untersucht, indem die mitochondrialen Ca²⁺-Speicher durch Vorinkubation mit 50 µM RO blockiert wurden, sodass diese nicht an der Bildung eines Ca²⁺-Signals mitwirken konnten.

In den Versuchsgruppen K-RO und WT-RO wurden insgesamt 12 Objektträger in Ca²⁺-haltigem HBS mit RO untersucht:



Abbildung 4: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC nach Vorinkubation mit Rotenone (RO). Dargestellt sind die Versuchsgruppen Rotenone Kontrolle (K-RO) und WT-Pneumokokken nach RO Stimulation (WT-RO). In allen Versuchsgruppen erfolgte eine Aufzeichnung der $[Ca^{2+}]$ zu Ausgangsbedingungen bei Inkubation mit HBS über 5 min (hellgrau hinterlegt). Die Zellen wurden über 25 bzw. 75 min mit 50 μ M RO in HBS-Puffer inkubiert (grau hinterlegt). In der Gruppe WT-RO folgte zur Minute 30 die Intervention mit 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken des Stammes D39 Wildtyp (dunkelgrau hinterlegt).

3.9.3. Mikroskopie

Für die Epifluoreszenzmessung an humanen Endothelzellen in vitro verlief das Licht einer Kaltlichtlampe (Olympus U-RFL-T) durch ein Filterrad und die Blende (Lambda 10-2). Das Mikroskop (Olympus BX40) ist mit einem Filter für die Exitation auf den Wellenlängen 340, 360 und 380 nm und die Emission auf 500 nm (Filterset für Fura Reflektorschieber ausgerüstet. Die Belichtungszeit 2) in einem und Exzitationswellenlängen werden über die Software (Metafluor) eingestellt. Der Farbstoff wurde entsprechend der Kalibration mit den Wellenlängen 340 nm und 380 nm angeregt. Die resultierende Fluoreszenz wird von einer Kamera (CCD-Kamera) detektiert und direkt zur Online-Bilderverarbeitung an die Auswertungssoftware (Metafluor) übermittelt.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der in vitro Mikroskopie.

3.9.4. Messparameter

Folgende Endpunkte wurden bei der Messung mit Fura-2 generiert und bewertet: Ein Ca^{2+} -Signal zeichnete sich dabei durch einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um mindestens 50% im Vergleich zur unmittelbar vorher gemessenen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und einem folgenden Abfall von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ aus.

Reagible Zellen	Anteil	der	Zellen	an	der	Gesamtzellzahl	des
	Untersuc	hungsbe	ereiches,	die	in der	Interventionsphase	mit
	mindeste	ns ein	em char	akter	istischer	n Ca ²⁺ -Signal rea	giert
	haben						
maximale [Ca ²⁺] _{zyt}	höchster	ger	messener		Ca ²⁺ -We	ert während	der
([Ca ²⁺] _{max})	Ausgang	sbeding	ungen un	d wäł	hrend de	r Interventionsphase	Э
Frequenz	Anzahl	der	charak	terist	tischen	Ca ²⁺ -Signale	pro

UntersuchungszeitraumLatenzZeitraum bis zum ersten Auftreten eines charakteristischenCa2+-Signals

3.10. *In situ* Mikroskopie von Endothelzellen subpleuraler kapillarer Venolen in der isoliert perfundierten Rattenlunge

3.10.1. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden nach dem § 8 des Tierschutzgesetzes durch das "Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz- Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg" genehmigt. Die Tierversuche wurden entsprechend der Richtlinien der Tierschutzkommission durchgeführt.

Für die Versuche wurden Sprague Dawley Ratten von der Firma Charles River Deutschland GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 437,61 g ± 54,76 g. Die Ratten wurden bis zum jeweiligen Versuchstag in Käfigen mit je drei Ratten bei konstanten 24°C, 50% Luftfeuchtigkeit, einem 12 Stunden Tag-/Nachtrhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter gehalten. Der Transport der Ratten in die Laborräume der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der Versuche in einem Transportkäfig.

3.10.2. Funktion und Aufbau des Perfusionssystems

Das Perfusionssystem bestand aus einem venösen Reservoir, einer Rollerpumpe, einem Blasenfänger, einem Wärmetauscher sowie den beiden Druckmessern.

Das venöse Reservoir (20 ml) war auf Höhe der Lunge angebracht. Von hier wurde das Perfusat durch die Rollerpumpe weiterbefördert. Die verwendete Pumpe konnte Pumpleistungen im Bereich von 0,09 ml/min bis zu 199 ml/min erbringen und wurde während des Versuches auf einen Wert von 3 ml/min eingestellt. Über den Blasenfänger, in dem ein Flüssigkeitsspiegel von 2-3 cm eingestellt wurde, wurde das Perfusat durch ein Wasserbad gepumpt und anschließend mit 37°C über den arteriellen Schenkel in die Pulmonalarterie appliziert. Hier war die arterielle Druckleitung für die kontinuierliche Druckmessung mit dem System verbunden. Die in dem linken Vorhof gelegene Kanüle drainierte das venöse Blut in den venösen Schenkel des Perfusionssystems, mit dem - analog zur arteriellen Seite - der venöse Druckleiter verbunden war. Über einen Bypass-Schenkel im venösen System konnte ein Mikrokatheter in der Lunge platziert werden. Aus dem venösen Schenkel lief das Perfusat passiv wieder in das venöse Reservoir.



Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus der in situ Mikroskopie.

3.10.3. Anästhesie und Beatmung

Zur Vorbereitung auf den Versuch wurde das gesamte Perfusionssystem nacheinander mit 20 ml physiologischer Kochsalzlösung, aktiviertem HBS-Puffer und Humanalbumin gespült und entlüftet.

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Inhalation von 5 Volumen% Isofluran (Furane) bei einem Sauerstofffluss von 6L/min. Bei Verlangsamung der Spontanatmung als Indikator für den Beginn der Narkose wurden die Ratten mittels intraperitonealer Injektion von 1,2 ml Ketanest (25 mg Ketamin) und 1,0 ml Rompun 2% (25 mg Xylazin) anästhesiert. Dieses Anästhesieverfahren besitzt eine hohe analgetische Potenz und ermöglicht die chirurgische Präparation bei Spontanatmung der Tiere.

Nach Erlöschen der Schutzreflexe auf Schmerzreize erfolgte der Hautschnitt durch einen medianen Längsschnitt von unterhalb des Larynx über die gesamte Länge des Thorax. Die Trachea wurde stumpf freipräpariert und infraglottisch durch Querinzision zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet. Eine ca. 1cm lange stumpfe Kanüle wurde vorgeschoben und mit zwei Fäden (0- Perma-Handseide) fixiert. Über diese Kanüle erfolgte für die Dauer der Präparation die kontrollierte Beatmung mit Raumluft mit einer Frequenz von 115/min und einem PEEP von 5 cm H₂O. Das Mediastinum wurde durch eine totale Sternotomie und den Einsatz eines Thoraxspreizers zugänglich gemacht. Mittels einer feinen Kanüle wurde die Herzspitze punktiert und Heparin (10.000 IE) appliziert. Je nach Größe des Tieres wurden dann über diese Kanüle 10 bis 15 ml Vollblut aspiriert, mit welchem dann die extrakorporale Spüllösung des Perfusionssystems ausgetauscht wurde, sodass die Lunge mit autologem Blut perfundiert wurde.

Über eine Inzision des rechten Ventrikels wurde die arterielle Kanüle in die Pulmonalarterie vorgeschoben und mit einem Faden (0-Perma-Handseide) fixiert. Entsprechend wurde eine venöse Kanüle über den linken Ventrikel im Ansatz der Pulmonalvenen platziert und befestigt. Die Lunge wurde vorsichtig mit Trachea und Herz en bloc herauspräpariert und an das extrakorporale Perfusionssystem sowie die Ventilation angeschlossen. Es erfolgte eine apnoeische Beatmung mit einem positiven Atemwegsdruck von 5 cm H₂O mit 0,6 L/min Sauerstoff, 3 L/min Stickstoff und 0,05 L/min Kohlenstoffdioxid. Während des Versuches lagerte die Lunge in einer Petrischale (90x20 0,9%iger NaCI-Lösung angefeuchteten mm) auf mit

Mullkompressen (5x5 cm) und war mit einer ebenfalls befeuchteten, luftdichten Verpackungsfolie abgedeckt. Der gesamte Versuchsaufbau stand auf einem *Piezodrive*-Mikroskopiertisch.

Durch die Präparation entstandene Atelektasen wurden durch einmaliges, dezentes Überblähen der Lunge wieder geöffnet. Es wurden Lungen verwendet, die eine homogen rötliche Färbung aufwiesen, keine Zeichen von Hämostasen, Hämorrhagien oder ausgeprägten Atelektasen hatten und stabile Perfusionsdrücke boten.

3.10.4. Hämodynamik

Zur Bestimmung des pulmonalarteriellen (PA) sowie des linksatrialen Drucks (LA) wurden sowohl der arterielle als auch der venöse Schenkel des Perfusionssystems mit den Druckwandlern verbunden und die Drücke kontinuierlich an einem Monitor abgelesen.

Die Druckwandler waren auf Lungenhöhe eingestellt. Der PA-Druck lag in einem Bereich zwischen 6 cmH₂O und 9 cmH₂O. Der LA-Druck war auf einen Wert von 2 cmH₂O eingestellt und konnte über die Höhe des venösen Abflusses reguliert werden.

3.10.5. Mikrokatheterisierung

Über die Vena pulmonalis wurde ein Führungskatheter (0,86 mm ID 1,27 mm OD) in das zu untersuchende Lungensegment vorgeschoben und über diesen wiederum ein sehr feiner Mikrokatheter (0,28 mm ID 0,61 mm OD) bis in Wedge-Position eingebracht. Das so isolierte, kleine, an der Lungenoberfläche gelegene Areal wurde über den Mikrokatheter mittels eines Perfusors isoliert perfundiert (1 ml/h). Durch die niedrige Flussrate sollten die untersuchten Kapillaren möglichst geschont und das Austreten von Farbstoff verhindert werden, um möglichst spezifisch nur die Endothelzellen anzufärben, welche die Wand der Kapillaren auskleiden, die im gewünschten Areal liegen (Kuebler et al. 1999).

In dem Untersuchungsareal wurde eine subpleurale kapillare Venole unter dem

Fluoreszenzmikroskop aufgesucht. Dazu wurde in Auflichtmikroskopie in der entsprechend präparierten Lunge in dem Areal, das von dem mikrokatheterisierten Gefäß versorgt wird, ein subpleurales Gefäß aufgesucht, welches in Richtung abnehmendem Lumens perfundiert war und damit einer retrograd perfundierten Venole entsprach (Bhattacharya et al. 1992). Nach Anfärben der Endothelzellen mit Fura-2 waren die gute Abgrenzbarkeit sowie die kräftige Anfärbung der einzelnen Endothelzellen und möglichst geringe Überlagerungen des Gefäßes von Endothelzellen in anderen Ebenen weitere Kriterien zur Bestimmung eines idealen Messortes.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der in situ Mikroskopie.

3.10.6. Experimentelles Versuchsprotokoll

3.10.6.1. Versuchsablauf

Zum Anfärben der pulmonalen Endothelzellen wurde das isolierte Areal über den Mikrokatheter für 45 min mit 1 ml 5µM Fura-2-AM Lösung in HBS perfundiert.

In allen Versuchsgruppen erfolgte die Messung von [Ca²⁺]_{zyt} zu Ausgangsbedingungen bei Perfusion mit Ca²⁺- haltigem HBS über 15 min. Es folgte die Perfusion mit 5*10⁵ CFU/mI WT-Pneumokokken (WT), PLY-defizienten

Pneumokokken (ΔPLY), Kapsel-defizienten Pneumokokken (ΔCPS) oder 5 ng isoliertem PLY über 45 min. Entsprechende Kontrollgruppen wurden ebenfalls etabliert, um mögliche Fehler zu erkennen bzw. eine Vergleichbarkeit zu schaffen.

3.10.6.2. Versuchsgruppen

Tabelle 5: Versuchsgruppen der in situ Versuche

Gruppe	Anzahl der Versuche (n)	Definition
Kontrolle	5	Kontrolle
WT	5	WT-Pneumokokken
ΔCPS	5	Kapsel-defizient
ΔPLY	8	PLY-defizient
PLY	5	Pneumolysin

Analog zu den *in vitro* Versuchen erfolgte die Untersuchung der Versuchsgruppen *in situ* mit der Zielsetzung, die Veränderung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in Reaktion auf Pneumokokken in pulmonalen Endothelzellen zu untersuchen. Um den Einfluss des jeweiligen Virulenzfaktors auch *in situ* beurteilen zu können, wurden Experimente in den Gruppen Δ CPS und Δ PLY durchgeführt.



Insgesamt wurden 23 Ratten randomisiert in folgenden Versuchsgruppen untersucht:

Abbildung 8: Versuchsgruppen in der isoliert perfundierten Rattenlunge. Dargestellt sind die Versuchsgruppen, Kontrolle, Wildtyp (WT), Kapsel-defizient (Δ CPS) und PLY-defizient (Δ PLY). In allen Versuchsgruppen erfolgte eine Aufzeichnung der [Ca²⁺]_{zyt} zu Ausgangsbedingungen bei Perfusion mit HBS über 15 min (hellgrau hinterlegt). Während der Intervention wurden die subpleurale kapillare Venole über 45 min entsprechend der genannten Gruppe mit HBS alleine oder mit 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken des Stammes D39 WT, D39 Δ CPS oder D39 Δ PLY perfundiert (dunkelgrau hinterlegt).

3.10.7. Mikroskopie

Die Fluoreszenzmessung in der isoliert perfundierten Rattenlunge wurde analog zu den *in vitro* Versuchen mittels MetaFluor-Technik und Kalibration durchgeführt. Zur Mikroskopie wurden hierzu ein Mikroskop (Axiotech Vario) und eine Lampe (VSB HBO 100), die speziell für die *in situ* Mikroskopie geeignet sind, genutzt.

3.10.8. Messparameter

Folgende Endpunkte wurden analog zu den *in vitro* Versuchen bei der Messung *in situ* mit Fura-2 generiert und bewertet: Ein Ca²⁺-Signal zeichnete sich dabei durch einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um mindestens 50% im Vergleich zur unmittelbar vorher gemessenen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und einem folgendem Abfall von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ aus.

Tabelle 6: Endpunkte

Reagible Zellen	Anteil	der	Zellen	an	de	er	Gesamtzellzahl	des
	Untersuc	hungsb	ereiches,	die	in o	der	Interventionsphase	mit
	mindeste	ns eine	m charakte	eristi	scher	n Ca	²⁺ -Signal reagiert hal	ben
maximale	höchster	ge	messener		Ca ²⁺	⁺-We	ert während	der
[Ca ²⁺] _{zyt} ([Ca ²⁺⁻	Ausgangsbedingungen und während der Interventionsphase							
] _{max})								
Frequenz	Anzahl	der	charak	cteris	tisch	en	Ca ²⁺ -Signale	pro
	Untersuc	hungsz	eitraum					
Latenz	Zeitraum	bis zun	n ersten A	uftret	ten ei	ines	charakteristischen C	a ²⁺ -
	Signals							

3.11. Statistik

Die Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms "SigmaStat" der Firma SPSS Inc. (Chicago, USA) auf statistische Signifikanz hin analysiert und die Werte als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) dargestellt. Der Vergleich zweier unabhängiger Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney Rank Sum Test. Ein Vergleich zwischen mehreren unabhängigen Gruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks und der nachfolgenden Dunn's Method. Ein p-Wert <0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. In vitro Versuche an HPMEC

Gruppe	Anzahl Zellen/Versuch MW ± SD
Kontrolle	13,17 ± 3,41
WT	11,71 ± 4,5
ΔCPS	6,33 ± 1,37
ΔPLY	12,33 ± 2,58
PLY	10,83 ± 2,79
K- ØCa ²⁺	11,00 ± 5,29
WT-ØCa ²⁺	6,50 ±4,50
PLY-ØCa ²⁺	2,86 ± 4,49
K-TG	13,50 ± 5,32
WT-TG	6,67 ± 4,03
PLY-TG	10,10 ± 1,34
K-RO	13,00 ± 1,2
WT-RO	10,29 ± 1,8

4.1.1. Effekt einer Inkubation mit Pneumokokken auf [Ca²⁺]_{zyt}

Durch die intrazelluläre Ca²⁺-Messung mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte ein hochauflösendes Bild von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und damit der gesamten Zelle in Echtzeit aufgenommen und analysiert werden. Durch die hohe räumliche Auflösung dieses Verfahrens konnte die spezifische Messung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einzelnen Zellen erfolgen und damit der Verlauf von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ über eine lange Zeit und mit geringen Überlagerungs- und Störfaktoren erfolgen.

In der Falschfarbendarstellung der Ratio der Fluoreszenzintensität leuchtete das Ca²⁺- haltige Zytoplasma unter Ausgangsbedingungen blau bis grün. Der Anstieg von [Ca²⁺]_{zyt} wurde durch einen Farbumschlag von blau/grün auf gelb/rot angezeigt.



Ausgangsbedingungen



D39 WT

Abbildung 9: Repräsentative Aufnahmen mehrerer HPMEC *in vitro*, dargestellt als Fura-2-Ratio von 340/380 nm in Falschfarben unter Ausgangsbedingungen (links) und nach 30-minütiger Inkubation mit 5*105CFU/ml D39 WT (rechts). Es können jeweils die einzelnen Zellen durch das angefärbte Ca²⁺ im Zytosol abgegrenzt werden. Dadurch kann [Ca²⁺]_{zyt} jeder Zelle einzeln über den Versuch hinweg gemessen und darüber hinaus die räumliche Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt} beurteilt werden.

Während der Inkubation mit Pneumokokken D39 WT konnten in HPMEC wiederholt [Ca²⁺]_{zvt} Anstiege mit anschließendem Abfall kurzzeitige von auf die Ausgangskonzentration beobachtet werden. Dieses Ca²⁺-Signal trat stets mit einer Beginn der gewissen Verzögerung zum Intervention auf und war im Untersuchungszeitraum in derselben Zelle mehrfach zu beobachten. Eine genauere Beschreibung des Signals erfolgt über die Auswertung der [Ca²⁺]_{max}, der Anzahl der HPMEC, die ein Ca²⁺-Signal zeigten, die Latenz bis zum ersten Ca²⁺-Signal und die Frequenz der Ca²⁺-Signale im Folgenden.



Abbildung 10: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einzelnen HPMEC *in vitro* vor und während der Applikation von 5*10⁵CFU/ml D39 WT (unten). Und der Kontrollgruppe ohne Applikation von Pneumokokken (oben), jeweils mit Positivkontrolle durch 100 µM ATP. Wie in der unteren Abbildung deutlich wird trat das Ca²⁺-Signal nach einer Latenz auf. Es erfolgte ein schneller Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ gefolgt von einer kurzen Plateauphase und einem Abfall von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf das Ausgangsniveau. Diese Veränderung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ war im Untersuchungszeitraum in derselben Zelle mehrfach zu beobachten.

In den Versuchen stellte sich heraus, dass 5 ng/ml PLY ein Signal erzeugte, das mit dem Ca²⁺-Signal, welches durch den WT ausgelöst wurde, vergleichbar war. Unterhalb einer bestimmten PLY-Konzentration (<1 ng/ml) konnte kein Signal mehr ausgelöst werden, wohingegen über einer kritischen Konzentration (>40 ng/ml) ein starker Ca²⁺-Einstrom stattfand. Dieser war nicht reversibel und erreichte

unphysiologische $[Ca^{2+}]_{zyt}$, die mit einer regelhaften Zellfunktion nicht mehr vereinbar waren.



Abbildung 11: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einzelnen HPMEC *in vitro* vor und während der Applikation von 40 ng/ml PLY (unten) und 1 ng/ml (oben). Positivkontrolle mit 100 µM ATP unten nicht gezeigt. Wie in der unteren Abbildung deutlich wird führt die Inkubation mit 40 ng/ml PLY zu einem sehr ausgeprägten, nicht reversiblen Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle. Durch die Inkubation mit 1 ng/ml PLY wird kein Ca2+-Signal ausgelöst.

4.1.2. Untersuchung der Rolle Pneumokokken-spezifischer Virulenzfaktoren auf die [Ca²⁺]_{max}

In der Kontrollgruppe lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ zu Ausgangsbedingungen bei 72,15 nM ± 30,37 nM und zu Interventionsbedingungen bei 76,38 nM ± 25,17 nM. In der Gruppe WT stieg die $[Ca^{2+}]_{max}$ signifikant von 77,31 nM ± 42,4 nM auf 404,33 nM ± 240,65 nM während der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT.

Vergleichbares zeigte sich in der Gruppe Δ CPS bei Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ CPS; die [Ca²⁺]_{max} stieg signifikant von 109,00 nM ± 52,05 nM auf 618,52 nM ± 452,36 nM an. Kein Anstieg der [Ca²⁺]_{max} ergab sich dagegen bei Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY in der Gruppe Δ PLY mit 101,55 nM ± 98,32 nM im Vergleich zu 111,56 ± 103,74 nM zu Ausgangsbedingungen. In der Gruppe PLY kam es während der Intervention zu einem signifikanten Anstieg auf 811,93 nM ± 257,92 nM, ausgehend von 81,31 nM ± 60,27 nM durch Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY.



Abbildung 12: Gruppenanalyse der $[Ca^{2+}]_{max}$ zu Ausgangsbedingungen und während der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml verschiedener Pneumokokken-Varianten bzw. 5 ng/ml isoliertem PLY in HPMEC. Dargestellt als MW ± SD, * = p < 0.05 versus Ausgangsbedingungen, # = p<0.05 PLY und Δ CPS versus Kontrolle.

4.1.3. Untersuchung zur Anzahl reagibler Zellen anteilig an der Gesamtzahl an Zellen einer Gruppe

In der Kontrollgruppe blieb $[Ca^{2+}]_{zyt}$ während der Inkubation mit HBS unverändert. Dagegen reagierten in der Gruppe WT 80,38% ± 12,36% der Zellen mit einem charakteristischen Ca²⁺-Signal in der Interventionsphase bei Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT und damit signifikant mehr als in der Kontrollgruppe. In der Gruppe Δ CPS zeigten 52,88% ± 32,94% der Zellen eine Reaktion in Form eines Ca²⁺-Signals auf die Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ CPS. In der Gruppe Δ PLY konnte hingegen, wie in der Kontrollgruppe, keine Veränderung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in den untersuchten Zellen auf die Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY gemessen werden (0%). In der Interventionsphase in der Gruppe PLY reagierten abermals 91,91% ± 7,65% der HPMEC auf die Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY. Zwischen den Gruppen WT, Δ CPS und PLY waren keine Unterschiede feststellbar.



Abbildung 13: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl einer Gruppe. Dargestellt als MW \pm SD * = n < 0.05 versus Kontrollarunge

4.1.4. Untersuchung zur Latenz von Beginn der Intervention bis zum Auftreten des ersten Ca²⁺-Signals

In den Gruppen WT und Δ CPS trat das Ca²⁺-Signal mit einer Verzögerung (Latenz) von 20,03 min ± 9,77 min bzw. 20,79 min ± 12,86 min nach Beginn der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT bzw. D39 Δ CPS auf. Da in der Gruppe Δ PLY, wie in der Kontrollgruppe, keine Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt} in den untersuchten Zellen auf die Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY gemessen wurde, konnte in dieser Gruppe keine Latenz angegeben werden. Die Latenz in der Gruppe PLY betrug 11,46 min ± 7,41 min nach Beginn der Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY. Hier waren die Ergebnisse der Gruppen WT und Δ CPS jeweils gegen die Kontrolle, in welcher keine Reaktion auf HBS festgestellt wurde, signifikant. Zwischen diesen Gruppen selbst war aber kein Unterschied feststellbar.



Abbildung 14: Gruppenanalyse der Latenz bis zum ersten Ca²⁺-Signal in HPMEC. Dargestellt als MW \pm SD, * = p < 0,05 versus Kontrollgruppe.

4.1.5. Untersuchung zur Frequenz des Ca²⁺-Signals über die Dauer des Versuchs

In den Gruppen WT und Δ CPS trat das Ca²⁺-Signal mit einer Frequenz von 4,63/45min ± 2,25/45min bzw. 3,83/45min ± 1,44/45min nach Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT bzw. D39 Δ CPS auf und damit in beiden Gruppen signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe. Während der Intervention mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY in der Gruppe Δ PLY war keine Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt} messbar, wohingegen in der Gruppe PLY mit 7,22/45min ± 2,97/45min Ca²⁺-Signalen Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle während der Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY zu beobachten waren. Zwischen den Gruppen WT, Δ CPS und PLY selbst waren keine Unterschiede feststellbar.



Abbildung 15: Gruppenanalyse der Häufigkeit des Ca²⁺-Signals über die 45-minütige Interventionsphase in HPMEC. Dargestellt als MW \pm SD, * = p < 0,05 versus Kontrollgruppe.

4.1.6. Rolle von extra- und intrazellulären Ca²⁺-Speichern bei der Induktion des Pneumokokken-induzierten Ca²⁺-Signals

Neben einer Analyse der $[Ca^{2+}]_{max}$, Anzahl reagibler Zellen, Latenz und Frequenz untersuchten wir auch die Form und damit die Dynamik und Dauer des Ca²⁺-Signals bei Inkubation mit Pneumokokken. Unter Ca²⁺-freien Bedingungen hielt der Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in Reaktion auf 5*10⁵ CFU/ml D39 WT nur wenige Sekunden an. Es zeigte sich bei der Auftragung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ gegen die Zeit ein spitzes schmales Ca²⁺-Signal (Absinken der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Ausgansniveau in < 3 min). Bei vergleichbarer maximaler $[Ca^{2+}]_{zyt}$ stieg nach Vorinkubation mit TG $[Ca^{2+}]_{zyt}$ weniger schnell an und es dauerte zudem länger, bis $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wieder auf das Ausgangsniveau abgefallen war. So entstand ein breitbasiges Ca²⁺-Signal (Absinken der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Ausgansniveau in > 3 min). Nach der Vorinkubation mit 50 µM RO waren während der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT sowohl schmale als auch breitbasige Ca²⁺-Signale zu beobachten. Es wurden jeweils Positivkontrollen durchgeführt indem ein deutlicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ mit 100 µM ATP in Ca²⁺-freiem HBS-Puffer und nach Vorinkubation mit RO bzw. 10 µM 4α-PDD nach Vorinkubation mit TG induziert wurde.



Abbildung 16: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einzelnen Endothelzellen *in vitro* vor und während der Applikation von D39 WT in Ca²⁺-freiem HBS-Puffer (oben links), nach Inhibition der ER-Ca²⁺-ATPasen durch 10 μ M TG (oben rechts) und der Inhibition des mitochondrialen Komplex I durch 50 μ M RO (unten links). Die adäquate Entleerung und Hemmung des ERs durch 10 μ M TG wurde in Vorversuchen durch Applikation von 100 μ M ATP verifiziert. Die Positivkontrollen wurden mit 100 μ M ATP in Ca²⁺-freiem HBS-Puffer und nach Vorinkubation mit RO bzw. 10 μ M 4 α -PDD nach Vorinkubation mit TG durchgeführt.

4.1.6.1. Reagibilität der HPMEC auf Pneumokokken unter spezifischen Versuchsbedingungen

Wie zuvor bereits gezeigt reagierten $80,38\% \pm 12,36\%$ der Zellen unter Standardbedingungen auf die Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT mit einem Ca²⁺-Signal. In Ca²⁺-freier Pufferlösung reagierten noch 46,01% ± 35,81% mit einer Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt}. Nach Vorinkubation mit 10 µM TG reagierten in der Gruppe WT-TG 62,41% ± 25,72% der HPMEC auf 5*10⁵ CFU/ml D39 WT. In der Gruppe WT-RO reagierten nach der Vorinkubation mit 50 µM RO während der Applikation von 5*10⁵ CFU/ml D39 WT 87,81% ± 15,2% der HPMEC. In den jeweiligen Kontrollgruppe Kontrolle, K-ØCa²⁺ bzw. K-TG zeigten jeweils 0% der HPMEC ein Ca²⁺-Signal. Die Gruppe WT-RO zeigte ebenfalls einen Unterschied zu der Kontrollgruppe K-RO, die mit 10,58% ± 12,55% reagiblen Zellen die einzige der Kontrollgruppen war, in der die Zellen einen Anstieg von [Ca²⁺]_{zyt} zeigten.



Abbildung 17: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl pro Gruppe bei angegebenen Untersuchungsbedingungen. Dargestellt als MW \pm SD. * = p < 0,05 versus jeweiliger Kontrollgruppe.

4.1.6.2. Die [Ca²⁺]_{max} bei Inkubation mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT-Pneumokokken unter spezifischen Untersuchungsbedingungen

In der Gruppe WT lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ unter Standardbedingungen (HBS) in der Interventionsphase bei 404,33 nM ± 240,65 nM, was ein Unterschied im Vergleich zur Interventionsphase der Kontrollgruppe mit 76,38 nM ± 25,17 nM darstellte. Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen stieg die $[Ca^{2+}]_{max}$ der Interventionsphase in der Gruppe WT-ØCa²⁺ bei Inkubation mit 5*10⁵ CFU/mI D39 WT auf 279,45 nM ± 154,94 nM an, im Vergleich zur Kontrollgruppe K- ØCa²⁺, die mit 55,37 nM ± 14,98 nM nahe dem Ausgangswert verblieb. Nach der Vorinkubation mit 10 μ M TG stieg die $[Ca^{2+}]_{max}$ während der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/mI D39 WT ebenfalls signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe K-TG von 135,96 nM ± 27,49 nM auf 581,86 nM ± 378,49 nM an. Ein signifikanter Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe K-RO mit 184,74 nM ± 81,99 nM zeigte sich nach der Vorinkubation mit 50 μ M RO während der Inkubation mit 5*10⁵ CFU/mI D39 WT mit einem $[Ca^{2+}]_{zyt}$ von 379,07 nM ± 54,17 nM.



Abbildung 18: Gruppenanalyse der $[Ca^{2+}]_{max}$ in HPMEC zum Interventionszeitraum bei angegebenen Untersuchungsbedingungen. Dargestellt als MW ± SD. * = p < 0,05 versus jeweiliger Kontrollgruppe.

Reagibilität der HPMEC bei Inkubation mit isoliertem PLY unter spezifischen Versuchsbedingungen

Analog zu den Versuchen mit Pneumokokken führten wir Versuche mit isoliertem PLY aus WT-Pneumokokken durch. In der Gruppe PLY führte die Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY unter Standardbedingungen mit Ca²⁺-haltigem HBS bei 91,91% \pm 7,65% der HPMEC zu einem Ca²⁺-Signal. Unter Ca²⁺-freien Bedingungen reagierten 20,35% \pm 29,42% auf die Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY in der Gruppe PLY-ØCa²⁺. Nach Vorinkubation mit 10 μ M TG reagierten in der Versuchsgruppe PLY-TG 83,82% \pm 14,98% der HPMEC auf 5 ng/ml isoliertes PLY. Damit reagierten auch hier in allen drei Versuchsgruppen PLY, PLY-ØCa²⁺ und PLY-TG signifikant mehr HPMEC auf die Intervention als in den entsprechenden Kontrollgruppen Kontrolle, K-ØCa²⁺ bzw. K-TG.



Abbildung 19: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl pro Gruppe bei angegebenen Untersuchungsbedingungen. Dargestellt als MW \pm SD. * = p < 0,05 versus jeweiliger Kontrollgruppe.

4.1.6.3. Die [Ca²⁺]_{max} bei Inkubation mit isoliertem PLY unter spezifischen Untersuchungsbedingungen

In der Interventionsphase lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ während der Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY in der Gruppe PLY zu Standardbedingungen signifikant höher mit 811,93 nM ± 257,92 nM als in der Kontrolle bei einer Konzentration von 76,36 nM ± 25,17 nM. In der Gruppe PLY-ØCa²⁺ unter Ca²⁺-freien Bedingungen lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ bei Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY bei 870,2 nM ± 1105,7 nM, mit einem Unterschied zu der Kontrollgruppe K-ØCa²⁺ ebenfalls unter Ca²⁺-freien Bedingungen mit 55,37 nM ± 14,98 nM. In der Gruppe PLY-TG war nach der Vorinkubation mit 10 µM TG und während der Inkubation mit 5 ng/ml isoliertem PLY die $[Ca^{2+}]_{max}$ auf 541,08 nM ± 239,58 nM signifikant mehr als in der Kontrollgruppe K-TG mit 135,96 nM ± 27,49 nM.



Abbildung 20: Gruppenanalyse der $[Ca^{2+}]_{max}$ in HPMEC zum Interventionszeitraum bei angegebenen Untersuchungsbedingungen. Dargestellt als MW ± SD, * = p < 0,05 versus jeweiliger Kontrollgruppe.

4.1.6.4. Einordnung der Ergebnisse aus Versuchen an HPMEC unter spezifischen Versuchsbedingungen

Versuchsgruppen, in denen eine Ca²⁺-freie Umgebung geschaffen wurde

Um die Möglichkeit eines Ca^{2+} -Einstroms von extrazellulär als Komponente des Ca^{2+} -Signals zu untersuchen, wurden die Endothelzellen während der Intervention einer Ca^{2+} -freien Umgebung ausgesetzt. Wenn die Ca^{2+} -Signale alleine durch einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} entstehen würden, hätte so ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ vollständig ausbleiben müssen. Auffällig war das Auftreten von schmalen, spitz konfigurierten Ca^{2+} -Signalen.

Die Ergebnisse der Versuche unter Ca²⁺-freien Bedingungen zeigten explizit, dass auch ohne Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär weiterhin Ca²⁺-Signale generiert werden.

Versuchsgruppen, in denen mit TG vorinkubiert wurde

Die Versuche haben gezeigt, dass trotz der Inkubation mit TG weiterhin eine Reaktion in Form von Ca²⁺-Signalen stattfindet. Diese Reaktion ist in dem Anteil reagierender Zellen mit den Versuchen der WT vergleichbar, wenn auch tendenziell etwas weniger Zellen reagieren. Auch die [Ca²⁺]_{max} der Versuche mit TG unterscheidet sich nicht signifikant von der [Ca²⁺]_{max} der WT-Versuche. Auffällig war das Auftreten von breit konfigurierten Ca²⁺-Signalen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das ER nicht alleine für die Generierung des Ca²⁺-Signals verantwortlich sein kann.

Versuchsgruppen, in denen mit RO vorinkubiert wurde

Eine Beobachtung war, dass RO alleine schon in 10,58% \pm 12,55% der Zellen einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ für kurze Zeit verursachen kann. Diese Anstiege von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ waren dem beschriebenen Ca²⁺-Signal ähnlich. Trotz dieser Reaktion von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf RO in den HPMEC konnte ein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Interventionsgruppe mit dem D39 WT in der Reagibilität und der $[Ca^{2+}]_{max}$ nachgewiesen werden. In den Versuchen fand eine eindeutige Reaktion in Form von Ca²⁺-Signalen auf den D39 WT statt. Diese Signale waren außerdem von der Konfiguration her den Ca²⁺-Signalen unter Standardbedingungen ähnlich.

Zusammenfassung

Die quantitative Auswertung der Untersuchungen dreier möglicher Ca²⁺-Quellen für die PLY-induzierten Ca²⁺-Signale zeigt, dass weder ein alleiniger Einstrom von Ca²⁺ in das Zytosol von extrazellulär, noch aus dem ER das Ca²⁺-Signal ausreichend beschreibt. Die Ergebnisse der Versuche, in denen durch RO eine Blockierung des mitochondrialen Komplex I erreicht wurde, machen eine Beteiligung des Mitochondriums zumindest weniger wahrscheinlich.

4.2. *In situ* Versuche in subpleuralen Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge

Um die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten in einem perfundierten Organ zu wiederholen, wurde an Endothelzellen subpleuraler Venolen in der isoliert perfundierten Rattenlunge ebenfalls $[Ca^{2+}]_{zyt}$ vor und während der Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml Pneumokokken gemessen. Auch hier wurde die Anzahl reagibler Zellen, die $[Ca^{2+}]_{max}$ unter Ausgangsbedingungen und während der Interventionsphase sowie die Latenz und die Frequenz der beobachteten $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege bestimmt und die Rolle verschiedener Virulenzfaktoren auf diese Parameter untersucht.

Tabelle 8: Versuchsgruppen der in situ Versuche

Gruppe	Gewicht (g) MW ± SD	Anzahl Zellen/Versuch MW \pm SD
Kontrolle	454,8 ± 77,04	7,2 ± 3,77
WT	$420,8 \pm 70,84$	8,4 ± 2,88
ΔCPS	424 ± 26,27	$7,4 \pm 2,07$
ΔPLY	410,5 ± 30,4	$7,0 \pm 2,35$
PLY	445,4 ± 49,29	7 ,2 ± 3,5

4.2.1. Effekt einer Inkubation mit Pneumokokken auf [Ca²⁺]_{zyt} in situ

Durch die intrazelluläre Ca²⁺-Messung mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte ein hochauflösendes Bild einer subpleuralen Venole erzeugt werden. In diesem konnten die einzelnen Endothelzellen vom umgebenden Gewebe und speziell den Alveolen abgegrenzt werden. Nur durch diese räumliche Auflösung konnte die spezifische Messung von [Ca²⁺]_{zyt} in einzelnen Zellen erfolgen und damit der Verlauf von [Ca²⁺]_{zyt} über eine lange Zeit und mit geringen Überlagerungs- und Störfaktoren in der Lunge erfolgen.

Auch in der isoliert perfundierten Rattenlunge konnte während der Perfusion mit Pneumokokken die Induktion eines Ca²⁺-Signals in subpleural gelegenen Endothelzellen beobachtet werden.

In der Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzintensität leuchtete das Ca^{2+} -haltige Zytoplasma blau bis grün. Der Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurde durch einen Farbumschlag von blau/grün auf gelb/rot angezeigt.



Ausgangsbedingungen

D39 WT

Abbildung 21: Repräsentative Aufnahmen einer pulmonalen subpleuralen Venole, dargestellt als Fura-2-Ratio von 340/380 nm in Falschfarben unter Ausgangsbedingungen (links) und nach 25-minütiger Applikation von 5*10⁵ CFU/ml D39 WT (rechts). Es können jeweils die Endothelzellen, die die Venole begrenzen, durch das angefärbte Ca²⁺ im Zytosol dargestellt werden. Dadurch kann [Ca²⁺]_{zyt} jeder Zelle einzeln über den Versuch hinweg gemessen. Von diesen deutlich abgegrenzt sind die Alveolen, die als luftgefüllter Raum eine geringere Ratio haben.



Abbildung 22: Repräsentative Darstellung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einzelnen Endothelzellen pulmonaler Venolen vor und während der Applikation von 5*10⁵CFU/ml D39 WT (unten). Kontrollgruppe ohne Applikation von Pneumokokken (oben). Positivkontrolle mit 5 μ M 4 α -PDD nicht gezeigt.

4.2.2. Untersuchung der Rolle Pneumokokken-spezifischer Virulenzfaktoren auf die [Ca²⁺]_{max} *in situ*

Bei Perfusion des Untersuchungsareals mit HBS über 45 min zeigte sich keine Veränderung der $[Ca^{2+}]_{max}$ (125,99 nM ± 24,74nM) im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (132,84 nM ± 27,24 nM).

Bei der Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ bei 408,42nM ± 94,22 nM, was eine signifikante Veränderung gegenüber der $[Ca^{2+}]_{max}$ der Ausgangsbedingungen von 140,89 nM ± 54,27 nM darstellte. In der Gruppe Δ CPS lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ der Interventionsphase bei 464,13 nM ± 192,68 nM, was ebenfalls eine signifikante Veränderung gegenüber der $[Ca^{2+}]_{max}$ der Ausgangsbedingungen von 130,76 nM ± 23,95 nM darstellte.

Im Gegensatz dazu haben $5*10^5$ CFU/mI D39 Δ PLY zu keiner signifikanten Veränderung der $[Ca^{2+}]_{max}$ in der Interventionsphase 169,48 nM ± 40,38 nM im Vergleich zu der $[Ca^{2+}]_{max}$ der Ausgangsbedingungen (168,84 nM ± 42,17 nM) geführt.

Bei der Perfusion mit 5 ng/ml isoliertem PLY hingegen lag die $[Ca^{2+}]_{max}$ mit 589,81 nM ± 206,13 nM wiederum signifikant höher als zu Ausgangsbedingungen mit 86,32 nM ± 14,6 nM.



Abbildung 23: Gruppenanalyse der $[Ca^{2+}]_{max}$ zu Ausgangsbedingungen und während der Applikation von 5*10⁵ CFU/ml verschiedenen Pneumokokken-Varianten bzw. 5 ng/ml isoliertem PLY in Endothelzellen subpleuraler Venolen. Dargestellt als MW ± SD, * = p < 0,05 versus Ausgangsbedingungen, # = p<0.05 PLY und Δ CPS versus Kontrolle.

4.2.3. Untersuchung zur Anzahl reagibler Zellen anteilig an der Gesamtzahl von Zellen einer Gruppe *in situ*

In der isoliert perfundierten Rattenlunge konnten wir analog zu den Versuchen *in vitro* in der Kontrollgruppe kein Ca²⁺-Signal bei Perfusion mit HBS-Puffer beobachten. In der Versuchsgruppe WT reagierten 97,14% ± 6,4% der untersuchten subpleuralen Endothelzellen mit der Induktion eines Ca²⁺-Signals bei Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT. In den Versuchsgruppen Δ CPS reagierten 90,82% ± 14,58% bei Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ CPS. Während der Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY reagierten dagegen 0% der subpleuralen Endothelzellen mit einem Ca²⁺-Signal in der Gruppe Δ PLY. Auf 5 ng/ml isoliertes PLY reagierten hingegen wieder 81,3% ± 25,88% der subpleuralen Endothelzellen. Die Ergebnisse der Messungen aus den Gruppen WT, Δ CPS und Δ PLY waren damit, analog zu den Ergebnissen der *in vitro* Messungen, signifikant gegen die Kontrollgruppe, sowie WT und Δ CPS gegen Δ PLY.



Abbildung 24: Gruppenanalyse des Anteils reagibler Endothelzellen subpleuraler Venolen an der Gesamtzellzahl einer Gruppe, dargestellt als MW \pm SD, * = p < 0,05 versus Kontrollgruppe, #=p<0.05; WT und Δ CPS versus Δ PLY.

4.2.4. Untersuchung zur Latenz von Beginn der Intervention bis zum Auftreten des ersten Ca²⁺-Signals *in situ*

Wie in den *in vitro* Versuchen traten auch in der isoliert perfundierten Rattenlunge die endothelialen Ca²⁺-Signale bei Perfusion mit Pneumokokken stets nach einer gewissen Latenzzeit auf. Diese Latenz lag in der Gruppe WT bei Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 WT bei 20,03 min ± 4,9 min. Bei Perfusion mit 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ CPS in der Gruppe Δ CPS betrug die Latenz 20,61 min ± 6,28 min. Isoliertes PLY (5 ng/ml) induzierte in der Gruppe PLY nach 26,17 min ± 7,12 min ein Ca²⁺-Signal. Da in der Kontrollgruppe bei Perfusion mit HBS und in der Gruppe Δ PLY, in der 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY appliziert wurde, keine Ca²⁺-Signale auftraten, konnte in dieser Gruppe keine Latenz angegeben werden. Die Latenz der Gruppen WT, Δ CPS, PLY war signifikant größer als in der Kontrollgruppe, aber im Vergleich untereinander zeigte sich kein Unterschied.



Abbildung 25: Gruppenanalyse der Latenz bis zum ersten Ca^{2+} -Signal in subpleuralen Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge, dargestellt als MW ± SD. * = p < 0,05 versus Kontrollgruppe.

4.2.5. Untersuchung zur Frequenz des Ca²⁺-Signals über die Dauer des Versuchs *in situ*

Auch in den *in situ* Versuchen traten in der isoliert perfundierten Rattenlunge während der Applikation von Pneumokokken nacheinander mehrere Ca²⁺-Signale in derselben subpleuralen Endothelzelle auf. In der Versuchsgruppe WT fanden sich während der Applikation von 5*10⁵ CFU/ml D39 WT im Durchschnitt 3,01/45 min \pm 0,44/45 min Ca²⁺-Signale. In der Gruppe Δ CPS waren es 4,00/45 min \pm 0,76/45 min Ca²⁺-Signale während der Applikation von 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ CPS und damit ebenfalls signifikant mehr als in der Kontrollgruppe. Bei Applikation von 5 ng/ml isoliertem PLY traten signifikant gegen die Kontrolle 3,30/45 min \pm 1,15/45 min Ca²⁺-Signale auf. Keine Ca²⁺-Signale (0/45min) auf die Applikation von 5*10⁵ CFU/ml D39 Δ PLY zeigten die subpleuralen Endothelzellen in der Gruppe Δ PLY.



Abbildung 26: Gruppenanalyse der Häufigkeit des Ca²⁺-Signals über die 45-minütige Interventionsphase in subpleuralen Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge. Dargestellt als MW \pm SD, * = p < 0,05 versus Kontrollgruppe.

5. Diskussion

5.1. Fluoreszenzmessung mittels Fura-2

Fura-2 ist einer der am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe zur Messung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$. Fura-2 hat eine vergleichsweise hohe Affinität Bindungen zu intrazellulären Proteinen einzugehen. Durch diese Eigenschaft kann es besser als andere Fluoreszenzfarbstoffe in Zellorganellen eindringen. Gleichzeitig steht das gebundene Fura-2 allerdings nicht mehr zur Bindung von Ca^{2+} und damit zur Messung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zur Verfügung, wodurch die Sensitivität sinkt (Ikenouchi et al. 1991).

Trotzdem besitzt Fura-2 im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen eine hohe Sensitivität im Bereich der physiologisch vorliegenden $[Ca^{2+}]_{zyt}$. Ein weiterer Vorteil liegt in der Eigenschaft, eine maximale Emission bei einer Anregung sowohl bei Wellenlängen von 340 nm als auch von 380 nm zu haben, wodurch aus den Werten der Emission eine Ratio berechnet werden kann. Durch die Verwendung der Ratio zur Errechnung von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ können Störfaktoren der Fluoreszenzmessung wie beispielsweise ein langsames Austreten des Farbstoffes aus dem Zytosol oder auch unterschiedlich starke Anfärbung ausgeglichen werden (Takahashi et al. 1999). Damit bietet Fura-2 eine Reihe von Vorteilen vor den Fluoreszenzfarbstoffen der ersten Generation wie z.B. Quin 2.

Ein spezifisches Problem der Fura-2-Fluoreszenzmessung liegt in einer der Eigenschaften des Virulenzfaktors PLY.

Bei sehr hohen PLY-Dosen konnten wir einen starken Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensitäten sowohl bei einer Anregung auf einer Wellenlänge von 340 nm als auch bei 380 nm beobachten. Wir vermuten, dass dieser Verlust von Fluoreszenzfarbstoff auf der vielfach beschriebenen Porenbildung beruht, die in hohen Dosen zu einer ausgeprägten Durchlässigkeit der Zellmembran und zur Apoptose führt (Braun et al. 2002).

Aus dem Verlust von Fura-2 resultierte ein Anstieg des aus der Ratio berechnetem $[Ca^{2+}]_{zyt}$ auf Werte, die weit über dem möglichen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ lagen. Dadurch wird deutlich, dass Fura-2 nicht geeignet ist, $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in Zellen zu messen, die zu hohen Dosen PLY ausgesetzt sind. In den von uns untersuchten

Pneumokokkenkonzentrationen und sublytischen Konzentrationen von PLY zeigte Fura-2 Fluoreszenzintensitäten, die über die gesamte Dauer des Versuches stabil blieben. Durch diese Beobachtung kann ausgeschlossen werden, dass die errechnete [Ca²⁺]_{zyt} durch den oben beschriebenen Effekt verfälscht wurde.

5.1.1. Isoliert perfundierte Rattenlunge

Die *in situ* Fluoreszenzmikroskopie an der isoliert perfundierten Rattenlunge ist seit langem in verschiedenen Arbeitsgruppen erprobt (Rubins et al. 1993, Kiefmann et al. 2009, Ying et al. 1996 und Kaestle et al. 2007). Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde diese Methodik bereits erfolgreich etabliert (Kiefmann et al. 2008 und Strunden et al. 2012). Die Grundlage hierzu bildet die bereits 1934 durchgeführte Mikroskopie der Lunge *in situ* mittels eines Thoraxfensters (Wearn et al. 1934). Als eine Weiterentwicklung der Methodik erfolgten Versuche an der isoliert perfundierten Rattenlunge, speziell in Arbeitsgruppen um Professor J. Bhattacharya (z.B. Ying et al. 1996, Kuebler et al. 2000 und Kiefmann et al. 2009), aber auch anderen (Nishio et al. 1998).

Auch speziell die Ca²⁺-Messung mittels Fura-2 ist in der isoliert perfundierten Rattenlunge bereits vielfach erprobt (Kuebler et al. 2007). Ein Beispiel hierfür sind die Erkenntnisse über Schrittmacherzellen, die Ca²⁺-Wellen in Endothelzellen subpleuraler Venolen induzieren (Ying et al. 1996).

Auch wenn das Modell der isoliert perfundierten Rattenlunge vergleichsweise nahe an den Verhältnissen *in vivo* liegt, ist die Vergleichbarkeit limitiert. Zum einen können Erkenntnisse, die durch Versuche an Ratten gewonnen werden, nicht zwangsläufig auf andere Spezies übertragen werden. Die retrograde Perfusion des Gefäßes und die kurzzeitige Stase mit einer möglicherweise stattfindenden Beschädigung der Glykokalix (Strunden et al. 2012) sowie die Auswaschung von immunkompetenten Zellen sind verfahrensbedingt nicht zu vermeiden.

Des Weiteren wird mit Pufferlösung statt mit Blut perfundiert. Eine Perfusion mit Eigenblut ist technisch umsetzbar, resultiert aber in einer drastisch schlechteren Bildqualität. Ein weiterer Unterschied liegt in der apnoeischen Beatmung, die notwendig ist, um einzelne Zellen über den Versuchszeitraum hinweg ohne Bewegungsartefakte darzustellen.
Mit diesen Einschränkungen stellt die isoliert perfundierte Lunge aktuell den besten Kompromiss aus einer möglichst physiologischen Umgebung und technischen Notwendigkeiten dar, die eine valide Videofluoreszenzmikroskopie erlauben.

Weiterhin erlauben die Vergleiche unserer *in vitro* gewonnenen Ergebnisse mit denen der *in situ* Ergebnisse teilweise einen Ausgleich dieser Einschränkungen, wie z.B. die Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Spezies.

5.2. Pneumokokken induzieren ein zytosolisches Ca²⁺-Signal in humanen pulmonalen Endothelzellen *in vitro*

Der Pathomechanismus von schweren Pneumokokkeninfektionen hat große Relevanz für die Behandlung kritisch erkrankter Patienten im klinischen Alltag.

Die Versuche haben gezeigt, dass D39 WT-Pneumokokken in Endothelzellen eine Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt} in Form eines charakteristischen Ca²⁺-Signals erzeugen. Diese Reaktion ist in einem Großteil der Endothelzellen zu beobachten, tritt meist mehrfach in derselben Zelle auf und hat eine gewisse Latenzzeit.

Die Beobachtung eines Ca²⁺-Einstroms in Endothelzellen in Form charakteristischer Ca²⁺-Signale wirft die Frage auf, ob es sich tatsächlich um einen neuen Mechanismus handelt und ob in den Endothelzellen ein aktives Signal stattfindet. Ferner ergibt sich die Frage, ob diese Beobachtungen im Pathomechanismus der Pneumokokkeninfektion eine Entsprechung in der realen Pathogenese bzw. eine Relevanz für die Erkrankung haben.

Die Beantwortung dieser Fragen soll eine bessere Einschätzung der Bedeutung und Bewertung des Ca²⁺-Signals in Endothelzellen während der Pneumokokkeninfektion zulassen und könnte gegebenenfalls die Grundlage für weitergehende Untersuchungen liefern.

Um sich den Antworten dieser Frage anzunähern, musste das Ca²⁺-Signal genauer charakterisiert werden. Der erste Schritt hierfür war die Untersuchung des Einflusses wichtiger Virulenzfaktoren auf das Ca²⁺-Signal.

5.2.1. Die Kapsel als Virulenzfaktor von Pneumokokken moduliert das Ca²⁺-Signal in Endothelzellen nicht

Als einer der beiden Virulenzfaktoren von herausragender Bedeutung wurde neben dem PLY die Kapsel als möglicher Auslöser des Ca²⁺Signals untersucht.

Die Anzahl an Reaktionen auf D39 Δ CPS und die durchschnittlichen [Ca²⁺]_{max} zeigten, jeweils im Vergleich zum WT, keinen Unterschied. Damit ist es unwahrscheinlich, dass die Kapsel einen Einfluss auf das Ca²⁺-Signal hat. Auch in der Literatur ist bisher keine direkte Wirkung der Kapsel auf [Ca²⁺]_{zyt} der Zielzellen beschrieben.

Die Kapsel umgibt das Bakterium als äußerste Schicht und interagiert auf vielfältige Weise mit dem Wirt. Auch bei der direkten Interaktion im unmittelbaren Kontakt mit Endothelzellen spielt die Kapsel eine Rolle und beeinflusst z.B. die Adhärenz (Preston et al. 2008). Auch wenn bisher keine direkte Wirkung der Kapsel auf [Ca²⁺]_{zyt} von Zielzellen bekannt ist, wäre ein indirekter Einfluss auf die Generierung des Ca²⁺-Signals möglich. Neben der Adhärenz könnte auch die protektive Wirkung der Kapsel für das Bakterium einen solchen indirekten Einfluss haben.

Denkbar wäre, da der ausschlaggebende Teil des PLY in der Infektion mit Pneumokokken bei der Lyse einzelner Bakterien freigesetzt wird, dass mehr Bakterien des ungeschützteren D39 ΔCPS zugrundegehen, dadurch auch mehr PLY freigesetzt wird und die Reaktion der Endothelzellen beeinflusst.

Unter den Versuchsbedingungen konnte ein solcher Einfluss auf das Ca²⁺-Signal nicht gezeigt werden.

In der Infektion eines intakten Wirtsorgans mit mehreren Ebenen der Immunreaktion ist die Kapsel für das Bakterium netto ein eindeutiger Virulenzvorteil. In der vereinfachten Umgebung der *in vitro* und *in situ* Versuche, in denen z.B. die mechanische Beseitigung des Krankheitserregers wegfällt, scheint aber keine Modulation des Ca²⁺-Signals stattzufinden.

5.2.2. Das Pneumokokken-induzierte Ca²⁺-Signal ist PLY-abhängig

PLY hat sich als der für die Auslösung des Ca²⁺-Signals entscheidende Virulenzfaktor

herausgestellt. Die Inkubation mit dem Pneumokokkenstamm D39 Δ PLY hat *in vitro* und *in vivo* keinerlei Veränderung von [Ca²⁺]_{zyt} erzeugt. Daraus kann geschlossen werden, dass die Synthetisierung von PLY durch das Bakterium eine notwendige Bedingung für die Generierung des Ca²⁺-Signals ist.

Ob PLY nur einen Teil der Interaktion zwischen Bakterium und Endothelzellen darstellt oder ob das Ca²⁺-Signal direkt durch PLY ausgelöst wird, konnte durch die Verwendung von isoliertem PLY als Interventionssubstanz beantwortet werden. In der Versuchsgruppe PLY reagierten vergleichbar viele Zellen wie bei der Intervention mit dem D39 WT. Dieses Ergebnis zeigt, dass tatsächlich nur das isolierte PLY-Protein nötig ist, um in der Interaktion mit HPMEC zu einem Ca²⁺-Signal zu führen.

PLY ist ein sehr vielseitiges Protein, dessen Wirkung von der aktiven Freisetzung spezieller Proteine durch die Zielzellen (Paton et al. 1983) bis zur schnellen Induktion des Zelltodes reicht (Rubins et al. 1992). Welche Wirkung PLY in der Interaktion hat, ist unter anderem von der Dosis abhängig, in der das Protein mit der Zielzelle interagiert. Auch die Induktion des Ca²⁺-Signals hat sich als dosisabhängig erwiesen (siehe 4.1.1).

Die von anderen Arbeitsgruppen eingesetzten PLY-Konzentrationen sind inhomogen. Während manche Arbeitsgruppen z.B. bei einer Konzentration von 100 ng/ml von einem sublytischen Effekt an Neuroblastomzellen ausgehen (Iliev et al. 2007), haben andere Arbeitsgruppen bei 100 ng/ml die Induktion von Apoptosen an humanen Mikrogliazellen beschrieben (Braun et al. 2002).

Die Konzentration von PLY während einer Pneumokokkeninfektion schwankt sehr stark, und in der Literatur sind z.B. Konzentrationen von 1 ng/ml bis 180 ng/ml im Liquor während der Pneumokokken-induzierten Meningitis des Menschen beschrieben (Mitchell et al. 2010). Bei der Behandlung mit Antibiotika können aber noch weit höhere Konzentrationen erreicht werden (Spreer et al. 2003). Schon die Freisetzung von PLY pro CFU Pneumokokken *in vitro* variiert um den Faktor 100 (Spreer et al. 2004).

Die effektive Konzentration von PLY hängt zum Teil mit dem Überleben der Bakterien zusammen, wird aber auch noch von vielen anderen Faktoren beeinflusst. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen hatte die Temperatur der PLY-Lösung einen Einfluss auf die beobachteten Ca²⁺-Signale (Versuche nicht gezeigt). Bei den

unterschiedlichen Temperaturen der *in vitro* Versuche (Raumtemperatur) und der *in situ* (37° C) könnte hier eine mögliche Fehlerquelle der Vergleichbarkeit liegen.

Trotzdem konnten mit der Konzentration von 5 mg/ml vergleichbare Ca²⁺-Signale sowohl *in vitro* als auch *in situ* gezeigt werden. Diese Ca²⁺-Signale sind außerdem vergleichbar mit dem Signal, das durch 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken induziert wird. Diese Übereinstimmungen könnten ein Hinweis sein, dass in unserer Versuchskonstellation durch 5x10⁵ CFU/ml Pneumokokken in etwa 5 mg/ml PLY freigesetzt wird.

Ein weiterer Einflussfaktor auf die wirksame Konzentration von PLY könnte sein, dass möglicherweise die Freisetzung von PLY durch ein einzelnes Bakterium lokal zu einer höheren Konzentration führen kann als im gesamten Medium. Hierzu gibt es keine Untersuchungen. Außerdem unterscheiden sich verschiedene Zelltypen in ihrer Sensibilität für PLY (Hirst et al. 2002), was ein möglicher Grund für den Einsatz verschiedenen Konzentrationen von PLY in der Literatur sein könnte.

5.2.3. Die Bedeutung des Ca²⁺-Signals für die Zelle

Die Fähigkeit von Pneumokokken durch relativ hohe Dosen ihres Toxins PLY große Poren in der Zellwand der verschiedenen Zelltypen des Wirtes zu bilden, wurde vielfach beschrieben (Steinfort et al. 1989), ebenso die dadurch induzierten Zellschäden an z.B. Epithel- und Endothelzellen. Durch die Poren mit einem Durchmesser von 30-35 nm können unkontrolliert große Mengen von Ca²⁺-Ionen, dem ausgeprägten Konzentrationsgradienten folgend, in die Zelle einströmen. Dieser Prozess ist nicht für Ca²⁺ selektiv, sondern betrifft mehrere Ionen. Außerdem entweichen wichtige intrazelluläre Proteine in den Extrazellularraum. Damit wäre der Ca²⁺-Einstrom kein aktives Signal, sondern ein Phänomen des Zelluntergangs.

Einen Hinweis, dass PLY tatsächlich ein aktives Signal in der Zielzelle verursacht, bekommen wir nicht nur aus unseren eigenen Ergebnissen, sondern auch aus der Gruppe der strukturell eng mit dem PLY verwandten CBCs. Speziell für das Listeriolysin ist nachgewiesen, dass es zu einem aktiven Einstrom von Ca²⁺ in den Intrazellularraum kommt (Gekara et al. 2008). Über welchen Weg dieses Signal genau generiert wird, ist bisher ungeklärt. Da alle Mitglieder der CBCs gewisse

Analogien aufweisen und ein vergleichbares Bindungsverhalten an Cholesterol in der Zellmembran der Zielzelle zeigen, könnten Listeriolysin und PLY ähnliche Signalkaskaden aktivieren.

Damit sich PLY zu Oligomeren zusammenlagert und in der Zielzelle Poren bildet, ist eine relativ hohe Konzentration nötig. Es scheint aber eine große Anzahl von Effekten gerade durch sublytische Konzentrationen von PLY verursacht zu werden (siehe auch 5.2.2). Ein Beispiel hierfür ist die Beeinflussung der Expression von Genen, die für Proteine wie Lectin 1, Cadherin 17, Caspase 4 und 6, Interleukin 8 und *monocyte chemotactic protein* 3 kodieren (Rogers et al. 2003). Ein weiteres Beispiel ist auch die Aktivierung von Rho- und Rac-GTPasen sowie die Organisation von Aktinfasern und die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien in neuronalen Zellen durch sublytische Konzentrationen von PLY (Iliev et al. 2007). Diese Beispiele zeigen, dass die Wirkung von PLY deutlich komplexer ist als die reine Bildung von großen Zellmembrandefekten in den Zielzellen.

Einen starken Hinweis gibt uns außerdem der zeitliche Verlauf der Ca²⁺-Konzentration bzw. die Charakteristik des Ca²⁺-Signals. Der beschriebene Ca²⁺-Anstieg ging nach mehreren Sekunden bis wenigen Minuten wieder zurück, und es stellte sich eine Ca²⁺-Konzentration auf dem Ausgangsniveau ein. Dieses Phänomen wurde im Zeitraum des Versuches teilweise mehrfach in derselben Zelle beobachtet. Diese Konzentrationsveränderungen sind mit dem bisherigen Modell der klassischen Porenbildung durch die Oligomerisation von PLY nicht zu erklären. Bisher ist kein Verschlussmechanismus der PLY-Pore bekannt, und die Zelle wäre nicht in der Lage, Ca²⁺-Homöostase auszugleichen ihre bei einem entsprechend großen Membrandefekt.

Aus der Vielzahl der PLY-Effekte ergeben sich eine große Anzahl von möglichen Mechanismen über die PLY das Ca²⁺-Signal induzieren könnte. Um den Mechanismus besser zu verstehen, muss genauer eingegrenzt werden, aus welcher Quelle Ca²⁺ in das Zytosol einströmt. Außerdem kann die Beteiligung verschiedener Strukturen der Zellen einen Hinweis geben, ob die Zelle aktiv an der Generierung von Ca²⁺-Signalen beteiligt ist.

5.2.4. Das Ca²⁺-Signal wird durch einen Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär und dem Ausstrom aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern generiert

5.2.4.1. Extrazellularraum

Ein Grund für das Auftreten von schmal, spitz konfigurierten Ca2+-Signalen war der Ausstrom von Ca²⁺-Ionen vermutlich aus der Zelle hinaus, dem unphysiologisch Ca²⁺-freien Konzentrationsgradienten folgend, in den Extrazellularraum unter den gegebenen Versuchsbedingungen. Diese Tatsache konnte auch zu Beginn der jeweiligen Versuche an dem niedrigen [Ca²⁺]zvt zu Ausgangsbedingungen beobachtet werden. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass sich das charakteristische Ca²⁺-Signal unter Standardbedingungen aus mehreren Ca²⁺-Strömen zusammensetzt. Hierbei scheint der Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär für eine Verbreiterung bzw. ein länger andauerndes Ca²⁺-Signal verantwortlich zu sein.

Aus den Ergebnissen wird deutlich, dass mindestens ein intrazelluläres Ca²⁺-Depot am Anstieg von [Ca²⁺]_{zyt} bei Inkubation mit Pneumokokken beteiligt ist. Die schmale, spitze Konfiguration gibt außerdem einen Hinweis auf einen Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär, der das Ca²⁺-Signal unter Standardbedingungen mit bedingt.

Einschränkend muss die unphysiologische Pufferlösung für diese Versuche berücksichtigt werden. Die untersuchten Zellen lösten sich vergleichsweise häufig während des Versuches vom Objektträger oder verformten sich. Auch wenn diese offensichtlich veränderten Zellen schon aus technischen Gründen nicht mit in der Auswertung berücksichtigt werden konnten, liegt die Vermutung nahe, dass die unphysiologische Umgebung einen negativen Einfluss auf alle Zellen hatte.

Da es keine andere Methodik gibt, die eine Beteiligung von extrazellulärem Ca²⁺ an einem intrazellulären Ca²⁺-Signal mit so hoher Wahrscheinlichkeit ausschließt, wurde trotz dieser Einschränkungen eine Ca²⁺-freie Umgebung gewählt. Des Weiteren kann gerade deshalb das Auftreten eines intrazellulären Ca²⁺-Signals in dieser Umgebung als Beweis für eine Beteiligung intrazellulärer Ca²⁺-Speicher dienen.

5.2.4.2. Endoplasmatisches Retikulum

Das ER ist quantitativ das bedeutendste intrazelluläre Ca^{2+} -Depot und an den meisten zellulären Vorgängen, in denen ein Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ eine Rolle spielt, beteiligt. Die wichtigsten Transporter, die Ca^{2+} in das ER pumpen, sind die Ca^{2+} -ATPasen. Die SERCAs können mit dem nicht-kompetitiven Antagonisten TG selektiv inhibiert werden. Dies führt zu einer Depletion des ER und damit zu einem Funktionsverlust als intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher (Thastrup et al. 1989).

Auffällig war das Auftreten von breit konfigurierten Ca²⁺-Signalen sowie ein etwas höheres $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu Ausgangsbedingungen. Die methodisch bedingte initiale Entleerung des ER durch TG sowie die Blockade der SERCAs erklärt das höhere $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu Ausgangsbedingungen. Dieser Unterschied der Versuchsgruppe ist unumgänglich und sollte aufgrund der geringen Differenz die Aussagekraft der Versuche nicht limitieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass mindestens ein weiterer Ca²⁺-Strom für die breite bzw. länger andauernde Komponente des charakteristischen Ca²⁺-Signals unter Standardbedingungen verantwortlich sein muss. Trotzdem ist das Fehlen von schmalen, spitzen Ca²⁺-Einströmen bei Inkubation mit TG Indiz für eine Beteiligung des ER am charakteristischen Ca²⁺-Signal unter Standardbedingungen. Schmale, spitze Ca²⁺-Einströme sind Teil des Ca²⁺-Signals unter Standardbedingungen und charakteristisch in den Versuchen unter Ca²⁺-freien Bedingungen.

5.2.4.3. Mitochondrien

Eine dritte mögliche Quelle für einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ sind die Mitochondrien. Durch Aktivität der Atmungskette ist der Matrixraum innerhalb des Mitochondriums stark negativ geladen. Hier können sich positiv geladene Ca²⁺-Ionen anreichern. In den Versuchen wurde der Komplex I der Atmungskette durch RO gehemmt (Earley et al. 1987). Es kann keine negative Ladung im Matrixraum aufgebaut und Ca²⁺ weniger gut im Mitochondrium gespeichert werden (Brueckl et al. 2006). Dass die Mitochondrien dadurch nicht mehr an einem Ca²⁺-Signal beteiligt sein könnten, kann so nicht sicher ausgeschlossen werden, da der Ca²⁺-Haushalt des Mitochondriums komplex ist und mehrere Transportproteine und Mechanismen für Ca²⁺ eine Rolle spielen. Die Tatsache, dass das Ca²⁺-Signal durch RO nicht beeinflusst wird, macht eine Beteiligung am Ca²⁺-Signal des Mitochondriums als Ca²⁺-Speicher aber unwahrscheinlich.

Als weitere Einschränkung muss die Eigenschaft von RO, die auch wir in unseren Experimenten beobachten konnten, berücksichtigt werden, dass RO alleine schon einen Anstieg von [Ca²⁺]_{zvt} verursachen kann. Es wurde in neuronalen Zellen nachgewiesen, dass dieser Ca²⁺-Einstrom durch die Beseitigung extrazellulären Ca²⁺ vollständig unterdrückt werden konnte und vermutlich durch spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle erfolgte (Wyatt et al. 2004). Außerdem induziert RO an humanen Neuroblastomzellen schon ab einer Dosis von 10 µM, wenn sie diesem über 48 h ausgesetzt sind, bei mehr als der Hälfte der Zellen die Apoptose. Auch wenn die genaue Signalkaskade noch nicht bekannt ist, konnte die Apoptoserate durch die Blockierung des Ca²⁺-Signals vermindert werden (Wang et al. 2005). Über den von uns untersuchten Zeitraum konnte auch bei einer Dosis von 50 µM nach Ablauf des Interventionszeitraumes noch ein deutlicher Anstieg von [Ca²⁺]_{zvt} auf die Inkubation mit 100 µM ATP beobachtet werden, was für die Vitalität der Untersuchten Zellen spricht. Auch ein RO-induzierter Ca^{2+} -Einstrom trat nur in 10,58% ± 12,55% und damit einem geringen Anteil der untersuchten Zellen auf. Trotz des erhöhten [Ca²⁺]zvt zu Ausgangsbedingungen, die als limitierender Faktor bestehen bleibt, konnte ein Unterschied zur Interventionsphase nachgewiesen werden.

Aufgrund der Ergebnisse gibt es keinen Hinweis auf eine Beteiligung eines Ca²⁺-Stroms aus dem Mitochondrium am charakteristischen Ca²⁺-Signal unter Standardbedingungen. Eine solche Beteiligung kann aber durch unsere Versuche auch nicht sicher ausgeschlossen werden.

5.2.4.4. Zusammenfassung der Untersuchung mehrerer Ca²⁺-Quellen

Ein Aspekt der Auswertung der Versuche aus den Gruppen WT/PLY-TG, WT/PLY-ØCa²⁺ und WT-RO war die genaue Analyse des Ca²⁺-Anstiegs. In der Dauer und Dynamik des Ca²⁺-Signals ergaben sich erhebliche Unterschiede in den Versuchsgruppen.

Bei den Versuchen in Ca²⁺-freier Umgebung induzierte sowohl der D39 WT als auch das isolierte PLY, im Vergleich zu den Versuchen unter Standardbedingungen, Ca²⁺-

Signale, die sowohl kürzer dauerten als auch eine charakteristische Dynamik zeigten. [Ca²⁺]_{zyt} in den Ca²⁺-Signalen zeichnete sich durch einen vergleichsweise steilen Anstieg und einen ebenso abrupten Abfall auf den Ausgangswert aus, sodass das Signal weniger als 3 min andauerte.

Den Kontrast zu den Ca²⁺-freien Versuchen bildeten die TG-Versuche, in denen die Funktion des ER blockiert war. Hier waren Ca²⁺-Signale von längerer Dauer (\geq 3 min) zu beobachten; es fehlten aber steile [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiege, die in den Versuchen unter Standardbedingungen zusätzlich auf den teilweise mehrere Minuten andauernden, breiten [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiegen zu beobachten waren.

In den Versuchen, in denen RO eingesetzt wurde, um die Funktion der Mitochondrien zu blockieren, war ein gemischtes Bild aus den beiden zuvor beschriebenen Ca²⁺-Signalen zu beobachten. Damit waren diese Ergebnisse eher mit den Ca²⁺-Signalen der Versuche unter Standardbedingungen zu vergleichen.

Durch die Analyse der Ca²⁺-Signale wurden zwei verschiedene Ca²⁺-Ströme identifiziert. Diese bilden gemeinsam die Reaktion von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in HPMEC auf einen Kontakt mit dem D39 WT oder isoliertem PLY. Das Signal setzt sich zusammen aus dem langsam ablaufenden und länger andauernden Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ und einem schnellen und nur kurz dauernden Einstrom in das Zytosol. Die bisherige Analyse der Versuche liefert also Hinweise auf eine Beteiligung des ER und der Zellmembran bei der Verschiebung von Ca²⁺-Ionen; keine Anhaltspunkte gibt es dagegen für eine Beteiligung des Mitochondriums an dem beobachteten charakteristischen Ca²⁺-Signal.

Die bedeutendste und häufigste Interaktion mehrerer Kompartimente der Ca²⁺-Homöostase ist im SOC intensiv erforscht. Auch dieser Mechanismus, in dem eine Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER einen Einstrom aus dem Extrazellularraum auslöst, wird im klassischen Verständnis ein Ca²⁺-Signal generiert, das aus zwei verschiedenen Ca²⁺-Einströmen in das Zytosol besteht. Auch im SOC besteht der Anstieg von [Ca²⁺]_{zyt} aus der schnellen Entleerung des ER und aus dem etwas länger anhaltenden Einstrom von Ca²⁺ von extrazellulär. Der wichtige Unterschied des von uns beobachteten charakteristischen Pneumokokken-induzierten Ca²⁺-Signals zum klassischen SOC ist, dass die Beteiligung des ER keine notwendige Bedingung für den gesamten Vorgang zu sein scheint. STIM 1 fungiert als eine Art Sensor für einen Abfall der [Ca²⁺] im ER (Roos et al. 2005). Das heißt, dass Ca²⁺ aus dem ER ausgeschüttet werden muss, z.B. über eine Aktivierung des IP3-Signalwegs, damit über STIM 1 die SOC-Kanäle aktiviert werden (Smyth et al. 2010). Bei bereits entleertem ER sollte dieser Signalweg damit zumindest beeinträchtigt sein. Dass sowohl bei entleertem ER als auch in Ca²⁺-freier Umgebung weiterhin charakteristische Ca²⁺-Signale beobachtet werden können, gibt möglicherweise einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang des Pneumokokken-induzierten Ca²⁺-Signals mit dem klassischen Mechanismus des SOC.

Eine Möglichkeit, die bisher zumindest nicht ausgeschlossen werden kann, ist, dass das Protein STIM 2 stattdessen in den Signalweg eingebunden ist. STIM 2 hat eine deutlich höhere Sensitivität, und möglicherweise finden auch bei einem fast vollständig entleerten ER noch kleinere Veränderungen der [Ca²⁺] statt, die von STIM 2 detektiert werden könnten, und dann Signalwege aktivieren (Smyth et al. 2010).

5.2.5. Das Ca²⁺-Signal wird von der Endothelzelle aktiv generiert

Die Zusammensetzung der Ca²⁺-Spikes aus dem Einstrom aus mindestens zwei verschiedenen Kompartimenten bringt die Beantwortung der ersten Fragestellung näher, ob und inwiefern es sich bei den Ca²⁺-Spikes um einen aktiven Mechanismus der Zelle handelt.

Das Ergebnis der Ca²⁺-freien Versuche zeigt eindeutig, dass mindestens aus einer intrazellulären Quelle Ca²⁺ in das Zytosol ausgeschüttet wird. Gerade diese Komponente des Signals muss über eine Signalvermittlung oder Erkennung in der Zelle verursacht werden. Aber auch der Einstrom von extrazellulär ist nicht alleine mit der klassischen Eigenschaft von PLY, Poren zu bilden, zu erklären (siehe 5.2.3). Welche Mechanismen und Signaltransduktionswege genau eine Rolle für das Ca²⁺- Signal spielen, bleibt bisher aber unklar.

Möglicherweise spielt IP3 als Signalmolekül im PLY-induzierten Ca²⁺-Signal eine Rolle. IP3 hat eine zentrale Stellung im Ca²⁺-Stoffwechsel der Zellen (Streb et al. 1983). Bisher gibt es aber keinen Beweis für eine Beteiligung von IP3 am Pneumokokken-induzierten Ca²⁺-Signal. Außerdem geben unsere Versuche mehrere Indizien, dass das Ca²⁺-Signal nicht durch den klassischen SOC entsteht (siehe 5.2.4), bei dem IP3 eine wichtige Funktion hat. Trotzdem geben andere Untersuchungen starke Hinweise, dass IP3 und IP3R an unserem Ca²⁺-Signal beteiligt sind. Dass IP3 Ca²⁺-Oszillationen auslösen kann, wurde erstmals in basophilen Leukämiezellen der Ratte nachgewiesen (Meyer et al. 1988 und Meyer & Stryer 1988). Die genauere Charakterisierung des durch IP3R entstehenden biphasischen Ca²⁺-Signals erfolgte durch Masamitsu et al. 1990, und die ubiquitäre Bedeutung wurde für eine große Anzahl an verschiedenen Zellen nachgewiesen (z.B. an renalen Epithelzellen (Parys et al. 1986), Hepatozyten (Burgess et al. 1984) und Endothelzellen (Freay et al. 1989)).

Das biphasische Ca²⁺-Signal entsteht durch die besondere Eigenschaft des IP3R, dass dieser durch Ca²⁺ in geringen Konzentrationen (bis zu 300µM) aktiviert wird, wohingegen in höheren Konzentrationen ein hemmender Effekt überwiegt (Finch et al. 1991). Dadurch verstärkt ein Ca²⁺-Einstrom sich zu Beginn selbst, terminiert sich aber auch selbst durch die steigende [Ca²⁺] und die dadurch resultierende Hemmung des IP3R.

Damit bietet die Beteiligung von IP3 und dem IP3R eine mögliche Erklärung für das charakteristische Ca²⁺-Signal, indem der vermutete Agonist PLY konstant verfügbar ist und trotzdem ein Ansteigen und Abfallen von [Ca²⁺]_{zyt} zu beobachten ist.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine direkte Interaktion zwischen zellulären Rezeptoren und PLY. Eine solche direkte Liganden-Bindung von PLY ist z.B. für den TLR4-Rezeptor in Makrophagen beschrieben (Srivastava et al. 2005). Unabhängig von der porenbildenden Aktivität induziert PLY über TLR4 die MAPK-Signalkaskade und die Aktivierung von NF-kB, die die Expression von CXCL-8 in Detroit 562 nasopharyngealen Zellen und primären nasopharyngealen Epithelzellen steigert (Dogan et al. 2011). Auch wenn diese Interaktion noch nicht in Endothelzellen beschrieben ist, so ist es doch höchst wahrscheinlich, dass auch auf Endothelzellen eine Bindung von PLY an TLR4 stattfindet (Faure et al. 2000). Da für TLR4 aus anderen Zelllinien bereits ein Einfluss auf [Ca²⁺]_{zyt} und die Fähigkeit, Ca²⁺-Signale auslösen zu können, beschrieben ist, könnte auch in Endothelzellen PLY über TLR4 ein Ca²⁺-Signal induzieren (Ostuni et al. 2010).

Abgesehen von einer klassischen Vermittlung über Rezeptoren könnten auch noch weitere Signaltransduktionswege eine Rolle spielen. Eine dieser Möglichkeiten zeigt

abermals das strukturell eng verwandte Protein Listeriolysin. Dieses Toxin führt neben der Bildung von Poren in der Zellmembran zu der Bildung von sogenannten lipid rafts durch die Bindung von Cholesterol auf der Oberfläche der Zellmembran (Gekara et al. 2005). Dieses aktiviert dann CD14 und CD16 sowie die Tyrosinkinase Lyn (Gekara et al. 2004). Lipid rafts sind dichte Zusammenlagerungen von Sphingolipiden und Cholesterol in der Lipidmembran von Zellen. Diese lipid rafts können eine ganze Reihe von Proteinen binden wie z.B. Proteine mit Glycosylphosphatidylinositol-Anker und auch eine große Vielfalt an Transmembranproteinen und G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Simons et al. 1997). Durch die räumliche und funktionelle Interaktion verschiedener Proteine können komplexe Reaktionen auf einen Agonisten ausgelöst und Funktionen wie z.B. die Endozytose reguliert werden (Helms et al. 2004).

Des Weiteren ist bekannt, dass *lipid rafts* in verschiedenen Signaltransduktionswegen über intrazelluläres Ca²⁺ als *second messenger* wirken. Durch die sehr ähnliche Struktur von PLY und das vergleichbare Bindungsverhalten ist es möglich, dass PLY auf ähnliche Art wie Listeriolysin über *lipid rafts* seine Wirkung entfaltet.

Neben der Wirkung über *lipid rafts* spielt auch die Porenbildung von Listeriolysin eine wichtige Rolle. Eine interessante Eigenschaft der Poren, die durch Listeriolysin gebildet werden, ist, dass es einen Mechanismus zu geben scheint, der das periodische Öffnen und Schließen erlaubt (Repp et al. 2002). Auch hier könnten Analogien zu PLY und den Poren in der Zellmembran liegen.

5.3. Pneumokokken induzieren ein zytosolisches Ca²⁺-Signal in subpleuralen Endothelzellen der isolierten Rattenlunge

Die bisherigen Erkenntnisse über das Ca²⁺-Signal, das durch PLY in HPMEC *in vitro* induziert wird, leiten zu einer weiteren Fragestellung: Ist das beobachtete Ca²⁺-Signal ein Vorgang im realen Pathomechanismus von Pneumokokkeninfektionen auch *in situ,* und hat das Ca²⁺-Signal damit das Potential, auch eine relevante Funktion für den Wirt oder das Bakterium zu erfüllen?

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Versuchsbedingungen in eine isoliert perfundierte Rattenlunge übertragen. Trotz der diskutierten Einschränkungen (siehe 5.1.1) bietet dieses Modell Bedingungen, die so nahe an der physiologischen Situation sind wie bei Fluoreszenzmessung in Echtzeit aktuell möglich.

Mit der Messung von Ca²⁺-Signalen in Reaktion auf Pneumokokken in diesen Versuchen konnte nicht nur bewiesen werden, dass es sich um einen speziesübergreifend reproduzierbaren Vorgang handelt. Hiermit konnte insbesondere gezeigt werden, dass die Entdeckung des Ca²⁺-Signals in der stark vereinfachten Umgebung der *in vitro* Versuche ein Äquivalent in dem komplexen System einer pulmonalen subpleuralen Venole hat.

5.3.1. Die Erkenntnisse über das Ca²⁺-Signal *in vitro* sind auf subpleurale Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge übertragbar

In der Rattenlunge reagierten annähernd alle Endothelzellen mit mindestens einem charakteristischen Ca²⁺-Signal über den 45-minütigen Interventionszeitraum auf den D39 WT. Eine Ausnahme davon bildete die Inkubation mit D39 Δ CPS Pneumokokken. Hier lag der Anteil reagibler Endothelzellen in der Lunge deutlich höher als bei den Messungen an HPMEC. Ein möglicher Grund hierfür könnte in der verbesserten Adhäsion des D39 Δ CPS gegenüber dem D39 WT liegen (Talbot et al. 1996). Dieser Einfluss könnte im dynamisch perfundierten Gefäß eine größere Rolle spielen als in der statischen Situation der *in vitro* Versuche.

Ohne den Schutz des Bakteriums durch die Kapsel könnte mehr PLY freigesetzt werden, da bei der Lyse von Pneumokokken das PLY im Inneren freigesetzt wird. Möglich ist, dass methodisch bedingt eine vermehrte Lyse von Bakterien im Mikrokatheter oder infolge der Perfusion ohne den Schutz der Kapsel einen Unterschied erklärt.

Eine klinische Bedeutung haben ΔCPS Pneumokokken allerdings nicht, da Pneumokokkenstämme ohne Kapsel deutlich reduzierte Virulenz im Menschen zeigen (Briles et al. 1992). Das durchschnittliche maximale $[Ca^{2+}]_{zyt}$ der Interventionsphase in den *in vitro* und den *in situ* Versuchen lag bei der Intervention mit dem D39 WT auf fast identischen Werten. Für die D39 Δ CPS Pneumokokken ergab sich wiederum ein Unterschied mit etwas niedrigerem $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in den Endothelzellen der Lunge.

Auch die Frequenzen und Latenzen waren sehr ähnlich in den *in vitro* und den *in situ* Versuchen. Eine Ausnahme bildeten die Versuche mit isoliertem PLY. Hier zeigten die Zellen *in vitro* fast doppelt so viele Ca²⁺-Signale und reagierten auch deutlich schneller nach dem Beginn der Intervention. Dieser Unterschied könnte an einer niedrigeren wirksamen Dosis *in situ* liegen. Der Zusammenhang zwischen der Dosis, Latenz und Frequenz wurde bereits bei den *in vitro* Versuchen erörtert, und die Konstellation mit einer höheren Latenz und niedrigeren Frequenz passt zu einer niedrigeren Dosis PLY. Es gibt mehrere Möglichkeiten, warum an den Endothelzellen der perfundierten Lunge eine geringere Konzentration PLY wirksam gewesen sein kann als *in vitro*, trotz der Verwendung von 5 ng/ml in beiden Experimenten.

Ein Einflussfaktor könnte wiederum der Unterschied zwischen einer dynamischen Perfusion *in situ* und der statischen Exposition *in vitro* gewesen sein und einen Unterschied erklären. Möglicherweise gibt es außerdem in der dreidimensionalen Struktur und dem festen Zellverband eines intakten Gefäßes eine geringere exponierte Oberfläche pro Endothelzelle als in der zweidimensionalen Situation auf einem Objektträger.

Ob und inwiefern Bestandteile des Blutes PLY direkt eliminieren und dadurch möglicherweise die effektive PLY-Konzentration direkt beeinflussen, ist bisher nicht beschrieben.

Insgesamt ist das Ca²⁺-Signal in Endothelzellen als eine Reaktion auf die Interaktion mit Pneumokokken vollständig von der *in vitro* Situation in die *in situ* Versuche übertragbar. Die Modulation des Signals durch die Virulenzfaktoren des Bakteriums in der komplexen Umgebung eines intakten Organs ist dabei nachvollziehbar. Die Kombination aus dem Nachweis des charakteristischen Ca²⁺-Signals in humanen Endothelzellen und in der isoliert perfundierten Rattenlunge macht es ausgesprochen wahrscheinlich, dass der gleiche Mechanismus auch in den Endothelzellen der humanen Lunge stattfindet.

5.3.2. Die Entdeckung des charakteristischen Ca²⁺-Signals in Endothelzellen eröffnet neue Perspektiven und Möglichkeiten für die Erforschung Pneumokokkeninduzierter Erkrankungen

Es ist gelungen, ein charakteristisches Ca²⁺-Signal in Endothelzellen als Reaktion auf Pneumokokken und spezifisch PLY zu identifizieren. Damit konnte die erste Fragestellung dieser Arbeit beantwortet werden.

Die zweite Fragestellung konnte über die quantitative und qualitative Analyse des Ca²⁺-Signals beantwortet werden. Der Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär sowie aus dem ER bilden die beiden entscheidenden Komponenten des Pneumokokkeninduzierten Ca²⁺-Signals. Damit wurden starke Hinweise darauf gefunden, dass das Ca²⁺-Signal ein aktives Signal der Endothelzellen ist.

Die dritte Fragestellung konnte mit der erfolgreichen Übertragung der *in vitro*-Erkenntnisse in die isoliert perfundierte Rattenlunge beantwortet werden. Das beschriebene Ca²⁺-Signal tritt im realen Pathomechanismus im Endothel in der Rattenlunge auf und könnte damit eine potenzielle Relevanz für den Krankheitsverlauf und die Therapie der Pneumokokkeninfektion haben.

Zu erörtern bleibt, welche Bedeutung und Funktion das Ca²⁺-Signal im Pathomechanismus der Pneumokokkeninfektion hat.

Hier ist eine große Anzahl an Möglichkeiten denkbar, und die genaue Erforschung wird das Ziel künftiger Untersuchungen sein. Einige Hinweise ergeben sich aber schon aus den bisherigen Ergebnissen und den Arbeiten anderer Wissenschaftler.

Schon 1993 wurde erwiesen, dass PLY eine Verletzung von Typ 1 Alveolarzellen und eine Erhöhung der alveolären Permeabilität in der isoliert perfundierten Rattenlunge auslöst. Außerdem wurde die Zerstörung der alveolar kapillaren Membran mikroskopisch morphologisch nachgewiesen und über das Lungengewicht die Ausbildung eines Lungenödems durch PLY beschrieben (J. Rubins et al. 1993). Gerade die Beeinflussung der endothelialen Barrierefunktion spielt in der Entstehung des Lungenödems, einem der kritischen Pathomechanismen bei pulmonalen Infektionen und speziell der ALI/ARDS, eine zentrale Rolle. Das Lungenödem gehört nicht nur mit zu den diagnostischen Kriterien für die ALI und das ARDS, sondern beeinflusst auch die respiratorische Situation des Patienten maßgeblich.

Bisher gab es keine Arbeit, die den Einfluss von PLY auf das Lungenödem über den intrazellulären Botenstoff Ca²⁺ untersucht hat. Bekannt ist aber, dass gerade Ca²⁺ als Botenstoff in der Regulation der endothelialen Barriere (Tiruppathi 2002), der Freisetzung von NO (Liang et al. 2013) und der Beeinflussung von Interleukinen (Dogan et al. 2011) eine herausragende Bedeutung hat.

Möglicherweise ist die Entdeckung des Ca²⁺-Signals als Reaktion auf PLY der erste Schritt, diese pathogenes definierenden Vorgänge mit PLY zu verbinden und so den Pathomechanismus der Pneumokokkeninfektion im Detail zu verstehen. Hiervon könnten wiederum erkrankte Patienten in Form von neuen Therapieansätzen profitieren.

6. Zusammenfassung

Pneumokokken sind ein wichtiger Erreger im klinischen Alltag und die Lunge ist die häufigste Eintrittspforte für die Pneumokokkensepsis. Der Zusammenbruch der Endothelbarriere und die Ausbildung eines Lungenödems sind dabei kritische Ereignisse in der Pathogenese. Ca²⁺-Ionen sind ein intrazellulärer Botenstoff, der die Regulation der endothelialen Barrierefunktion maßgeblich beeinflusst, wie auch eine Vielzahl von anderen Prozessen in der Zelle. Um die Pathomechanismen speziell der durch Pneumokokken verursachten pulmonalen Erkrankungen besser zu verstehen, wurde in dieser Arbeit, unter der Annahme, dass Pneumokokken einen Einfluss auf [Ca²⁺]_{zyt} haben, der über die bereits bekannte Bildung von Ca²⁺ durchlässigen Poren hinausgeht, [Ca²⁺]_{zyt} in Endothelzellen untersucht.

Hierzu wurde mittels Fura-2 Fluoreszenzmikroskopie sowohl in isolierten humanen pulmonalen Endothelzellen (HPMEC) als auch in isoliert perfundierten Rattenlungen die Wirkung von Pneumokokken und ihren Virulenzfaktoren Pneumolysin (PLY) und der Kapsel auf [Ca²⁺]_{zyt} untersucht.

Wir haben gezeigt, dass Endothelzellen als Reaktion auf Pneumokokken ein aktives Ca^{2+} -Signal erzeugen. Dieses Signal besteht aus einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_{zyt}$, die nach mehreren Sekunden wieder auf die Ausgangskonzentration zurückgeht. Dieser komplexe Vorgang des Anstiegs von $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wird sowohl durch Ca^{2+} -Ionen, die aus dem Extrazellularraum einströmen, als auch durch eine Ausschüttung aus dem Endoplasmatischen Retikulum vermittelt. Damit unterscheidet sich das aktive Ca^{2+} -Signal grundlegend von allen bisher bekannten Wirkungen von PLY, speziell der Bildung von Poren in der Zellmembran.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Pneumokokken-induzierte Ca²⁺-Signal durch den Virulenzfaktor PLY verursacht wird und nicht durch die Kapsel beeinflusst wird. Diese Reaktion der Endothelzellen auf Pneumokokken ließ sich nicht nur *in vitro* zeigen, sondern wurde auch in der isoliert perfundierten Rattenlunge weiter untersucht. Damit konnten wir die physiologische Relevanz unserer Beobachtung untermauern und den Grundstein für die weitere Erforschung der beteiligten Mechanismen in unserer Arbeitsgruppe legen, mit dem Ziel, die klinische Pneumokokkeninfektion in der Zukunft besser behandeln zu können.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 9: Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _{zyt}	Zytosolische Calciumkonzentration
°C	Grad Celsius
μΜ	Mikromolar
ALI	Acute lung injury
[Ca ²⁺] _{max}	höchster gemessener Ca ²⁺ -Wert
ARDS	acute respiratory distress syndrom
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
BlpM	Bacteriocinen
C1q	Protein des Komplementsystems Kollektin
Ca ²⁺	Calcium
CBP	cholin binding protein
CCD	Charge-coupled Device
CD14	Protein: Cluster of differentiation 14
CD16	Protein: Cluster of differentiation 16
CDC	Cholesterol-dependent cytolysin
CFU	Colonie forming unites
cm	Zentimeter
CXCL-8	CXC-Motiv-Chemokin 8
ER	Endoplasmatische Retikulum
F _λ	Fluoreszenzintensität
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
HBS	hepes buffer solution
HMC	human microglial cell line
HPMEC	Human Pulmonary Microvascular Endothelilal Cells
ID	Innendurchmesser
IE	Internationale Einheiten
lgG	Immunglobulin G
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphat

IP3R	Inositol 1,4,5-triphosphat Rezeptor
K _d	Dissoziationskonstante
L	Liter
LA	linksatrial
LytA	Autolysin A
МАРК	mitogen-activated protein kinases
MCU	mitochondrial Ca ²⁺ uniporter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MW	Mittelwert
NanA	Neuraminidase A
NanB	Neuraminidase B
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ - antiporter
NF-ƙB	kappa-light-chain-enhancer
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
ØCa ²⁺	Ca ²⁺ freie Umgebung
OD	Außendurchmesser
PA	pulmonalarteriell
PavA	Pneumococcal adherence and virulence factor A
PLY	Pneumolysin
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase
PspA	Pneumococcal surface proteins A
PspC	Pneumococcal surface proteins C
R	Ratio
R _{max}	Maximale Ratio
R _{min}	Minimale Ratio
RO	Rotenone
RYR	Ryanodin-Rezeptor
S _{b2}	Intensität bei λ2 380 nm in Ca ²⁺ -haltiger Umgebung
SD	Standardabweichung

SD	Standardabweichung
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
S _{f2}	Intensität λ2 380 nm in Ca ²⁺ -freier Umgebung
SOC	store-operated Ca ²⁺ entry
SpxB	Pyruvat-Oxidase
STIM 1	Stromal interaction molecule 1
STIM 2	Stromal interaction molecule 2
TG	Thapsigargin
TLR 4	Toll-like receptor 4
TRP-Kanäle	transient receptor potential Kanäle
Visc	Viskositätskoeffizienten
WT	Wildtyp
ZmpB	Zink Metalloproteinasen B
ZmpC	Zink Metalloproteinasen C
ΔCPS	Kapsel-defizient
ΔPLY	Pneumolysin-defizient
λ	Wellenlänge

7.2. Literaturverzeichnis

- Alonso, M.T. et al., 1999. Ca2+-induced Ca2+ Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin. *Cell*, 144(2), pp.241–254.
- Angus, D.C. & van der Poll, T., 2013. Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*, 369(9), pp.840–51.
- Austrian, R. & Gold, J., 1964. Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Annals of internal medicine*, 60, pp.759–76.

- Avery, O., MacLeod, C. & Mccarty, M., 1943. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal Types. *The journal of experimental medicine*, 79(6).
- Balachandran, P. et al., 2001. The Autolytic Enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin The Autolytic Enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae Is Not Responsible for Releasing Pneumolysin. *J. Bacteriol*, 183(10).
- Barocchi, M.A. et al., 2006. A pneumococcal pilus influences virulence and host. *Sciences-New York*, 103(8), pp.2857–2862.
- Baughman, J.M. et al., 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), pp.341–5.
- Benton, K.A. et al., 1995. A pneumolysin-negative mutant of Streptococcus pneumoniae causes chronic bacteremia rather than acute sepsis in mice. A Pneumolysin-Negative Mutant of Streptococcus pneumoniae Causes Chronic Bacteremia Rather Than Acute Sepsis in Mice. *Microbiology*, 63(2).
- Berry et al., 1989. Contribution of Autolysin to Virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect. Immun*, 57(8).
- Berry, M. et al., 1992. Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of Streptococcus pneumoniae type 3. Analytical Biochemistry, pp.87–93.
- Bhattacharya, S. & Bhattacharya, J., 1992. Segmental vascular responses to voltage-gated calcium channel potentiation in rat lung. *Journal of applied physiology*, 73(2), pp.657–663.
- Bootsma, H.J., Egmont-Petersen, M. & Hermans, P.W.M., 2007. Analysis of the in vitro transcriptional response of human pharyngeal epithelial cells to adherent Streptococcus pneumoniae: evidence for a distinct response to encapsulated strains. *Infection and immunity*, 75(11), pp.5489–99.

- Braun, J.S. et al., 2002. Pneumococcal pneumolysin and H2O2 mediate brain cell apoptosis during meningitis. *Journal of Clinical Investigation*, 109(1), pp.19–27.
- Briles et al., 1992. Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of Streptococcus pneumoniae. *Infection and immunity*, 60(1), pp.111–6.
- Brueckl, C. et al., 2006. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 34(4), pp.453–63.
- Burgess, G.M. et al., 1984. The second messenger linking receptor activation to internal Ca release in liver. *Nature*, 309, pp.53–66.
- Dejana, E., Corada, M. & Grazia, M., 1995. Endothelial cell-to-cell junctions. *The FASEB Journal*, 9(July).
- Dogan, S. et al., 2011. Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4. *Microbes and infection*, 13(1), pp.65–75.
- Dolor, R.J. et al., 1992. Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *The American journal of physiology*, 262(1 Pt 1), pp.C171–81.
- Drago, I., Pizzo, P. & Pozzan, T., 2011. After half a century mitochondrial calcium inand efflux machineries reveal themselves. *The EMBO journal*, 30(20), pp.4119– 25.
- Dupon, G. & Goldbeter, A., 1993. One-pool model for Ca2+ oscillations involving Ca2+ and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for Ca2+ release. *Cell Calcium*, 14, pp.311–322.
- Dupont, G., Combettes, L. & Bird, G.S., 2011. Calcium Oscillations. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.

- Earley, F.G.P. et al., 1987. Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. *FEBS Letters*, 219(1), pp.108– 112..
- Faure, E. et al., 2000. Bacterial Lipopolysaccharide Activates NF- kB through Toll-like Receptor 4 (TLR-4) in Cultured Human Dermal Endothelial Cells. *The Journal* of Biological Chemistry, 275(15), pp.11058–11063.
- Ferrante, A., Rowan-kelly, B. & Paton, J.C., 1984. response by the pneumococcal toxin Inhibition of In Vitro Human Lymphocyte Response by the Pneumo- coccal Toxin Pneumolysin. *Microbiology*, 46(2).
- Feske, S. et al., 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), pp.179–85.
- Finch, E. a, Turner, T.J. & Goldin, S.M., 1991. Calcium as a coagonist of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5004), pp.443–6.
- Foskett, J.K. et al., 2007. Inositol Trisphosphate Receptor Ca 2+ Release Channels. *Physiol Rev*, 87, pp.593–658.
- Freay, A. et al., 1989. Bradykinin and inositol 1,4,5-trisphosphate-stimulated calcium release from intracellular stores in cultured bovine endothelial cells. *European Journal of Physiology*, 414, pp.377–384.
- Gekara, N.O. et al., 2008. Listeria monocytogenes Desensitizes Immune Cells to Subsequent Ca2+ Signaling via Listeriolysin O-Induced Depletion of Intracellular Ca2+ Stores. *Infection and immunity*, 76(2).
- Gekara, N.O. et al., 2005. The cholesterol-dependent cytolysin listeriolysin O aggregates rafts via oligomerization. *Cellular Microbiology*, 7(9), pp.1345–1356.
- Gekara, N.O. & Weiss, S., 2004. Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochem Soc Trans*, 32, pp.712–4.

- Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y., 1985. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *The Journal of biological chemistry*, 260(6), pp.3440–50.
- Heinrich, P.C. et al., 2003. *Kommunikation zwischen Zellen: Rezeptoren und Signaltransduktion*,
- Helms, J.B. & Zurzolo, C., 2004. Lipids as Targeting Signals: Lipid Rafts and Intracellular Trafficking. *Traffic*, (5), pp.247–254.
- Hirst, R.A. et al., 2002. Sensitivities of Human Monocytes and Epithelial Cells to Pneumolysin Are Different Sensitivities of Human Monocytes and Epithelial Cells to Pneumolysin Are Different. *Infection and immunity*, 70(2), pp..1017–1022.
- Höffken, G. et al., 2009. S3-Leitlinien zu Epidemiologie, Diagnostik, antimikrobieller Therapie und Management von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbenen tiefen Atemwegsinfektionen 2nd ed., Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie e.V. der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie e.V. CAPNETZ STIFTUNG.
- Hyams, C. et al., 2010. The Streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infection and immunity*, 78(2), pp.704–15.
- Ikenouchi, H., Peeters, G.A. & Barry, W.H., 1991. Evidence that binding of Indo-I to cardiac myocyte rotein does not markedly change & j for Ca +. *Cell Calcium*, 12, pp.415–422.
- Iliev, A.I. et al., 2007. Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the Streptococcus pneumoniae toxin pneumolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(8), pp.2897–902.
- Johnson, M.K., Geoffroy, C. & Alouf, J.E., 1980. Binding of cholesterol by sulfhydrylactivated cytolysins. *Infection and immunity*, 27(1), pp.97–101.

- Kaestle, S.M. et al., 2007. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 293(4), pp.L859–69.
- Kiefmann, R. et al., 2009. Paracrine purinergic signaling determines lung endothelial nitric oxide production. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 296(6), pp.L901–10.
- Kiefmann, R. et al., 2008. Red blood cells induce hypoxic lung inflammation. *Inflammation*, 111(10), pp.5205–5214.
- Kuebler, W. et al., 2000. A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *The Journal of clinical investigation*, 106(4), p.607.
- Kuebler, W.M. et al., 1999. Pressure is proinflammatory in lung venular capillaries. *Lung*, 104(4), pp.495–502.
- Kuebler, W.M. et al., 2007. Real-time lung microscopy. *Journal of applied physiology* (*Bethesda, Md. : 1985*), 102(3), pp.1255–64.
- Lanie, J.A. et al., 2007. Genome Sequence of Avery 's Virulent Serotype 2 Strain D39 of Streptococcus pneumoniae and Comparison with That of. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 189(1), pp.38–51.
- Li, L. et al., 1999. Agonist-stimulated calcium entry in primary cultures of human cerebral microvascular endothelial cells. *Microvascular research*, 57(3), pp.211–26.
- Li, W. et al., 1998. Cell-permeantcaged InsP3estershowsthat Ca2+ spikefrequency canoptimizegeneexpression Wen-hong. *Nature*, 392(April).
- Liang, J.-L. et al., 2013. Effects of Interleukin-1β on Vascular Reactivity After Lipopolysaccharide-induced Endotoxic Shock in Rabbits and Its Relationship With PKC and Rho Kinase. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 62(1), pp.84–9.

- Lynch, J.P. & Zhanel, G.G., 2009. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 30(2), pp.189–209.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J. & Dockrell, D.H., 2008. Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Current molecular medicine*, 8(6), pp.497–509.
- Masamitsu, I., 1990. Biphasic Ca 2 + Dependence of Inositol in Smooth Muscle Cells of the Guinea Pig Taenia Caeci. *Journal of General Physiology*, 95(June), pp.1103–1122.
- Matthay, M.A. & Zimmerman, G.A., 2005. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 33(4), pp.319–27.
- Meyer, T., Holowka, D. & Stryer, L., 1988. Highly cooperative opening of calcium channels by inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4852), pp.653–6.
- Meyer, T. & Stryer, L., 1988. Molecular model for receptor-stimulated calcium spiking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* of America, 85(14), pp.5051–5.
- Mitchell, A.M. & Mitchell, T.J., 2010. Streptococcus pneumoniae: virulence factors and variation. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(5), pp.411–8.
- Murray, J.F. et al., 1988. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease*, 138(3), pp.720–3.
- Nilius, B. & Droogmans, G., 2001. Ion Channels and Their Functional Role in Vascular Endothelium. *Physiological Reviews*, 81(4).

- Nishio, K. et al., 1998. Differential Contribution of Various Adhesion Molecules to Leukocyte Kinetics in Pulmonary Microvessels of Hyperoxia-exposed Rat Lungs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157, pp.599–609.
- O'Brien, K.L. et al., 2009. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*, 374(9693), pp.893–902.
- Ortqvist, A., Hedlund, J. & Kalin, M., 2005. Streptococcus pneumoniae: epidemiology, risk factors, and clinical features. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 26(6), pp.563–74.
- Ostuni, R., Zanoni, I. & Granucci, F., 2010. Deciphering the complexity of Toll-like receptor signaling. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(24), pp.4109–34.
- Palmer, A.E. et al., 2004. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca 2 analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *PNAS*, pp.1–6.
- Palty, R. et al., 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na+/Ca2+ exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), pp.436–41.
- Parys, J.B., De Smedt, H. & Borghgraef, R., 1986. Calcium transport systems in the LLC-PK1 renal epithelial established cell line. *Biochimica et biophysica acta*, 888(1), pp.70–81.
- Paton, J.C. & Ferrante, A., 1983. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by Inhibition of Human Polymorphonuclear Leukocyte Respiratory Burst, Bactericidal Activity, and Migration by Pneumolysin. *Microbiology*, 41(3).
- Paton, J.C., Rowan-kelly, B. & Ferrante, A., 1984. pneumococcal toxin pneumolysin . Activation of Human Complement by the Pneumococcal Toxin Pneumolysin. *Microbiology*, 43(3).

- Pozzan, T. et al., 1994. Molecular and Cellular Physiology of Intracellular Calcium Stores. *Physiological Reviews*, 74(3).
- Preston, J. & Dockrell, D., 2008. Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiology*, 3(2), pp.205–221.
- Putney, J.W. & Mckay, R.R., 1999. Capacitative calcium entry channels. *BioEssays*, 21, pp.38–46.
- Repp, H. et al., 2002. Listeriolysin of Listeria monocytogenes forms Ca2+-permeable pores leading to intracellular Ca2+-oscillations. *Cellular Microbiology*, 4, pp.483– 491.
- Rogers, P.D. et al., 2003. Pneumolysin-Dependent and -Independent Gene Expression Identified by cDNA Microarray Analysis of THP-1 Human Mononuclear Cells Stimulated by Streptococcus pneumoniae. *Society*, 71(4), pp.2087–2094.
- Roos, J. et al., 2005. STIM1, an essential and conserved component of storeoperated Ca2+ channel function. *The Journal of cell biology*, 169(3), pp.435–45.
- Rubins, J. et al., 1996. Distinct Roles for Pneumolysin's Cytotoxic and Complement Activities in the Pathogenesis of Pneumococcal Pneumonia. *Critical Care Medicine*, 153, pp.1339–46.
- Rubins, J. et al., 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infection and immunity*, 61(4), pp.1352–8.
- Rubins, J. et al., 1992. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. *Infection and immunity*, 60(5), pp.1740–6.
- Rubins, J. & Janoff, E., 2011. Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, pp.21–27.
- Rubins, J.B. et al., 1993. Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infection and immunity*, 61(4), pp.1352–8.

- Simons, K. & Ikonen, E., 1997. Functional rafts in cell membranes. *NATURE*, VOL 387, pp.569–572.
- Smyth, J.T. et al., 2010. Activation and Regulation of Store-operated Calcium Entry. *J Cell Mol Med.*, 14(10), pp.2337–2349.
- Spreer, A. et al., 2004. Differences in Clinical Manifestation of Streptococcus pneumoniae Infection Are Not Correlated with In Vitro Production and Release of the Virulence Factors Pneumolysin and Lipoteichoic and Teichoic Acids Differences in Clinical Manifestation of Streptoco.
- Spreer, A. et al., 2003. Reduced Release of Pneumolysin by Streptococcus pneumoniae In Vitro and In Vivo after Treatment with Nonbacteriolytic Antibiotics in Comparison to Ceftriaxone. *American Society for Microbiology*, 47(8), pp.2649–2654.
- Srivastava, A. et al., 2005. The Apoptotic Response to Pneumolysin Is Toll-Like Receptor 4 Dependent and Protects against Pneumococcal Disease The Apoptotic Response to Pneumolysin Is Toll-Like Receptor 4 Dependent and Protects against Pneumococcal Disease. *Infect. Immun*, 73(10).
- Steinfort, C. et al., 1989. Effect of Streptococcus pneumoniae on Human Respiratory Epithelium In Vitro. *Infection and immunity*, 57(7).
- Streb, H. et al., 1983. Release of Ca2+ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreativ acina cells by inositol-1,4,5-triphosphat. *Nature*, 306.
- Stringaris, A., 2002. Neurotoxicity of Pneumolysin, a Major Pneumococcal Virulence Factor, Involves Calcium Influx and Depends on Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *Neurobiology of Disease*, 11(3), pp.355–368.
- Strunden, M.S. et al., 2012. Glycocalyx degradation causes microvascular perfusion failure in the ex vivo perfused mouse lung: hydroxyethyl starch 130/0.4 pretreatment attenuates this response. *Shock (Augusta, Ga.)*, 38(5), pp.559–66.

- Takahashi, A. et al., 1999. Measurement of intracellular calcium. *Physiological reviews*, 79(4), pp.1089–125.
- Talbot, U.M., Paton, A.W. & Paton, J.C., 1996. Uptake of Streptococcus pneumoniae by respiratory epithelial cells . These include: Uptake of Streptococcus pneumoniae by Respiratory Epithelial Cells. *Infect. Immun*, 64(9).
- Thastrup, O. et al., 1989. Plenary lecture Thapsigargin , a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents and Action*, 27.
- Tilley, S.J. et al., 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*, 121(2), pp.247–56.
- Tiruppathi, C., 2002. Role of Ca2+ signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, 39(4-5), pp.173–185.
- Tran, Q.K., Ohashi, K. & Watanabe, H., 2000. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovascular research*, 48(1), pp.13–22.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. & Rink, T.J., 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *The Journal of cell biology*, 94(2), pp.325–34.
- Wang, X. & Xu, J., 2005. Possible involvement of Ca 2 + signaling in rotenoneinduced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letters*, 376, pp.127–132.
- Ware, L.B. & Matthay, M.A., 2000. The acute respiratory distress syndrom. *The New England Journal of Medicine*, 342(18), pp.1334–1349.
- Wearn, J.T. et al., 1934. The normal behavior of the pulmonary blood vessels with observations on the intermittence of the flow of blood in the arterioles and capilaries. *American journal of physiology*, 109, pp.236–256.
- Wyatt, C.N. & Buckler, K.J., 2004. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *The journal of physiology*, 556(1), pp.175–191.

Ying, X. et al., 1996. Ca2+ Waves in Lung Capillary Endothelium. *Circ. Res.*, 79(4), pp.898–908.

7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC in HBS-Puffer	36
Abbildung 2: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC in Ca ²⁺ -freier Umgebung	37
Abbildung 3: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC nach Stimulation mit Thapsigargin	38
Abbildung 4: Versuchsgruppen der Calciummessung an HPMEC nach Vorinkubation mit Rotenone	39
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus der in vitro Mikroskopie	40
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus der in situ Mikroskopie	42
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der in situ Mikroskopie	45
Abbildung 8: Versuchsgruppen in der isoliert perfundierten Rattenlunge	47
Abbildung 9: Repräsentative Aufnahmen mehrerer HPMEC in vitro	50
Abbildung 10: Repräsentative Darstellung von [Ca ²⁺] _{zyt} in einzelnen HPMEC <i>in vitro</i>	51
Abbildung 11: Repräsentative Darstellung von [Ca ²⁺] _{zyt} in einzelnen HPMEC in vitro	52
Abbildung 11: Gruppenanalyse der [Ca ²⁺] _{max} zu Ausgangsbedingungen und während der Inkubation mit 5*10 ⁵ CFU/mI verschiedener Pneumokokken-Varianten bzw. 5 ng/mI isoliertem PLY in HPMEC	53
Abbildung 12: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl einer Gruppe	54
Abbildung 13: Gruppenanalyse der Latenz bis zum ersten Ca2+-Signal in	

Abbildung 14: Gruppenanalyse der Häufigkeit des Ca ²⁺ -Signals über die 45- minütige Interventionsphase in HPMEC	
Abbildung 15: Repräsentative Darstellung von [Ca ²⁺] _{zyt} in einzelnen Endothelzellen <i>in vitro</i> vor und während der Applikation von D39 WT in Ca ²⁺ -freiem HBS-Puffer	
Abbildung 16: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl pro Gruppe bei angegebenen Untersuchungsbedingungen	59
Abbildung 17: Gruppenanalyse der [Ca ²⁺] _{max} in HPMEC zum Interventionszeitraum bei angegebenen Untersuchungsbedingungen	60
Abbildung 18: Gruppenanalyse des Anteils reagibler HPMEC an der Gesamtzellzahl pro Gruppe bei angegebenen Untersuchungsbedingungen	61
Abbildung 19: Gruppenanalyse der [Ca ²⁺] _{max} in HPMEC zum Interventionszeitraum bei angegebenen Untersuchungsbedingungen	62
Abbildung 20: Repräsentative Aufnahmen einer pulmonalen subpleuralen Venole	65
Abbildung 21: Repräsentative Darstellung von [Ca ²⁺] _{zyt} in einzelnen Endothelzellen pulmonaler Venolen vor und während der Applikation von	66
Abbildung 22: Gruppenanalyse der [Ca ²⁺] _{max} zu Ausgangsbedingungen und während der Applikation von 5*10 ⁵ CFU/ml verschiedenen Pneumokokken-Varianten bzw. 5 ng/ml isoliertem PLY in Endothelzellen subpleuraler Venolen	
Abbildung 23: Gruppenanalyse des Anteils reagibler Endothelzellen subpleuraler Venolen an der Gesamtzellzahl einer Gruppe	68
Abbildung 24: Gruppenanalyse der Latenz bis zum ersten Ca ²⁺ -Signal in subpleuralen Endothelzellen der isoliert perfundierten Rattenlunge	69
Abbildung 25: Gruppenanalyse der Häufigkeit des Ca ²⁺ -Signals über die 45-	

minütige In	nterventionsphase	in subpleuralen	Endothelzellen	der	isoliert	
perfundierte	en Rattenlunge				7	0

7.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pneumokokkenstämme und Resistenzen	30
Tabelle 2: Variablen in der Kalibration nach Grynkiewicz	32
Tabelle 3: Versuchsgruppen der in vitro Versuche	35
Tabelle 4: Endpunkte	40
Tabelle 5: Versuchsgruppen der in situ Versuche	46
Tabelle 6: Endpunkte	48
Tabelle 7: Untersuchte Zellen in den in vitro Versuchen an HPMEC	49
Tabelle 8: Versuchsgruppen der in situ Versuche	64
Tabelle 9: Abkürzungsverzeichnis	90

7.5. Danksagung

Besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Rainer Kiefmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die produktive Laborzeit. Auch für die daran anschließende Betreuung beim Verfassen dieser Arbeit sowie das Korrekturlesen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich Frau Dr. Anne Mecklenburg für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, ihr unermüdliches persönliches Engagement, die tatkräftige Unterstützung und großartige Motivation

Das gesamte Labor stand mir ebenfalls jederzeit für Rückfragen und Anregungen zur Verfügung. Insbesondere danke ich Frau Monika Weber, Claudia Lüchau, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn, Andrea Pawelczyk, Anke Schuster, Dr. Martina Kiefmann und Dr. Cynthia Olotu für die freundliche Aufnahme im Labor, sowie für die kollegiale Unterstützung im Zuge meines Promotionsvorhabens. Die geduldige Beantwortung aller entstehenden Fragen hat mir sehr geholfen.

Bei meiner Großmutter Ruth Beate Nilsson möchte ich mich für die vielen Korrekturen bedanken, für die sie auch noch schwer krank immer Zeit und Kraft gefunden hat. Darüber hinaus sind die Neugier und der Forschergeist, den sie mir mein ganzes Leben vorgelebt hat, zentrale Motivation gewesen, die mich überhaupt zur Wissenschaft geführt hat und der Grund, warum ich diese Arbeit ihr widme.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin, sowie meiner Freundin Julia, die den größten Teil der alltäglichen Erfolge und Misserfolge zu ertragen hatte und mir durchgehend die Unterstützung gegeben hat, die ich brauchte.

7.6. Lebenslauf

7.7. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: