

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

aus der Abteilung Experimentelle Anästhesiologie

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

Doktorvater: Prof. Dr. med. Rainer Kiefmann

Mechanismen der Signaltransduktion durch *Streptococcus pneumoniae* am pulmonalen Endothel

Dissertation

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

vorgelegt von:

Franziska Ebert

aus Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
27.09.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Aymelt Itzen

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Klinische Bedeutung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2 Prophylaxe und Therapie Pneumokokken assoziierter Erkrankungen..	2
1.3 Pneumolysin (PLY)	3
1.4 Calciumspeicher und Calciumfreisetzung über verschiedene Signalwege in EC und anderen Zelltypen	7
1.5 Stand der Forschung zu Toxin-induzierten zytosolischen Calcium- (Ca ²⁺ _{zyt}) Signalen	13
1.6 Fragestellung	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Materialien	17
2.1.1 Reagenzien	17
2.1.2 Geräte	18
2.2 Materialien für <i>in vitro</i> Versuche	18
2.2.1 Reagenzien/Medikamente	18
2.2.2 Lösungen	19
2.2.3 Materialien für die Zellkultur	19
2.2.4 Materialien für die Transfektion	19
2.2.5 Materialien für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und DNA- Amplifikation	20
2.2.6 Materialien für Proteinextraktion, Konzentrationsbestimmung und Western Blot	20
2.2.7 Geräte	22
2.2.8 Material und Medikamente für die Pneumokokkenkultivierung.....	22
2.3 Methoden	23
2.3.1 Kultivierung verschiedener Zelltypen	23
2.3.2 Ca ²⁺ - <i>Imaging</i> Versuche <i>in vitro</i>	23
2.3.3 Zellvitalität	29

2.3.4	Inhibition Ca ²⁺ -freisetzender Signalwege	32
2.3.5	siRNA- <i>Knockdown</i> von G-Proteinen in HEK-Zellen	33
2.3.6	Statistik.....	40
3.	ERGEBNISSE	41
3.1	Abhängigkeit des Ca ²⁺ -Signals von der Porenbildung durch WT D39 41	
3.1.1	Einfluss des extrazellulären Ca ²⁺ auf das PLY-vermittelte zelluläre Ca ²⁺ -Signal	45
3.2	Transduktion des Ca ²⁺ -Signals - Rezeptorassoziation des Ca ²⁺ -Signals	47
3.2.1	IP ₃ -Rezeptor - Xestospongine C	47
3.2.2	Phospholipase C - U73122 / U73343	48
3.2.3	Rezeptor-Tyrosinkinasen - Genistein	50
3.2.4	Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca ²⁺ -Signales und der ATP-Antwort nach WT D39 mit oder ohne Inhibition verschiedener Signalwege	51
3.3	Validierung des Ca ²⁺ -Signales in Reaktion auf Pneumokokken in HEK-Zellen	55
3.3.1.	Humane embryonale Nierenzellen	55
3.4	Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca ²⁺ -Signales und der ATP-Antwort von HPMEC und HEK-Zellen.....	58
3.5	Untersuchung zur Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) am WT D39 getriggertem Ca ²⁺ -Signal	62
3.5.1	Nachweis der Expression des Gα11 und des GαQ in HEK-Zellen und in HPMEC.....	62
3.5.2	Überprüfung der Expression von GαQ und Gα11 in den Einzel- und Doppeltransfektionsversuchen auf RNA-Ebene	64
3.5.3	Überprüfung der Expression von GαQ und Gα11 in den Einzel- und Doppeltransfektionsversuchen auf Protein-Ebene	67

3.5.4	<i>Knockdown</i> von Gα11 und GαQ in HEK-Zellen – Versuche unter Ca ²⁺ -haltigen Bedingungen.....	70
3.5.5	<i>Knockdown</i> von Gα11 und GαQ in HEK-Zellen - Versuche unter Ca ²⁺ -freien Bedingungen	72
3.5.6	Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca ²⁺ -Signales und der ATP-Antwort in den unterschiedlichen Transfektionsgruppen.....	73
3.6	Zytotoxizität von <i>S. pneumoniae</i>	77
3.6.1	Abhängigkeit der LDH-Freisetzung vom <i>S. pneumoniae</i> ausgelöstem Ca ²⁺ -Signal.....	77
3.6.2	Führt PLY zu einer verstärkten LDH-Freisetzung?.....	78
3.6.3	Reduziert die BAPTA-Vorinkubation die PLY-induzierte LDH-Freisetzung?.....	79
3.6.4	Zeitkinetik der Zytotoxizität von <i>S. pneumoniae</i> und Abhängigkeit vom Ca ²⁺ -Signal im Calcein-Ethidiumhomodimer-Vitalitätsassay	80
4.	DISKUSSION.....	82
4.1	Datenvalidierung.....	82
4.1.1	Limitationen der Inhibitoren und siRNA.....	82
4.2	Das Ca ²⁺ -Signal entsteht durch Porenbildung	87
4.3	Der Signalweg der intrazellulären Ca ²⁺ -Freisetzung	90
4.3.1	Wird das Ca ²⁺ -Signal durch IP ₃ -R und die PLC vermittelt?	90
4.3.2	Entsteht das Ca ²⁺ -Signal durch Tyrosinkinasen oder GPCR?.....	92
4.4	Das Ca ²⁺ -Signal stellt kein Todessignal der Zelle dar.....	95
4.5	Entstehung und Terminierung des extrazellulären Ca ²⁺ -Einstroms – Ausblick auf zukünftige Versuche	99
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	105
5.1	Summary	106
6.	VERZEICHNISSE	108
6.1	Literaturverzeichnis.....	108

6.2	Abkürzungsverzeichnis	120
6.3	Abbildungsverzeichnis	123
6.4	Tabellenverzeichnis	126
7.	DANKSAGUNG	127
8.	LEBENS LAUF	129
9.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	130

1. Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung von *Streptococcus pneumoniae*

Das grampositive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*/Pneumokokken) verursacht Erkrankungen wie Otitis media, Sinusitis, Pneumonie und Meningitis bis hin zu einer systemischen Infektion im Rahmen einer Sepsis (Hedlund et al. 2005, Marriott et al. 2008). *S. pneumoniae* ist mit ca. 70% der häufigste Auslöser ambulant erworbener Pneumonien (Caterall et al. 1999, Hedlund et al. 2005, Musher et Thorner 2014) und tritt besonders häufig bei Kindern unter zwei Jahren und Erwachsenen über dem 65. Lebensjahr auf (Davidson et al. 1994, Hedlund et al. 2005). Die Inzidenz der Pneumonie in westlichen Ländern beträgt jährlich 1% in der Gesamtbevölkerung und bleibt eine Hauptursache von Komplikationen mit hoher Mortalität (Hedlund et al. 2005, Musher et Thorner 2014). Zu diesen Komplikationen gehört das akute Atemnotsyndrom (ARDS), welches eine Letalität von 40-46% hat (Pierrakos et al. 2011). Hierbei kommt es zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität sowie Schädigung der Endothel- und Epithelzellen, die wichtige Bestandteile der alveolären-kapillären Barriere sind. Dies führt zu einer vermehrten intraalveolären Flüssigkeits- und Proteinansammlung sowie zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, welche neutrophile Granulozyten rekrutieren, die durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und lytischen Enzymen den entzündlichen Prozess verstärken (Pierrakos et al. 2011). Durch die intraalveoläre Flüssigkeitsansammlung wird die Wirkung von Surfactant aufgehoben und es entstehen Atelektasen, welche den Gasaustausch zwischen Kapillaren und Alveolen vermindern. Die dadurch entstehende Abnahme der Oxygenierung des Blutes führt ohne therapeutische Intervention zum Multiorganversagen und Tod des Patienten (National Heart, Lung, and Blood Institute 2014).

1.2 Prophylaxe und Therapie Pneumokokken assoziierter Erkrankungen

Bisher wurden 90 verschiedene Pneumokokkenstämme nachgewiesen (Kalin 1998). Die häufigsten isolierten Stämme bei Kindern waren 6, 14, 19 und 23, welche, vermutlich auf Grund des erhöhten Antibiotikaeinsatzes bei Kindern, zu den häufigsten resistenten Stämmen gehören (Hedlund et al. 2005, Klugman 2000). Mittlerweile existieren zwei verschiedene Impfstoffe gegen Pneumokokken, von denen der eine ein 23-valenter Polysaccharid-Impfstoff für Erwachsene und der andere ein heptavalenter Polysaccharid-Konjugat-Impfstoff (PCV7) für Kinder ist (Hedlund et al. 2005). Eine Studie von *Hammitt et al.* zeigte, dass nach der Impfung die Besiedlung Erwachsener mit resistenten Pneumokokkenstämmen, die im PCV7-Impfstoff enthaltenen waren, abnahm. In den nachfolgenden Jahren zeigte sich in dieser Studie jedoch ein Anstieg resistenter Pneumokokkenstämme (z.B. 19A), die nicht in der Impfung enthalten waren. Die vermehrte Besiedlung mit den nicht in der Impfung enthaltenen Pneumokokkenstämmen und deren antibiotische Behandlung, löste eine verstärkte Resistenzenbildung dieser Stämme aus (Hammitt et al. 2006).

Nach Angaben von *Lynch et al.* waren 2009 weltweit etwa 15-30% der *S. pneumoniae* resistent gegenüber mindestens drei Antibiotika (Lynch et al. 2009). In einer Studie von *Feikin et al.* zu invasiven Erkrankungen mit *S. pneumoniae* war die Mortalitätsrate in den ersten Tagen der Antibiotikatherapie nicht von der Sensibilität des Bakteriums gegenüber dem Antibiotikum abhängig, sondern stieg erst ab dem 4. Erkrankungstag bei Bakterienstämmen mit einer Minimalen Hemmkonzentration (MIC) $>4\mu\text{g/ml}$ gegenüber Penicillin signifikant an (Feikin et al. 2000). Dies bestätigt die Daten von *Austrian et Gold*, die bereits 1964 die Reduktion der Mortalität bei invasiven Pneumokkeninfektionen gegenüber der Serum- oder Standardtherapie erst ab dem 5. Tag der Antibiotikatherapie beschrieben (Austrian et al. 1964). Beide Studien schlussfolgern, dass in den ersten Krankheitstagen andere Faktoren für die Mortalität der invasiven Pneumokkeninfektionen verantwortlich zeichnen. Daher könnten neue Therapiemethoden speziell an den pathophysiologischen Vorgängen innerhalb der ersten Erkrankungstage angreifen. Besonders für Personen mit Immundefizienz, insbesondere bei Patienten mit *Acquired*

Immune Deficiency Syndrome (AIDS), ist die Rate an Infektionen mit *S. pneumoniae* ca. 10-fach höher als in der Normalbevölkerung (Austrian 1999). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der Erforschung weiterer Therapiemethoden.

1.3 Pneumolysin (PLY)

PLY ist ein 53-kDa großes Protein (Walker et al. 1987) und ein wichtiger Virulenzfaktor von *S. pneumoniae*, der von fast allen klinisch isolierten Stämmen exprimiert wird (Kancierski et al. 1987). Es gehört gemeinsam mit weiteren von grampositiven Bakterien gebildeten Toxinen wie Lysterolysin O, Perfringolysin O, Streptolysin O und Intermedilysin in die Familie der cholesterinabhängigen Zytolysine (CDC) (Marriott et al. 2008). PLY liegt als Monomer vor, kann jedoch Oligomere und schließlich Poren bilden (Gilbert et al. 1998). Die ringförmigen Poren haben einen Durchmesser von 30nm; sie bestehen aus 40 Monomeren, wobei auch sogenannte „Mikroporen“ von nur 1-2nm Durchmesser aus wenigen PLY-Monomeren vorhanden sind (Sonnen et al. 2014). Für die Bildung von Poren durch PLY sind die pH-abhängige Bindung an cholesterolhaltige Areale in der Plasmamembran (Johnson et al. 1980) und der strukturbeeinflussende Cysteinrest C428 notwendig (Saunders et al. 1989). In diesem hoch konservierten Cysteinrest ist ebenfalls das Tryptophan W433 relevant für die Porenbildung. Dessen Austausch zu Phenylalanin führt zu einer Reduktion der Porenbildung auf nahezu 1% im Vergleich zum Wildtyp (Marriott et al. 2008, Korchev et al. 1998).

PLY liegt im Zytosol des Bakteriums vor und enthält keine Sequenz für ein Sekretionssignal (Marriott et al. 2008). Die Freisetzung von PLY erfolgt durch die Autolyse des Bakteriums, insbesondere durch das Autolysin LytA, durch Zelllyse des Bakteriums durch Immunzellen oder nach Antibiotikabehandlung sowie in bestimmten log-Wachstumsphasen des Bakteriums (Hirst et al. 2004, Marriott et al. 2008).

Hohe Konzentrationen von PLY führen zur Zelllyse und geringere Konzentrationen können zur Apoptose führen (Iliev et al. 2007). PLY führt zur Aktivierung vieler verschiedener Gene, zu epigenetischen Veränderungen

sowie zur Aktivierung verschiedener Signalwege (Marriott et al. 2008). In humanen Neuroblastomzellen wiesen *Stringaris et al.* beispielsweise die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 durch die Porenbildung des PLY und einen damit verbundenen Ca^{2+} -Einstrom nach (Stringaris et al. 2002). Dieser Signalweg führt nach Angaben dieser Arbeitsgruppe wahrscheinlich zur Aktivierung der Mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore und nachfolgender Apoptose. In sublytischen Konzentrationen führt PLY beispielsweise zur Aktivierung der Rho- und Rac-GTPasen, bei denen besonders Rho apoptotische Prozesse, die Genexpression und die Mikrotubuli des Zytoskeletts beeinflusst (Iliev et al. 2007). Des Weiteren wurde von *Lucas et al.* die durch PLY induzierte Hyperpermeabilität in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (EC) der Lunge über die Aktivierung der Proteinkinase C- α (PKC- α) und Arginase I beschrieben (Lucas et al. 2012). Die Arbeitsgruppe wies nach, dass die Aktivierung der PKC- α durch den über die PLY-Poren entstehenden zytosolischen Calciumanstieg ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieg) RhoA aktiviert und über einen Verlust von vaskulären EC-Cadherinen zu einer kompromittierten endothelialen Barriere führt. Die Aktivierung der Arginase I über PKC- α und RhoA führt zu verminderter Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion, welches zur Hyperpermeabilität des Endothels führt (Lucas et al. 2012). Passend dazu konnten *Witzenrath et al.* zeigen, dass die intravenöse Gabe von PLY in einem Mausmodell zur Aufnahme von PLY in arterielle EC und nachfolgend zur Vasokonstriktion führte (Witzenrath et al. 2006). In humanen EC der Umbilikalvene erhöhte PLY in den Versuchen der Arbeitsgruppe ebenso die Permeabilität.

Neben seinen zytolytischen Eigenschaften kann PLY den klassischen Weg des Komplementsystems aktivieren. *Paton et al.* zeigten, dass nach PLY-Inkubation eine erhöhte Rate an C3-Konversion im Serum stattfindet, sodass das übrige C3 anschließend nur noch vermindert zur Opsonierung von *S.pneumoniae* im Vergleich zum Kontrollserum fähig war (Paton et al. 1984). So hemmt PLY die Fähigkeiten des Immunsystems zur Bekämpfung der Infektion. Der Vergleich zwischen einem PLY-defizienten und einem Wildtyp-Stamm des *S. pneumoniae* deutete in einem Mausmodell nach intratrachealer Instillation auf eine für den

Wildtyp höhere intraalveoläre Replikation, schnellere Penetrationsrate von den Alveoli ins Interstitium und ins Blut sowie höheren Raten an Bakteriämie hin (Rubins et al. 1995). PLY defiziente Stämme haben geringere Bakterienzahlen bei der Kolonisierung des Nasopharynx, welcher als Reservoir für den unteren Respirationstrakt und die Bakteriämie gilt (Kadioglu et al. 2002).

Auf der anderen Seite führt PLY jedoch zu einer besseren Erkennung des Bakteriums durch das angeborene Immunsystem. PLY stimuliert in Makrophagen über den *Toll-like receptor 4* (TLR4) und sein Adapterprotein *Myeloid differentiation factor 88* (Myd88) die Bildung von Interleukin-6 (IL-6) und *Tumor-necrosis factor- α* (TNF- α) (Malley et al. 2003). IL-6 und TNF- α sind Zytokine, die zur weiteren Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen führen, welche die Pneumokokken phagozytieren (Hirst et al. 2004).

Mäuse mit einer spontanen Mutation im TLR4 zeigen eine erhöhte Rate letaler systemischer Infektionen nach nasopharyngealer Applikation pneumolysin-sezernierender Pneumokokken (Malley et al. 2003). Dies deutet darauf hin, dass PLY in den frühen Erkrankungsstadien den Wirtsorganismus bei der Erkennung und Bekämpfung des Bakteriums unterstützt. Im Verlauf der Infektion setzen die Neutrophilen jedoch radikale Sauerstoffspezies und Proteasen frei, welche gemeinsam mit dem durch Lyse der Pneumokken freigesetzten Pneumolysin zur Zellschädigung führen. So wird der inflammatorische Prozess durch das angeborene Immunsystem im Verlauf verstärkt (Marriott et al. 2008).

An der Entstehung der Bakteriämie sind sowohl die zytolytischen Eigenschaften des PLY, als auch die Eigenschaft das Komplementsystem zu aktivieren, beteiligt. Dies wurde durch Mutationen der *S. pneumoniae* für je eine dieser Eigenschaften *in situ* in Mäusen nachgewiesen (Jounblat et al. 2003). Die zytolytischen Eigenschaften von PLY schienen in diesen Versuchen für die Rekrutierung von Neutrophilen verantwortlich zu sein, während die Eigenschaft das Komplementsystem zu aktivieren zur Rekrutierung von T-Zellen führte (Jounblat et al. 2003). Passend dazu waren in einer Studie von *Kadioglu et al.* CD-4-T-Zell negative *Knock-out* Mäuse anfälliger für die Entwicklung einer

Bronchopneumonie und Sepsis durch *S. pneumoniae* als die Kontrollgruppe (Kadioglu et al. 2004).

Die Therapie der Bronchopneumonie und Sepsis durch *S. pneumoniae* mit Antibiotika führt zu einer akuten Freisetzung von PLY, welche beim Patienten organspezifische Effekte hat (Hirst et al. 2004). Hierzu zählt beispielsweise der PLY-induzierte Kontraktionsverlust der Kardiomyozyten durch extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom über die PLY-Poren und in höherer PLY-Konzentration ([PLY]) die direkte Zellyse der Kardiomyozyten (Alhamdi et al. 2015). Schon nach begonnener antibiotischer Therapie und nach Eradikation des Bakteriums in den Lungen, konnte PLY noch nach Tagen in der Lunge nachgewiesen werden (Lucas et al. 2012). Da PLY in fast allen Serotypen vorkommt, bietet es das Potential eines möglichen Impfstoffes (Marriott et al. 2008), der auch die PLY-induzierten Organschäden vermindert. Es wäre jedoch nur ein PLY ohne zytolytische Aktivität einsetzbar (Marriott et al. 2008), damit durch die Impfung keine Organschäden entstehen.

Daher ist die Kenntnis über die durch PLY ausgelösten Signalwege auch klinisch sehr relevant. Zunehmend wird in der Literatur diskutiert, ob PLY neben der Bindung an Cholesterin vorangehend an Rezeptoren bindet und Cholesterin bei einigen CDCs lediglich für die Porenbildung relevant ist. Für das Toxin Intermedilysin (ILY) von *Streptococcus intermedius* konnten *Giddings et al.* nachweisen, dass ILY primär an das humane Membranprotein CD59 bindet und Cholesterin erst für die Porenbildung selbst relevant ist (Giddings et al. 2004). Für das CDC PLY konnten *Shewell et al.* an Erythrozyten kürzlich zeigen, dass vor der Bindung an Cholesterin eine Bindung an das Sialyl Lewis X Antigen des Lewis Blutgruppensystems stattfindet und Cholesterin erst relevant für die nachfolgende Porenbildung ist. Die Arbeitsgruppe diskutiert dieses Glykan des Lewis Blutgruppensystems als möglichen Rezeptor des PLY auf Erythrozyten (Shewell et al. 2014). Eine Möglichkeit wäre die Aktivierung von Signalwegen in cholesterinreichen Regionen der Plasmamembran, den sogenannten *Lipid rafts* oder den Caveolae. In diesen Regionen der Plasmamembran befinden sich besonders viele Rezeptoren und Signalproteine, unter anderem ist besonders das G-Protein G α Q in den Caveolae angereichert (Oh et al. 2001). Listerolysin-

Monomere binden an cholesterolreiche Regionen der Plasmamembran und führen durch ihre Oligomerisierung zur Aggregatbildung von *Lipid rafts* (Gekara et al. 2005). *Gekara et al.* konnten eine von der Oligomerisierung und Aggregatbildung abhängige Phosphorylierung von Tyrosinresten nachweisen und vermuteten die Aktivierung weiterer Signalwege durch die Aggregatbildung der *Lipid rafts*. Diese Aggregatbildung findet unabhängig von der Porenbildung statt (Gekara et al. 2005). Auch für PLY konnte in humanen Epithelzellen der Kornea gezeigt werden, dass PLY an *Lipid rafts* bindet (Taylor et al. 2013).

In EC, die wichtiger Bestandteil der pulmonalen Barriere sind, ist in Reaktion auf PLY bisher nur die Zytokinproduktion und Hyperpermeabilität nachgewiesen (Neill et al. 2015). Deswegen soll diese Arbeit weitere Einsicht in die durch PLY bzw. *S. pneumoniae* induzierten Signalwege bringen.

1.4 Calciumspeicher und Calciumfreisetzung über verschiedene Signalwege in Endothelzellen und anderen Zelltypen

Endothelzellen (EC) regulieren über verschiedenste Signalwege Immunantworten, die Blutgerinnung, die Permeabilität zwischen dem intravasalen Kompartiment und dem Gewebe sowie den Gefäßtonus und beteiligen sich an der Angiogenese und an der Gefäßreparatur (Tran et al. 2000). Viele der Funktionen der EC werden über Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{zyt}$) beeinflusst (Tran et al. 2000). In nicht stimulierten EC beträgt die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ 30-100 μ M und kann nach der Stimulation mit Agonisten auf das fünf- bis zehnfache ansteigen (Tiruppathi et al. 2003). Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege sind beispielsweise für die Sekretion des von Willebrand Faktor (vWF), Prostacyclin (PGI_2) und NO mitverantwortlich (Vischer et al. 1998), welche für die Gefäßreparatur und Vasodilatation benötigt werden. Inflammatorische Stimuli können die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in EC erhöhen (Tiruppathi et al. 2003), was zu einer erhöhten Permeabilität der Zellen führt (Lum et al. 1992) und wahrscheinlich bei der Entstehung eines Lungenödems mitwirkt.

Es existieren verschiedene Mechanismen der Ca^{2+} -Freisetzung, bei denen entweder Ca^{2+} über die Plasmamembran ins Zytosol einströmt oder aus

intrazellulären Organellen freigesetzt wird. Die Plasmamembran enthält spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Yu et al. 2005), *store-operated Ca^{2+} -entry* (SOCE-) Kanäle (Hogan et Rao 2015), nicht-selektive Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle (Putney 1987) und *Transient receptor potential* (TRP)-Kanäle (Sullivan et Earley 2013) sowie $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Kaye et Kelly 1999, Dömötör et al. 1999), welche die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ erhöhen können. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung kann über Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (IP_3 -R) aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Tran et Watanabe 2006), über *Two-pore channels* (TPC) aus den Lysosomen und Endosomen (Zhu et al. 2010) und über TRP-Kanäle aus verschiedenen intrazellulären Organellen (Sullivan et Earley 2013) stattfinden.

Etwa 75% der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in EC werden im ER, dem Hauptort der Proteinsynthese einer Zelle, gespeichert (Wood et al. 1998). Das ER nimmt über Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Ca^{2+} -Pumpen (SERCA) Ca^{2+} auf, speichert es über Ca^{2+} -bindende Proteine wie Calsequestrin und Calreticulin und setzt es über die Aktivierung des *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) an seinem Rezeptor am ER wieder ins Zytosol frei (Berridge 1993). Durch verschiedene Ca^{2+} -bindende Proteine, die jeweils bis zu 30 Ca^{2+} -Ionen binden können, erreicht die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ bis zu 3mM (Sambrook et al. 1990). Tran und Watanabe beschrieben, dass Ryanodinrezeptoren (RyR) in EC Ca^{2+} aus dem ER freisetzen, jedoch werden RyR vorherrschend in gestreiften Muskelzellen beschrieben (Tran et Watanabe 2006). Detaillierte Daten zu RyR in EC existieren wenig; vermutlich setzen die IP_3 -R in EC den größeren Anteil an Ca^{2+} aus dem ER frei. Des Weiteren beschrieb die Arbeitsgruppe eine kontinuierliche Ca^{2+} -Freisetzung in ruhenden EC durch ein Leck des ER für Ca^{2+} , welches durch die kontinuierlichen Ca^{2+} -Wiederaufnahmemechanismen ins ER kompensiert wird (Tran et Watanabe 2006). Verschiedene Ca^{2+} -ATPasen tragen dazu bei, die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ auf konstant niedrigem Niveau zu halten. Diese sind in der Plasmamembran (PMCA), der zum endoplasmatischen Retikulum gelegenen Kernhülle sowie dem Golgi-Apparat (SPCA und SERCA) vorhanden (Brini et Carafoli 2009).

Weitere 25% der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ werden in den Mitochondrien gespeichert (Tran et Watanabe 2006). Es wird angenommen, dass die Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien angetrieben vom elektrochemischen Gradienten über einen Uniporter für Ca^{2+} stattfindet (Tran et Watanabe 2006). Die Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrien ist 10-100 mal langsamer als der Ca^{2+} -Ausstrom über den Na^+/Ca^{2+} -Austauscher und den Na^+ -unabhängigen Ca^{2+} -Ausstrom (Gunter et Pfeiffer 1990).

Allgemein gelten EC als nicht erregbare Zellen, sodass spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle nur zu einem geringen Anteil in EC vorkommen bzw. auf Grund von geringer Leitfähigkeit wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung sind (Tran et Watanabe 2006).

Dahingegen spielt insbesondere der *SOCE* in EC eine wichtige Rolle bei der Ca^{2+} -Hämostase (Tran et al. 2000, Tran et Watanabe 2006). *Stromal interaction molecule 1* (STIM1) aktiviert, durch die Calciumkonzentration des ER ($[Ca^{2+}]_{ER}$) reguliert, den *Ca^{2+}-release-activated-Ca^{2+}-channel* (CRAC), welcher aus mehreren Orai Proteinen besteht. Sinkt die $[Ca^{2+}]_{ER}$ unter $100-300\mu M$, bildet STIM1 Oligomere und bewegt sich innerhalb seiner Verankerung in der Membran des ER zu Verbindungen zwischen der Plasmamembran und dem ER. STIM1 interagiert mit der Plasmamembran und mit Orai. Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung des für Ca^{2+} selektiven Ionenkanals CRAC und zum Wiederauffüllen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher (Hogan et Rao 2015).

Eine weitere Gruppe von Ca^{2+} -Kanälen sind die Rezeptor-gesteuerten Ca^{2+} -Kanäle. Ein Agonist bindet an einen Rezeptor, der die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zunächst über eine Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern erhöht, der anschließend ein Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellulärraum folgt (Putney et al. 1987). Zu den Rezeptor-gesteuerten Ca^{2+} -Kanälen gehören G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

(GPCR), deren Untereinheit $G\alpha_q$ nach Agonistenbindung von der GDP- in die GTP-gebundene Form übergeht (Tran et Watanabe 2006). Dadurch kann $G\alpha_q$ von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit abdiffundieren und die Phospholipase C- β (PLC- β) aktivieren. Die PLC- β hydrolysiert das Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PPI) der Plasmamembran zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG) (Tran et Watanabe 2006). Die Aktivierung des als Tetramer vorliegenden IP_3 -R benötigt IP_3 und Ca^{2+} (Taylor et Tovey 2010), welches zur Öffnung des für Ca^{2+} -permeablen Kanals des IP_3 -R führt (Ehrlich et Watras 1988).

Weitere Rezeptor-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle sind die Tyrosinkinase, die die Phospholipase C- γ (PLC- γ) aktivieren und ebenfalls IP_3 und DAG bilden (Berridge 1993).

Bereits 1994 konnte gezeigt werden, dass der IP_3 -Rezeptor (IP_3 -R) in Endothelzellen exprimiert wird und besonders in der perinukleären Region vorhanden ist (Bourguignon et al. 1994). Es existieren drei Subtypen des IP_3 -R (IP_3 -R1, IP_3 -R2, IP_3 -R3) (Laflamme et al. 2002). IP_3 -R1 und IP_3 -R3 sind nach Angaben von *Laflamme et al.* in bovinen aortalen EC vorwiegend in der perinukleären Region am ER und IP_3 -R2 innerhalb des Zellkerns lokalisiert. In anderen Zelltypen gelten der Golgi-Apparat, sekretorische Vesikel und die Plasmamembran als IP_3 -R-sensible Ca^{2+} -Speicher (Vermassen et al. 2004). Nach Angaben von *Vermassen et al.* scheint die Verteilung des IP_3 -R nicht statisch zu sein, da sich nach der Bindung von Agonisten oder abhängig vom physiologischen Zustand der Zelle die Verteilung des IP_3 -R innerhalb der Zelle verändern kann.

Es wird angenommen, dass der IP_3 -R über die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ biphasisch reguliert wird, indem $[Ca^{2+}]_{zyt}$ bis zu 300nM stimulierend wirkt und als sogenanntes *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release* (CICR) zu weiterer Ca^{2+} -Freisetzung führt, während $[Ca^{2+}]_{zyt}$ über 300nM hemmend auf den IP_3 -R wirken (Iino 1990). Dies ermöglicht dem IP_3 -R über die Ca^{2+} -Freisetzung benachbarte Rezeptoren zu beeinflussen. So kommt es bei geringen $[IP_3]$ zunächst zu sogenannten *Ca²⁺-blips* mit einer Öffnung des IP_3 -R für 130ms und einem $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstieg von 40nM. Bei weiter ansteigender $[IP_3]$ entstehen *Ca²⁺-puffs*, bei denen der IP_3 -R für 1sec geöffnet ist und die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ um 50-600nM ansteigt. Steigt die $[IP_3]$

weiter, erhöht sich die Frequenz dieser Ca^{2+} -puffs und es kommt über CICR zur Generierung eines Ca^{2+} -Signales in der ganzen Zelle (Taylor et al. 2009). In permeabilisierten Hepatozyten nehmen Mitochondrien einen weiteren indirekten Einfluss auf den IP_3 -R, indem sie durch Ca^{2+} -Aufnahme den positiven Feedback-Mechanismus des Ca^{2+} auf den IP_3 -R des ER vermindern. Besonders Regionen mit hoher Dichte an Mitochondrien schwächen über den oben genannten Mechanismus die Ca^{2+} -Signale des IP_3 -R am ER ab (Hajnóczky et al. 1999).

Des Weiteren konnte in klonalen B-Zell-Lymphom-Zellen (DT40) eine Beteiligung des IP_3 -R am SOCE gezeigt werden (Taylor et al. 2009). Obwohl in den DT40 10.000 CRAC-Kanäle für den SOCE verantwortlich sind, reichten ein bis drei IP_3 -R in der Plasmamembran, um 50% des Ca^{2+} -Einstromes zu verursachen, da der IP_3 -R eine hohe unspezifische Leitfähigkeit für Ca^{2+} besitzt (Dellis et al. 2006, Taylor et al. 2009). Ein IP_3 -R ähnliches Protein wurde in den Caveolae von bovinen aortalen EC beschrieben (Fujimoto et al. 1992).

Eine weitere Gruppe von Rezeptor-gesteuerten- Ca^{2+} -Kanälen sind die in der Plasmamembran und in intrazellulären Organellen vorhandenen TRP-Kanäle, von denen 28 verschiedene in Säugetieren klassifiziert wurden und 21 von ihnen in EC exprimiert werden (Sullivan et Earley 2013). Sullivan beschreibt, dass von den 28 TRP-Kanälen 26 für Ca^{2+} permeabel sind. In vaskulären EC ist der Ca^{2+} -Einstrom über TRP-Kanäle wichtig für den Permeabilitätszustand der endothelialen Barriere, für die Angiogenese und die durch das Endothel gesteuerte Vasodilatation (Earley et Brayden 2015). Des Weiteren konnten unter anderem Earley et Brayden zeigen, dass TRPV4 Kanäle an der Entstehung des Lungenödems beteiligt sind. Nach der Stimulation eines GPCR kommt es wie bereits beschrieben zur Generierung von IP_3 und DAG. DAG kann direkt den Einstrom von Ca^{2+} über TRPC3, TRPC6, und TRPC7 an der Plasmamembran aktivieren (Earley et Brayden 2015).

2010 entdeckte die Arbeitsgruppe Zhu et al. Ca^{2+} -Kanäle auf Endosomen und Lysosomen in verschiedenen Zelltypen, die durch Nicotinsäureadenin-

dinukleotidphosphat (NAADP) aktiviert werden. Auf Grund der zwei porenbildenden Sequenzen innerhalb der Proteinsequenz wurden diese Kanäle *two-pore channels* (TPC) genannt. Es gibt drei verschiedene Subtypen (TPC1, TPC2, TPC3), von denen TPC2 auf Lysosomen und TPC1 und TPC3 auf Endosomen vorkommen. TPC3 wird in Primaten nicht exprimiert. TPC1 kann auf Endosomen lediglich lokale Ca^{2+} -Signale auslösen, die am ehesten den Proteintransport der Endosomen beeinflussen. Im Gegensatz dazu kann TPC2 nach Überexpression in Humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-Zellen) globale Ca^{2+} -Signale erzeugen, bei denen nach Annahmen der Arbeitsgruppe durch CICR über IP_3 die Ca^{2+} -Speicher aus dem ER entleert werden (Zhu et al. 2010).

1.5 Stand der Forschung zu Toxin-induzierten $\text{Ca}^{2+}_{\text{zyt}}$ -Signalen

Der Einstrom von Ca^{2+} ins Zytsosol wird von verschiedenen Bakterien induziert und führt beispielsweise zu zytoskelettalen Umbauvorgängen der Zellen und zur Bindung oder Internalisierung der Bakterien (TranVan Nhieu et al. 2004). Bakterielle Toxine steuern nach Angaben von *TranVan Nhieu et al.* die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine über die Induktion von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signalen. Für das porenbildende Lysterolysin konnte in Mastzellen bereits gezeigt werden, dass es $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Signale durch den Einstrom von Ca^{2+} von extrazellulär und Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellären Speichern auslöst, welches zur Zytokinsynthese und Degranulation der Mastzellen führte (Gekara et al. 2007). Oszillierende $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege sind für Lysterolysin beschrieben (Repp et al. 2002), das genau wie Pneumolysin zur Gruppe der porenbildenden Zytolysine gehört.

Unsere Arbeitsgruppe führte bereits in Voruntersuchungen Experimente bezüglich der Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ nach der Inkubation mit dem Pneumokokkenstamm Wildtyp D39 (WT D39) *in vitro* in humanen pulmonalen Endothelzellen (HPMEC) (Abb. 1) und *in situ* in EC der isoliert perfundierten Rattenlunge durch. Es zeigte sich ein spezifisches durch PLY vermitteltes Ca^{2+} -Signal *in vitro* und *in situ*. Dieses Signal setzt sich, schlußfolgernd aus den Versuchen mit Thapsigargin und extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen, aus zwei Anteilen zusammen. Es besteht aus einem Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär sowie einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (Mecklenburg et al. 2012). Eine signifikante Beteiligung der Mitochondrien oder der Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran, konnte von der Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden.

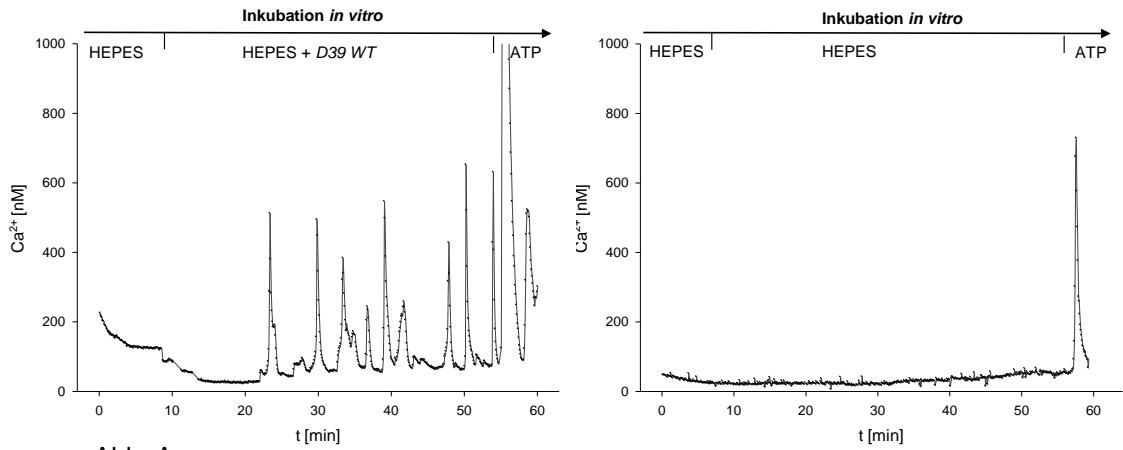


Abb. A

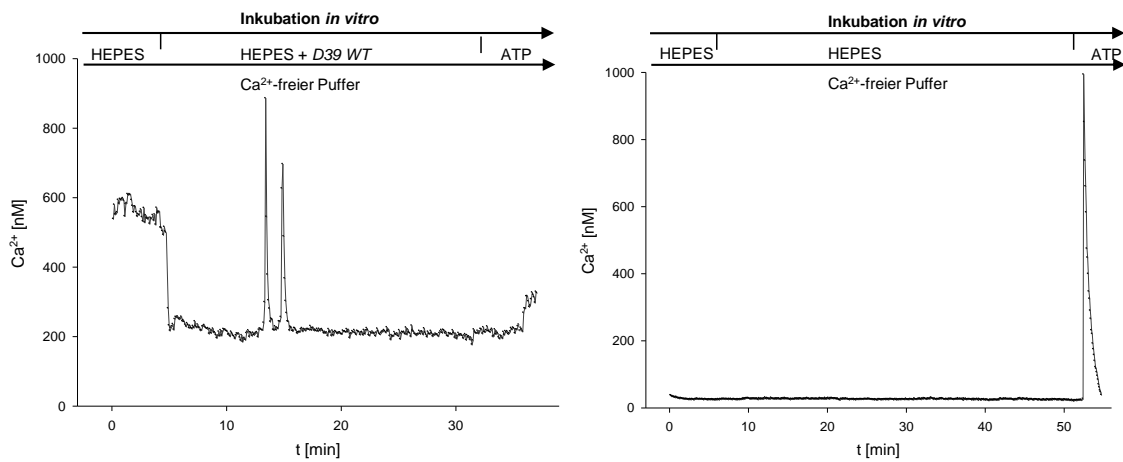


Abb. B

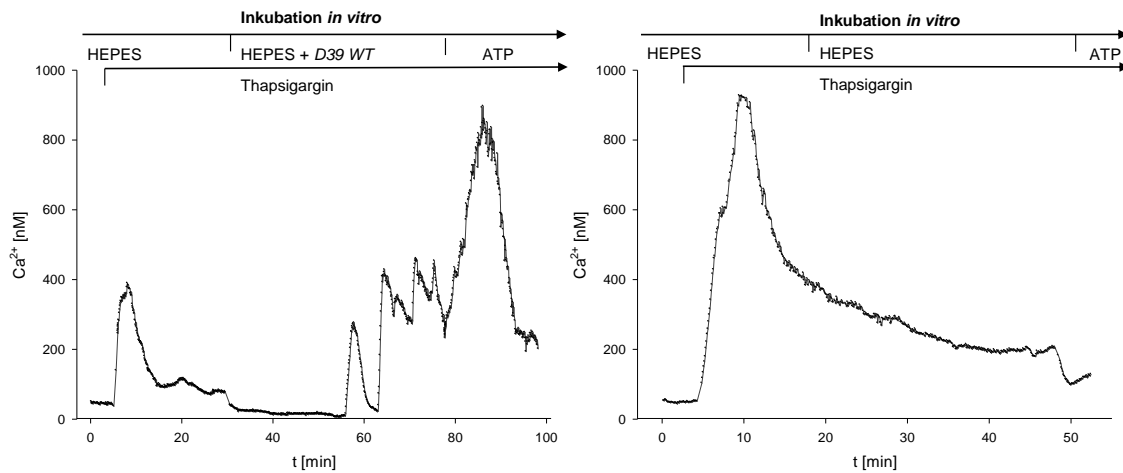


Abb. C

Abb.1 A) - C): Beispielhafte Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in EC nach Inkubation mit WT D39 (linke Seite) und unter Kontrollbedingungen (rechte Seite) unter Verwendung von A) Ca^{2+} -haltigem HEPES-Puffer, B) Ca^{2+} -freiem HEPES-Puffer, C) nach 30min Vorinkubation mit Thapsigargin.

1.6 Fragestellung

S. pneumoniae ist mit ca. 70% der häufigste Auslöser ambulant erworbener Pneumonien und die dadurch entstehenden Komplikationen wie ARDS und Sepsis, haben trotz adäquater antibiotischer Therapie eine hohe Letalität. Die Mortaliätsrate wird hierbei besonders in den ersten Erkrankungstagen beeinflusst, in denen die antibiotische Therapie noch keinen Vorteil gegenüber der Placebogruppe bewirkt. Um die Mortalitätsrate invasiver Pneumokokkenerkrankungen zu senken, müssen die pathophysiologischen Vorgänge innerhalb der ersten Erkrankungstage daher genauer verstanden und therapeutische Angriffspunkte gefunden werden. Viele Funktionen wie beispielsweise die Immunantwort und die Permeabilität werden in EC über Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ beeinflusst (Tran et al. 2000).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte daher bereits die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in humanen pulmonalen mikrovaskulären EC nach der Inkubation mit dem Pneumokokkenstamm WT D39.

Hier konnten wir zeigen, dass nach der Inkubation mit WT D39 ein $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstieg stattfindet, der aus einem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom und einer intrazellulären Freisetzung aus dem ER besteht. Die Entstehung sowohl der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung als auch des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms sind noch unklar. In der Literatur ist die porenbildende Eigenschaft des Zytotoxins PLY mehrfach beschrieben. Über die PLY-Poren kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom, welcher das von uns beschriebene extrazelluläre Ca^{2+} -Signal erklären und die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung beeinflussen könnte.

PLY führt in hohen Konzentrationen zur Zellyse, während es in geringeren Konzentrationen durch Permeabilitätssteigerung die endotheliale Barriere kompromittiert und die Entzündungsreaktion verstärkt. Die Bedeutung des von uns beschriebenen Ca^{2+} -Signales für die Zelle ist noch unklar; sowohl zytotoxische Eigenschaften bei höheren [PLY] als auch die Initiierung eines Signalwegs bei sublytischen [PLY] wären möglich.

$[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege in Reaktion auf inflammatorische Agonisten wurden über die Freisetzung aus dem ER durch IP_3 in Endothelzellen bereits von *Tirupathi et*

al. beschrieben (Tiruppathi et al. 2003). Führt PLY ebenfalls über einen IP_3 - abhängigen Signalweg zur Ca^{2+} -Freisetzung und wie wird IP_3 aktiviert? PLY bindet an cholesterolreiche Areale der Plasmamembran und könnte hier vorhandene Rezeptoren aktivieren und eine Downstream-Kaskade mit einer Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern auslösen.

In dieser Arbeit sollen daher die folgenden Fragen untersucht werden:

1. Welchen Einfluss hat die porenbildende Eigenschaft des PLY bei der Generierung des $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Signals?
2. Wird die PLY-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung über einen Signalweg aktiv ausgelöst?
3. Ist das $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Signal toxisch für die Zelle?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Acetoxymethyl Wasser zu Injektionszwecken	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, DE
ATP	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
ATP- γ -S	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, DE
Dextran 70.000	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethanol	Baker, Deventer, NLD
FBS	Biochrom AG, Berlin, DE
FCS	Biochrom AG, Berlin, DE
Fura-2	Promocell GmbH, Heidelberg, DE
Ethdiumhomodimer Calcein	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DE
Genistein	MBL International, Woburn, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Isotone Kochsalzlösung	Baxter Healthcare SA, Zürich, CHE
KCl	Merck, Darmstadt, DE
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Methanol	Baker, Deventer, NLD
NaCl	J.T.Backer, Deventer, NLD
Pluronic F-127	PromoKine, Heidelberg, DE
Triton X 100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Trypsin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
U73122, U73343	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

Xestospongin C Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

2.1.2 Geräte

Eppendorf Reference 20 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eppendorf Research 10 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eppendorf Research 100 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eppendorf Research 1000 Pipette	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Hettich Hämatokrit Typ 201	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus Instruments, Osterode, DE

2.2 Materialien für *in vitro* Versuche

2.2.1 Reagenzien/Medikamente

Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Endothelial Cell Growth Medium	Promocell Gmbh, Heidelberg, DE
Endothelial Cell Growth Medium MV SupplementMix	Promocell Gmbh, Heidelberg, DE
Dulbecco`s Modified Eagle Medium	Biochrome AG, Berlin, DE
Basal Medium Eagle	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DE
Dulbecco`s Modified Eagle Medium/ HAM`s	PAA Cell Culture Company, Cambridge, UK
Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
100X MEM Non essential amino acid	Gibco Life Technologies, Darmstadt, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung	Biochrom AG, Berlin, DE
Accutase	PAA Laboratories Gmbh, Pasching, AUT
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, DE
10000IE/ml/10000µg/ml	

2.2.2 Lösungen

HEPES	20mM HEPES; 1mM CaCl ₂ ; 1mM MgCl ₂ ; 5mM KCl; 150mM NaCl; 10mM Glucose; ad 1L ddH ₂ O; pH 7,4; 295 mOsm
HEPES Ca ²⁺ -frei	500µM EGTA in 50ml HEPES
Endothelzellen Nährmedium (MV)	5ml Penicillin/Streptomycin + Endothelial Cell Growth Medium MV + Supplement Mix

2.2.3 Materialien für die Zellkultur

Objektträger BD Falcon	BD Biosciences Europe, Erembodegen, BEL
Zellkultur Objektträger	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Multiwell 6-Well	Corning Incorporated, Corning, USA
Kulturplatte 96-Well	Sarstedt inc., Newton, USA
Kulturflaschen 25cm ² (T25)	Sarstedt inc., Newton, USA
Kulturflaschen 75cm ² (T75)	BD Biosciences, Bedford, USA
Neubauer Zählkammer	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE

2.2.4 Materialien für die Transfektion

Transfektionsmedium Opti-MEM	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DE
Reduced Serum Medium	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DE
Lipofectamin RNAiMAX	Quiagen GmbH, Hilden, DE
Flexi Tube siRNA (Gα11 (6) GαQ (6), Scrambled)	Quiagen GmbH, Hilden, DE

2.2.5 Materialien für die RNA-Isolation, cDNA-Synthese und DNA-Amplifikation

RNeasy Plus mini Kit (RPE-Puffer, RW1-Puffer, RLT-Puffer)	Quiagen GmbH, Hilden, DE
QIAshredder Zentrifugationsröhrchen	Quiagen GmbH, Hilden, DE
gDNA Zentrifugationsröhrchen	Quiagen GmbH, Hilden, DE
RNeasy Zentrifugationsröhrchen	Quiagen GmbH, Hilden, DE
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Omniscript RT Kit (10x Reaktionspuffer, RNase Inhibitor, Random Primer, Omniscript Reverse Transkriptase, dNTPs)	Quiagen GmbH, Hilden, DE
HotStarTaq DNA Polymerase (RNase-freies H ₂ O, 10x Reaktionspuffer, Q-Solution, Taq-Polymerase)	Quiagen GmbH, Hilden, DE
Primer (GNA11, GNAQ, 18-S)	Eurofins Genomics GmbH Ebersberg, DE
Agarose, Electrophoresis Grade Roti-Safe	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE Carl Roth GmbH + CO KG, Karlsruhe, DE
TAE-Puffer	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Gel Pilot 100bp Ladder	Quiagen GmbH, Hilden, DE
6x LoadingBuffer	Novagen, San Diego, USA

2.2.6 Materialien für Proteinextraktion, Konzentrationsbestimmung und Western Blot

Complete Tablets Mini, EDTA-frei, Protease-Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Radioimmunoprecipitation Analysenpuffer	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit (BCA	Thermo Scientific, Rockford, USA

Reagenz A, BCA Reagenz B)	
Nupage LDS Probenpuffer (NP0001)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Reduktionsmittel (10x), NuPage	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Sammel- und Trenngel 4-12% Bis-Tris Gel, NuPage	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
SDS Laufpuffer (20X), NuPage	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Magic Marks XP Western Protein Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Nitrocellulosemembran Filterpapier	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Schwamm zum Blotten	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Transferpuffer (20x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Tris gepufferte Salzlösung (TBS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH + CO KG, Karlsruhe, DE
Primärantikörper (Gá11 D-17 rabbit polyclonal, GáQ E-17 rabbit polyclonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE
Primärantikörper (Beta-Actin A2066)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Sekundärantikörper (ECL Anti-rabbit NA934V)	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Pierce ECL Plus Western Blot Substrat (Reagenz A, Reagenz B)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Ablösepuffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

2.2.7 Geräte

CCD-Kamera	CoolSnap HQ, RoperScientific, USA
Lampe Olympus U-RFL-T	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop Olympus BX40	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, DE
Shutter Lambda 10-2	HEKA Elektronik, Lambrecht, DE
Thermo Cycler PX2	Thermo Electron Corporation, Milford, Conneticut, USA
Blot- und Gel-Kammer, Novex Mini-Cell	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Spectrophotometer "NanoDrop" ND-100	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
CO ₂ Inkubator	Sanyo Electric Co., Moriguchi City, JPN
Gelelektrophoresekammer	Scientific Co., Del Mar, California, USA
Bio Imaging System	Syngene, Cambridge, UK
Photometer Multiscan Spectrum	Thermo Electron Corporation, Vantaa, FIN
Wärmeblock	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Shake Temp SW 22	Julabo, Seelbach, DE
Western Blot Entwickler Curix 60	Agfa Healthcare, DE

2.2.8 Material und Medikamente für die Pneumokokkenkultivierung

BD Sensi-Disc™ Erythromycin	BD, Franklin Lakes, USA
BD Sensi-Disc™ Chloramphenicol	BD, Franklin Lakes, USA
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Blutagar col sb+ 909410 lot/ch 6 exp.	Oxoid, Wesel, DE
Petrischalen	Sarstedt inc., Newton, USA

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung verschiedener Zelltypen

Humane pulmonale mikrovaskuläre endotheliale Zellen (HPMEC)

Das Nährmedium der HPMEC bestand aus einem spezifischen Endothelzellmedium, einem Supplement und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Die Kultivierung fand auf Kulturflaschen (25cm²) bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration statt. Nachdem die Zellen nach 48 - 72h eine Konfluenz von 90% erreicht hatten, wurden sie mit Accutase abgelöst und erneut auf Kulturflaschen oder auf Objektträgern für die Ca²⁺-Imaging Versuche in entsprechender Dichte ausgesät. Die Objektträger wurden vor Versuchsbeginn für weitere 48-72h bei 37°C und 5% CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert.

Humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen)

Das Nährmedium der HEK-Zellen bestand aus dem Medium *Dulbecco's modified eagle serum* (DMEM), 10% Fetalem Kälberserum (FBS) und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Die Kultivierung der Zellen fand entsprechend der Kultivierung der HPMEC statt. Die HEK-Zellen wurden bei Konfluenz mit Trypsin abgelöst und transferiert.

2.3.2 Ca²⁺-Imaging Versuche *in vitro*

Laden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM

Zur Messung der [Ca²⁺]_{zyt} wurde der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) verwendet. Fura-2-AM ist auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften zellmembrangängig. Unspezifische Esterasen hydrolysieren den Acetoxymethylester intrazellulär, sodass Fura-2 nicht mehr membranpermeabel ist. Fura-2 komplexiert Ca²⁺-Ionen. Durch die Bindung von Fura-2 an Ca²⁺-Ionen verändert sich das Absorptionsmaximum von 380nm zu 340nm.

Ermittlung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_{zyt}$

Zur Quantifizierung der intrazellulären $[Ca^{2+}]_{zyt}$ wurde ein Mikroskop (Olympus BX40) und eine Lampe (Olympus U-RFL-T) sowie die Software Metafluor verwendet und die Calciumwerte über die Ratiowerte mit der Formel nach Grynkiewicz bestimmt (Grynkiewicz et al. 1985).

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

Abb. 2: Formel nach Grynkiewicz.

Tab. 1: Variablen der Kalibration nach Grynkiewicz

K_d	Dissoziationskonstante von Fura bei 37°C: 224nmol/l		
λ_1	340nm	λ_2	380nm
F_{λ_1}	Fluoreszenzintensität bei 340nm Exzitation	F_{λ_2}	Fluoreszenzintensität bei 380nm Exzitation
R	Ratio aus der Fluoreszenzintensität, die sich aus $F_{\lambda_1}/F_{\lambda_2}$ ergibt		
S_{f2}	Intensität bei λ_2 380nm in Ca^{2+} -freier Umgebung	S_{b2}	Intensität bei λ_2 380nm in Ca^{2+} -haltiger Umgebung
Visc	Viskositätskoeffizienten, der je nach Versuchsprotokoll zwischen 0,7 und 0,85 liegt		

Versuchsaufbau

Die folgende Abb. 3 zeigt den Versuchsaufbau unter dem Epifluoreszenzmikroskop. Die auf dem Objektträger mit Fura-2 gefärbten Zellen wurden bei wechselnder Exzitation von 340nm und 380nm sowie bei einer Emission von 510nm gemessen.

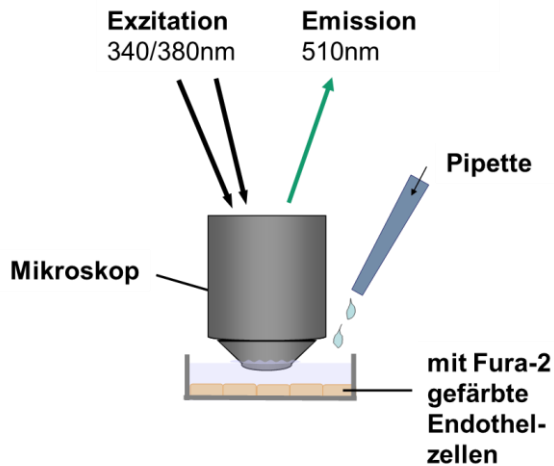


Abb. 3: Versuchsaufbau.

Kalibration

Bei der Kalibration blieben Belichtungszeit, Filtereinstellung und Baseline-Ratio unverändert. Es wurde die Emission nach der Exzitation bei λ 340nm und λ 380nm unter Ca^{2+} -haltigen und Ca^{2+} -freien Bedingungen gemessen und so Werte für R_{\max} , R_{\min} , S_{f2} und S_{b2} ermittelt.

Software

Zur Ermittlung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ wurde das Programm MetaFluor® (© 2004 – 2006 Molecular Devices Corporation) verwendet. MetaFluor® berechnete aus den gemessenen Intensitäten der unterschiedlichen Exzitationswellenlängen die Ratio und über die Grynkiewicz-Formel die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ der Zellen. Während des Versuches konnten sowohl die Intensitäten, die Ratiowerte, als auch die errechnete $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ graphisch dargestellt werden.

Versuchsprotokoll der Ca²⁺-Imaging Versuche in vitro

Nachdem die Zellen eine Konfluenz von 90% auf den Objektträgern erreicht hatten, wurden sie für 30min bei 37°C und 5% CO₂ mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM gefärbt. Nach dieser Inkubationszeit wurde der überschüssige Fluoreszenzfarbstoff mit 2-4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazinyl-ethansulfonsäure (HEPES) durch dreimaliges Spülen entfernt.

Zu Versuchsbeginn wurde über 5-10min mit HEPES die Baseline der [Ca²⁺]_{zyt} gemessen. Danach folgte die Behandlung mit einem spezifischen Inhibitor an der zu untersuchenden Signalkaskade über einen für je nach verwendeter Substanz festgelegten Zeitraum. Anschließend wurde für 45min entweder mit HEPES, mit WT D39 oder Pneumolysin inkubiert und die Veränderung der [Ca²⁺]_{zyt} gemessen. Als ein [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg oder Ca²⁺-Spike wurde der Anstieg der [Ca²⁺]_{zyt} um 50% im Vergleich zur unmittelbar vorher gemessenen [Ca²⁺]_{zyt} definiert.

Nach der Inkubationszeit über 45min erfolgten die Inhibitionskontrolle mit einem Agonisten der entsprechenden Signalkaskade sowie eine optische Kontrolle über die Vitalität der Zellen. Die folgenden Tabellen (Tab. 2) geben die in den Versuchsgruppen angewendeten Inhibitoren oder Agonisten sowie die durchgeführte Intervention wieder.

Tab. 2: Versuchsgruppen mit den durchgeführten Interventionen

Versuchsgruppen der HPMEC

Gruppe	Zelltyp	Agonist/ Inhibitor	Intervention	Positivkontrolle	Anzahl der Versuche (n)	Ø Zellzahl ± SD / Versuch
EC K	HPMEC		HEPES	ATP	6	13,17 ± 3,41
EC WT	HPMEC		WT D39	ATP	7	11,71 ± 4,5
EC ΔPLY	HPMEC		ΔPLY	ATP	6	12,33 ± 2,58
EC PLY	HPMEC		PLY WT	ATP	6	10,83 ± 2,79
EC PLY W433F	HPMEC		PLY W433F	ATP	9	14,44 ± 4,75

Material und Methoden

EC \emptyset Ca ²⁺ PLY W433F	HPMEC		Ca ²⁺ -frei PLY W433F	ATP	7	10,43 ± 6,83
EC PLY C428G	HPMEC		PLY C428G	ATP	7	14,29 ± 3,73
EC U73122 K 60min	HPMEC	U73122	HEPES	ATP	6	9,67 ± 2,73
EC U73122 WT	HPMEC	U73122	WT D39	ATP	6	9,17 ± 1,83
EC U73343 K 60min	HPMEC	U73343	HEPES	ATP	6	8,67 ± 2,34
EC U73343 WT	HPMEC	U73343	WT D39	ATP	6	8,00 ± 1,26
EC Xesto K	HPMEC	Xestospong in C	HEPES	ATP	2	15,00 ± 0,00
EC Xesto WT	HPMEC	Xestospong in C	WT D39	ATP	4	15,00 ± 2,16
EC Genistein K	HPMEC	Genistein	HEPES	-	5	14,60 ± 2,79
EC Genistein WT	HPMEC	Genistein	WT D39	-	6	13,83 ± 1,72

Versuchsgruppen der nativen HEK-Zellen

Gruppe	Zelltyp	Agonist/ Inhibitor	Intervention	Positivkontrolle	Anzahl der Versuche (n)	\emptyset Zellzahl ± SD / Versuch
HEK K	HEK		HEPES	ATP	5	21,40 ± 3,97
HEK WT	HEK		WT D39	ATP	6	25,00 ± 3,63
HEK K \emptyset Ca ²⁺	HEK		Ca ²⁺ -frei HEPES	ATP	4	20,25 ± 3,95
HEK \emptyset Ca ²⁺ WT	HEK		Ca ²⁺ -frei WT D39	ATP	5	25,00 ± 2,83
HEK Thapsi K	HEK	Thapsigargin	HEPES	ATP	5	17,80 ± 6,83
HEK Thapsi WT	HEK	Thapsigargin	WT D39	ATP	7	22,71 ± 6,78
HEK PLY WT	HEK		PLY WT	ATP	5	26,40 ± 2,41

Versuchsgruppen der transfizierten HEK-Zellen

Gruppe	Zelltyp	Agonist/ Inhibitor	Intervention	Positivkontrolle	Anzahl der Versuche (n)	Ø Zellzahl ± SD / Versuch
HEK Nativ K	HEK		HEPES	ATP	3	25,00 ± 3,61
HEK Nativ WT	HEK		WT D39	ATP	5	29,00 ± 1,87
HEK scr K	HEK		HEPES	ATP	5	9,80 ± 1,79
HEK scr WT	HEK		WT D39	ATP	5	11,20 ± 4,82
HEK scr ØCa ²⁺ K	HEK		Ca ²⁺ -frei HEPES	ATP	5	8,60 ± 2,07
HEK scr ØCa ²⁺ WT	HEK		Ca ²⁺ -frei WT D39	ATP	5	10,60 ± 1,82
HEK GαQ/11 K	HEK		HEPES	ATP	2	10,50 ± 2,12
HEK GαQ/11 WT	HEK		WT D39	ATP	5	10,80 ± 5,76
HEK GαQ/11 ØCa ²⁺ K	HEK		Ca ²⁺ -frei HEPES	ATP	4	8,25 ± 2,50
HEK GαQ/11 ØCa ²⁺ WT	HEK		Ca ²⁺ -frei WT D39	ATP	4	8,75 ± 2,06

In Abb. 4 sind beispielhaft die verschiedenen zu einer Versuchsgruppe eines Inhibitors gehörenden Versuche aufgeführt. In der Versuchskontrolle wurde die spezifische Inhibition einer Signalkaskade durch den jeweiligen Inhibitor mit einem Agonisten zum Ende der Versuchszeit überprüft. Zusätzlich wurde hierbei die Wirkung des Inhibitors auf die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ kontrolliert. Nachdem die inhibitorische Wirkung nachgewiesen wurde und sich keine Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ durch den Inhibitor selbst zeigten, wurden die Versuche mit der jeweiligen Intervention der Versuchsgruppen durchgeführt.

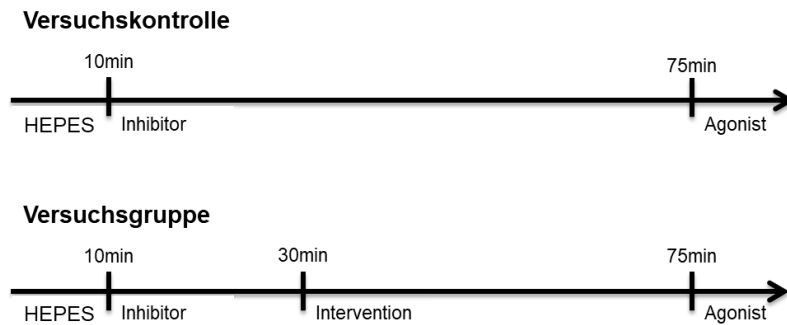


Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der Versuchsgruppen mit dem Inhibitor einer Signalkaskade.

2.3.3 Zellvitalität

Um die Vitalität der Zellen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften verwendet.

Calcein AM

Der Fluoreszenzfarbstoff Calcein ist ein Indikator für vitale Zellen. Der nicht fluoreszierende Ester von Calcein, Calcein-Acetoxymethylester, kann die Zellmembran passieren. Intrazellulär spalten unspezifische Esterasen das Acetoxymethylester ab. Calcein ist nicht zellmembrangängig und komplexiert intrazellulär Ca^{2+} -Ionen, welches nach der Anregung mit Licht bei maximaler Exzitation von 495nm und maximaler Emission von 515nm zu einer grünen Fluoreszenz führt. Da diese Esteraseaktivität nur in vitalen Zellen vorhanden ist, kann die Fluoreszenz von Calcein als Vitalitätsparameter genutzt werden.

Ethidiumhomodimer III (EthD-III)

Der Farbstoff EthD-III ist ein Indikator für nicht-vitale Zellen. EthD-III kann intakte Zellmembranen nicht passieren und bindet daher nur an die DNA der Zellen, deren Integrität der Plasmamembran gestört ist. Da die Zellmembran vitaler Zellen intakt ist, machen die genannten Eigenschaften EthD-III zu einem Indikator nicht-vitaler Zellen. Durch die Bindung an die DNA wird die Fluoreszenzintensität von EthD-III 40-fach erhöht. Die maximale Exzitation von

EthD-III erfolgt bei 530nm und die maximale Emission befindet sich bei 635nm. EthD-III fluoresziert im roten Spektrum.

Mikroskopie

Bei der Fluoreszenzmessung von Calcein und EthD-III *in vitro* wurden ein Mikroskop (Olympus BX40) und eine Lampe (Olympus U-RFL-T) genutzt, die speziell für die *in vitro* Mikroskopie geeignet sind. Es wurden spezifische Exzitations- und Emissionsfilter verwendet. Die Belichtungszeit betrug 250ms pro Emissionswellenlänge. Zur Auswertung und Ansteuerung konnte ebenfalls die Software MetaFluor® verwendet werden.

Auswertung

Das Ziel der Auswertung war das Verhältnis von vitalen zu nicht-vitalen Zellen zu ermitteln. Dazu wurden die Zellen über 30 min gleichzeitig mit beiden Farbstoffen gefärbt und anschließend in fünf standardisierten Arealen des Objektträgers je ein Bild mit dem Filter für die Fluoreszenz von Calcein und ein Bild für die Fluoreszenz von EthD-III aufgenommen. In der Auswertung wurde die Anzahl vitaler bzw. nicht-vitaler Zellen aller fünf Areale ausgezählt.

Die Anzahl nicht-vitaler Zellen wurde in Prozent an der Gesamtzahl angegeben (Abb. 5).

$$\frac{\text{nicht-vitale Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}} = \text{Sterblichkeit in \%}$$

Abb. 5: Berechnung der Sterblichkeit der Zellen eines Versuches in Prozent.

Versuchsgruppen

Die Versuchsgruppen HEPES, WT D39 und PLY-defiziente Pneumokokken (D39 Δ PLY) wurden nach 1h, 2h, 4h und 8h fluoreszenzmikroskopisch aufgenommen.

Laktatdehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay

Um die zytotoxischen Effekte der verwendeten Substanzen und der Versuchsbedingungen zu überprüfen, wurde zudem der LDH-Zytotoxizitätsassay von Abcam durchgeführt. Zellen, die in den Zelltod eintreten, besitzen eine geschädigte Plasmamembran. Die LDH ist ein Enzym, das in allen Zelltypen stabil exprimiert wird. Bereits bei einer geringen Schädigung der Plasmamembran wird sie von den Zellen freigesetzt. Der Assay basiert auf der enzymatischen Reaktion der LDH Laktat zu oxidieren und dabei Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) zu NADH zu reduzieren. NADH reagiert im Anschluss mit einer Substanz des Kits (WST), welches eine gelbe Farbreaktion hervorruft. Anhand einer Standardreihe konnte die LDH-Konzentration mit einem optischen Spektrometer bestimmt werden. Als Positivkontrolle wurden eine die Zellyse induzierende Substanz des Kits und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen in Medium verwendet. Von allen Messwerten wurde der Hintergrund abgezogen, der in reinem Zellmedium ohne ausgesäte Zellen gemessen wurde.

Die prozentuale LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Positivkontrolle wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{(\text{Testsubstanz} - \text{Negativkontrolle})}{(\text{Positivkontrolle} - \text{Negativkontrolle})} \times 100 = \text{LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Positivkontrolle in \%}$$

Abb. 6: Berechnung der LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Positivkontrolle eines Areals in Prozent.

2.3.4 Inhibition Ca²⁺-freisetzender Signalwege

IP₃-Rezeptor

Xestospongine C, isoliert vom Schwamm *Xestospongia*, inhibiert die über IP₃ getriggerte Ca²⁺-Freisetzung aus dem ER ohne mit der Bindungsstelle für IP₃ am IP₃-R zu interagieren (Gafni et al. 1997). Mögliche Inhibitionsmechanismen sind die Blockierung des Ca²⁺-Kanals des IP₃-R oder allosterische Veränderungen, die die IP₃-Bindung von der Generierung des Ca²⁺-Signales entkoppeln (Gafni et al. 1997). In kultivierten bovinen aortalen EC inhibierten 3-10 µM Xestospongine C sowohl die ATP-induzierte Ca²⁺-Freisetzung als auch den kapazitiven Ca²⁺-Einstrom nach Entleerung des ER über Thapsigargin (Bishara et al. 2002).

Die Inhibition des IP₃-Rezeptors fand durch 20min Vorinkubation mit 20 µM Xestospongine C statt. ATP wurde als Inhibitionskontrolle verwendet, da es zu einer Aktivierung des IP₃ Signalweges führt, welche bei erfolgreicher Inhibition ausbleibt.

Phospholipase C (PLC)

Um die IP₃-Freisetzung bereits auf einer höheren Ebene im Signalweg zu hemmen, kann als Inhibitor der PLC die Substanz U73122 verwendet werden. U73122 ist ein Aminosteroid und hemmt die PLC-abhängige Hydrolyse von PPI (Bleasdale et al. 1990). *Mogami et al.* berichteten jedoch über multiple weitere Effekte von U73122, wie eine direkte Aktivierung von Ionenkanälen, die Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern in permeabilisierten Zellen und eine verstärkte Antwort auf IP₃ (Mogami et al. 1997). Ersetzt man die Maleimidgruppe des U73122 mit einer Succinidgruppe, so entsteht das Strukturanalogon U73343, welches eine reduzierte bis gänzlich aufgehobene Inhibition der PLC-abhängigen Reaktionen zeigt (Bleasdale et al. 1990). Dies führte zur Verwendung von U73343 als Kontrollsubstanz, um unspezifische [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiege, ausgelöst durch unspezifische Reaktionen von U73122, aufzuzeigen.

Zur Inhibition der Phospholipase C wurde 2µM der Substanz U73122 und zur Kontrolle 2µM des Strukturanalogs U73343, welche keine inhibitorische Wirkung auf die Phospholipase C hat, verwendet. Mit beiden Substanzen fand eine Vorinkubation von 20min statt.

Tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität

Wie bereits beschrieben, kann IP₃ auch durch die Aktivierung von Tyrosinkinase gebildet werden. Genistein ist ein spezifischer Inhibitor der Tyrosinkinase, wobei der genaue Mechanismus unbekannt ist. *Akiyama et al.* konnten zeigen, dass in der kultivierten epidermalen Karzinomzelllinie A431 die Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)-abhängige Phosphorylierung durch Genistein inhibiert wurde (Akiyama et al. 1987). Die tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität wurde durch 30min Vorinkubation mit 100µM Genistein inhibiert.

Als weitere Möglichkeit zur Inhibition einer der Akteure einer Signalkaskade, kann der gezielte *small interfering RNA-* (siRNA-) *Knockdown* eingesetzt werden.

2.3.5 siRNA-Knockdown von G-Proteinen in HEK-Zellen

A) Transfektion der HEK-Zellen

Die HEK-Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und nach dem Prinzip der Vorwärts-Transfektion wurden folgende Versuchs- und Kontrollgruppen mit bzw. ohne siRNA transfiziert:

Tab. 3a: Versuchs- und Kontrollgruppen der Transfektion

Versuchsgruppen	Kontrollgruppen
GαQ 100pmol	Nativ (nur Transfektionsmedium)
Gα11 100pmol	scrambled (scr) 100pmol
Gα11 50pmol + GαQ 50pmol	H ₂ O 5µl

Zur Einzeltransfektion wurden 5µl siRNA und zur Doppeltransfektion je 2,5µl siRNA des GαQ und 2,5µl des Gα11 mit 500µl Opti-MEM Transfektionsmedium verdünnt (für die siRNA-Sequenzen s. Tab. 3b). Getrennt davon wurden 15µl des Transfektionsvektors Lipofectamin RNAiMAX mit 500µl Opti-MEM Transfektionsmedium gemischt. Die in Transfektionsmedium verdünnte siRNA wurde zum in Transfektionsmedium gelösten Lipofectamin zugegeben. Dieses wurde nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) zum Nährmedium der zuvor ausgesäten HEK -Zellen gegeben.

Tab. 3b: Zielsequenzen und siRNA-Sequenzen des GαQ und Gα11

	Ziel-Sequenz	siRNA-Sequenz
GαQ_6	5'- CAG GAA TGC TAT GAT AGA CGA - 3'	F: 5'- GGA AUG CUA UGA UAG ACG ATT - 3' R: 5'- UCG UCU AUC AUA GCA UUC CTG - 3'
Gα11_6	5'- AGC GAC AAG ATC ATC TAC TCA - 3'	F: 5'- CGA CAA GAU CAU CUA CUC ATT - 3' R: 5'- UGA GUA GAU GAU CUU GUC GCT - 3'

B) RNA-Isolation und Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Nach 48h wurden die HEK-Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und die RNA der HEK-Zellen mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* von Quiagen isoliert. Zur RNA-Isolation wurde mit Ribonuklease-freien Reagenzien gearbeitet, sodass die zu isolierenden Nukleinsäuren nicht degradierten. Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei RT und jede Zentrifugation bei 10000rpm durchgeführt.

Um die HEK-Zellen von den Objektträgern zu lösen und zu lysieren wurden sie mit 70µl RLT-Puffer sowie 10µl 2-Mercaptoethanol/ml behandelt und mit einem Zellschaber mechanisch abgelöst. Zur Homogenisierung wurde die Zellsuspension in einem *QIAshredder* Zentrifugationsröhrchen für 30sec zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein gDNA Eliminations-Zentrifugationsröhrchen gegeben und für 30sec zentrifugiert, um die DNA zu entfernen. Um die RNA zu extrahieren wurde die Probe zunächst auf einer Säule fixiert, indem sie nach Zugabe von 70µl 70% Ethanol auf die *RNeasy* Zentrifugationsröhrchen

pipettiert und zentrifugiert wurde. Zum Waschen der Membran wurden 150µl RW-1-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Dies wurde mit 500µl RPE-Puffer zweimal wiederholt. Die mehrmalige Zentrifugation führte zum Trocknen des Ethanols. Die RNA wurde durch Zugabe von 30µl RNase-freien Wassers eluiert und die Konzentration im *NanoDrop* bei einer Wellenlänge von 260nm über die optische Dichte berechnet. Die Proben wurden bis zu weiterer Verwendung bei -80°C eingefroren.

Reverse Transkription

Die RNA wurde mit dem *Omniscript RT Kit* von Quiagen in cDNA umgeschrieben. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zur cDNA-Synthese wurde das Versuchsvolumen für den Einsatz von 2ng RNA berechnet und zu diesem Volumen RNase-freies H₂O zu einem Gesamtvolumen von 22µl zugegeben. Pro Versuchsansatz wurde der Mastermix bestehend aus 3µl 10x Reaktionspuffer, 2µl 5mM dNTPs, 1µl Random Primer, 1µl RNase Inhibitor und 1µl Omniscript Reverse Transkriptase angesetzt. Nach der Zugabe des Mastermixes erfolgte eine Inkubation von 60min bei 37°C. Die cDNA wurde bei 4°C zwischengelagert.

PCR

Zur DNA-Amplifikation wurde das Kit *HotStarTaq DNA Polymerase* von Quiagen verwendet. Es wurden 3µl cDNA jedes Versuchsansatzes zu 43µl Mastermix pipettiert. Der Mastermix bestand aus 25,75µl RNase-freiem H₂O, 5µl 10x Reaktionspuffer, 10µl Q-Solution, je 1µl des entsprechenden Primers und 0,25µl Taq-Polymerase je Versuchsansatz.

Neben den spezifischen Primern für die G-Proteine GαQ und Gα11 wurde zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge die Expression des Haushaltgens 18-S untersucht (Primersequenzen s. Tab. 4). Des Weiteren wurde eine Leerprobe mit H₂O anstelle der cDNA als Negativkontrolle zum Ausschluss von Primerdimerisierung angesetzt.

Tab. 4: Verwendete Primer zur PCR

Primer	GαQ	Gα11	18-S
Sequenz	F: 5'-GGG GGC CCA AGG TCA GAG AGA-3' R: 5'-GTG GCG CAC GTG AAG TGG GA-3'	F: 5'-AGA GCA AAG CCC TGT TCC-3' R: 5'-ATG ATC TTG TCG CTG TCG-3'	F: 5'-GTG GAG CGA TTT GTC TGG TT-3' R: 5'-CGC TGA GCC AGT CAG TGT AG-3

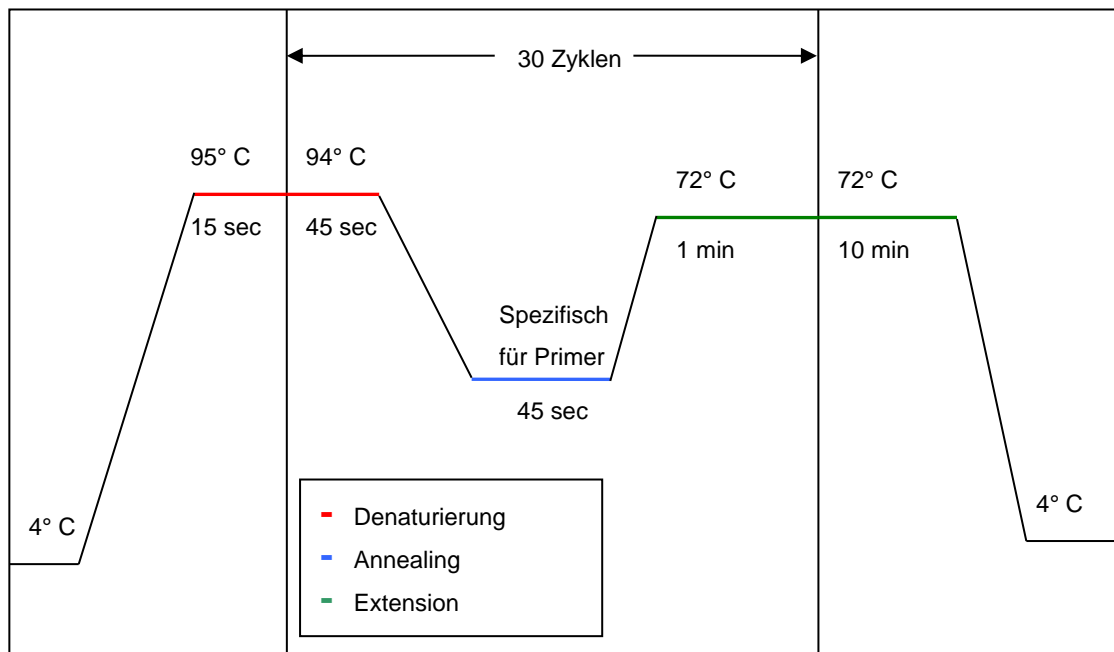


Abb. 7.: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion.

Herstellung des 1%igen Agarose-TAE-Gel

Zur Herstellung des Agarose-TAE-Gels wurden 666mg Agarose abgewogen und mit 70ml TAE-Laufpuffer in ein Becherglas gegeben. Dies wurde in einer Mikrowelle aufgekocht bis eine klare Suspension entstand. Nachdem die Suspension abgekühlt war, wurden 166µl TAE-Pufferkonzentrat sowie 6µl Ethidiumhomodimer dazugegeben. Die Suspension wurde nach kurzem Schwenken in eine Gelkammer gegossen und zwei Kämme für die Geltaschen eingesetzt. Nach weiteren 15min Zeit zum Aushärten wurde das Gel beladen.

Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden in dem Agarose-TAE-Gel überprüft. Um die Bandengröße der DNA-Produkte zu identifizieren, wurden 6µl 100bp DNA-Standard als Marker eingesetzt. Es wurden je 6µl Probe mit 3µl Gel-Beladungspuffer vermengt und zur elektrophoretischen Auftrennung auf dem Gel aufgetragen. Nach 45min Gelelektrophorese bei 75mA und 120V wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die Intensität und Lage der Banden in dem Programm Image J ausgewertet.

Proteinextraktion und Western Blot

Zur Extraktion der Proteine wurde eine halbe Tablette Proteaseinhibitoren in 3,5ml Radioimmunoprecipitation Analysenpuffer (RIPA) gelöst. Die für 48h transfizierten HEK-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann je 6-Well-Platte 100µl des vorbereiteten RIPA-Puffer zugegeben. Die HEK-Zellen wurden für 30min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgelöst und im RIPA-Puffer in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 20min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce Biochinoninsäure Protein Assay (BCA) von Thermo Scientific durchgeführt. Zunächst wurde das Arbeitsreagenz im Verhältnis 50:1 aus dem BCA Reagenz A und BCA Reagenz B hergestellt. Es wurden je 25µl Dupletts einer Standardreihe und der extrahierten Proteinproben in eine 96 Mikrowellplatte aufgetragen. Dazu wurden je 200µl des Arbeitsreagenzes gegeben und die Mikrowellplatte bei 37°C für 30min inkubiert. Nachdem die Platte für 5min abgekühlt war, wurde die Absorption bei 562nm im Photometer bestimmt. Es wurde der Mittelwert der Dupletts gebildet, der Leerwert abgezogen und die Standardkurve erstellt und darüber die Proteinkonzentration der Proben ermittelt.

$$\frac{x_1 + x_2}{2} - \text{Leerwert} = \text{Absorption einer vorgegebenen [Protein]}$$

Legende:

x_1 = vorgegebene [Protein], 1. Well

x_2 = vorgegebene [Protein], 2. Well

Abb. 8.: Erstellung der Standardkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration.

Gel-Vorbereitung des Western Blot

Die Proben wurden aufgetaut, anzentrifugiert und auf Eis gestellt. In ein Reaktionsgefäß wurden 5µl Nupage LDS Probenpuffer, 0,5µl Reduktionsmittel und 20µg Protein gegeben und mit Aqua dest. auf 25,5µl aufgefüllt. Das Reaktionsgefäß wurde 5min bei 95°C auf dem Wärmeblock inkubiert und anschließend 1min bei 4°C und 13000g zentrifugiert.

Gel-Elektrophorese

Das 4-12% Bis-Tris-Trenn- und Sammelgel von NuPage wurde in die Gelkammer transferiert. 25ml SDS Laufpuffer (20X) wurden mit 500 ml Aqua dest. aufgefüllt und in die Gelkammer gegeben. Der Kamm wurde aus dem Gel entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Molekulargewichtsmarker wurde mit 5µl Bandenmarker und 3 µl *Magic* Marker angesetzt. Der Molekulargewichtsmarker und die im Reaktionsgefäß vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde bei 200V für 50min laufen gelassen bis die Lauffront den unteren Rand des Gels verließ.

Blotten

Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel aus der Vorrichtung gelöst und das Sammelgel, die Lauffront und die Geltaschen abgetrennt. Es wurden in folgender Anordnung Schwamm – Filter – Gel – Membran – Filter – Schwamm luftblasenfrei übereinandergelegt. Dieser Aufbau wurde so in die *Blotting*-Kammer gestellt, dass die Membran entsprechend der Richtung des

Stromflusses vor dem Gel zu stehen kam. Es wurden 50ml Transferpuffer und 100ml Methanol auf 1L mit Aqua dest. aufgefüllt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und bei 30V für 75min geblottet. Es wurde der Waschpuffer aus 500ml TBS und 500µl Tween 20 (0,1%) angesetzt. Der Blockierungspuffer wurde aus dem Waschpuffer und 5% Milchpulver angesetzt. Anschließend wurde die geblottete Membran in eine Petrischale transferiert und für 60min im Blockierungspuffer auf dem Rüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Der Anti-Gα11- und der Anti-GαQ-Antikörper wurden im Verhältnis 1:10000 mit Blockierungspuffer angesetzt. Der Blockierungspuffer wurde abgenommen und 10ml der Antikörperlösung auf die Membran in die Petrischale gegeben. Es wurde über Nacht bei 4°C auf dem Rüttler inkubiert.

Binden und detektieren des sekundären Antikörpers

Die Membran wurde viermal je 10min im Waschpuffer auf dem Rüttler gewaschen. Der in Milchpulver im Verhältnis 1:10000 angesetzte Sekundärantikörper Anti-rabbit wurde auf die Membran gegeben und die Membran für 60min auf dem Rüttler inkubiert. Die Membran wurde erneut viermal mit Waschpuffer für jeweils 10min auf dem Rüttler gewaschen.

Das Detektions-Reagenz ELC wurde aus 75µl ELC Reagenz A und 2,925ml Reagenz B angesetzt. Die Membran wurde auf eine Klarsichtfolie gelegt und für 5min mit dem Detektions-Reagenz bedeckt. Das Detektions-Reagenz wurde abgetropft und die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien in einer lichtdichten Schatulle zur Entwicklung transportiert. Die Membran wurde im Western Blot Entwickler Curix entwickelt und war in Blockierungspuffer bei 4°C für 10 Tage haltbar.

Antikörper-Ablösung und Detektion des Haushaltsgens

Zur Detektion des Haushaltsgens wurden die bereits an der Membran gebundenen Antikörper abgelöst. Dazu wurde die Membran 5min in Ablösepuffer bei 55°C auf dem Rüttler inkubiert. Der Ablösepuffer bestand für 100ml aus 6,25ml Tris, 20ml 10% Natriumdodecylsulfat, 0,7ml 2-Mercaptoethanol und 73,05ml H₂O. Anschließend wurde die Membran in Waschpuffer gewaschen und für 60min bei RT mit dem Blockierungspuffer

geblockt. Es wurde mit dem Primärantikörper des Haushaltsgens Anti-Beta-Actin in der Verdünnung 1:10000 in Blockierungspuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Der weitere Ablauf entsprach der beschriebenen Bindung und Detektion des Sekundärantikörpers.

Quantitative Auswertung des Agarosegels und des Western Blots

Die quantitative Auswertung der Expression der Banden der Agarosegele der PCR sowie der Banden der Western Blots erfolgte mit der Software Image J.

2.3.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SigmaStat 13. Für den Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt. Zum Vergleich von mehreren Gruppen wurde der Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks mit der nachfolgenden Dunn's Method (bei mehr als drei Vergleichsgruppen) oder der nachfolgenden Bonferroni-Methode (genau drei Vergleichsgruppen) angewendet. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert <0.05 festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit des Ca^{2+} -Signals von der hämolytischen Aktivität durch WT D39

Um die Auswirkung der hämolytischen Aktivität auf das Ca^{2+} -Signal zu untersuchen, wurden verschiedene PLY-Mutanten verwendet, die im Gegensatz zum PLY WT konzentrationsabhängig eine verringerte hämolytische Aktivität bzw. keine hämolytische Aktivität aufwiesen (Abb. 9).

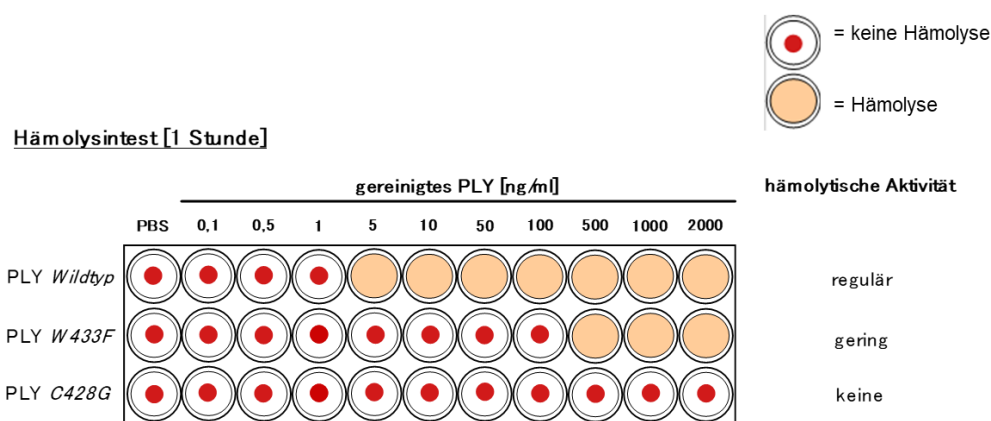


Abb. 9 zeigt die hämolytische Aktivität von PLY WT und Mutanten im Hämolysintest (aus Vorversuchen von Hammerschmidt et. al.).

Nach der Inkubation mit PLY WT in einer Konzentration im niedrigen hämolytischen Bereich von 5ng/ml (Abb. 10) zeigte sich das charakteristische Ca^{2+} -Signal aus breiten und schmalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiegen über den Inkubationszeitraum von 45min.

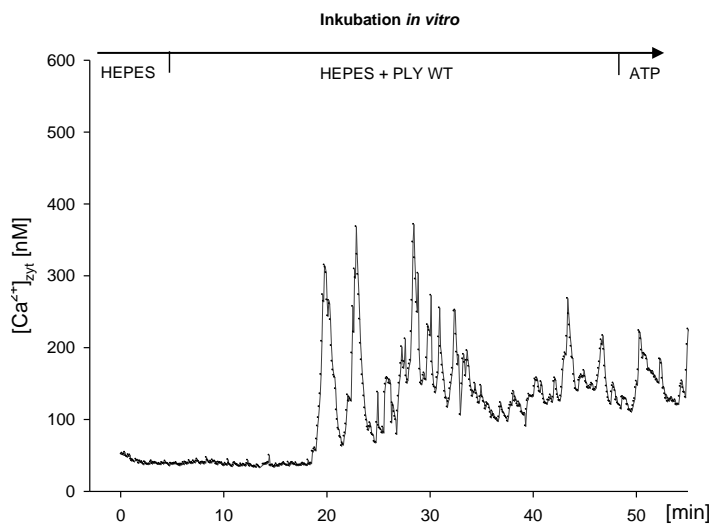


Abb. 10 zeigt die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen vor und nach PLY WT 5ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 6$.

Die Verwendung der Mutante PLY W433F in einer Konzentration von 10ng/ml zeigte ein Ausbleiben des charakteristischen Ca^{2+} -Signales bei gleichen Inkubationsbedingungen im Vergleich zum PLY WT (Abb. 11). Die hämolytische Aktivität von PLY W433F beginnt, wie im Hämolytest gezeigt, ab einer Konzentration von 500ng/ml (entsprechend 1% hämolytischer Aktivität des PLY WT) (Abb. 9).

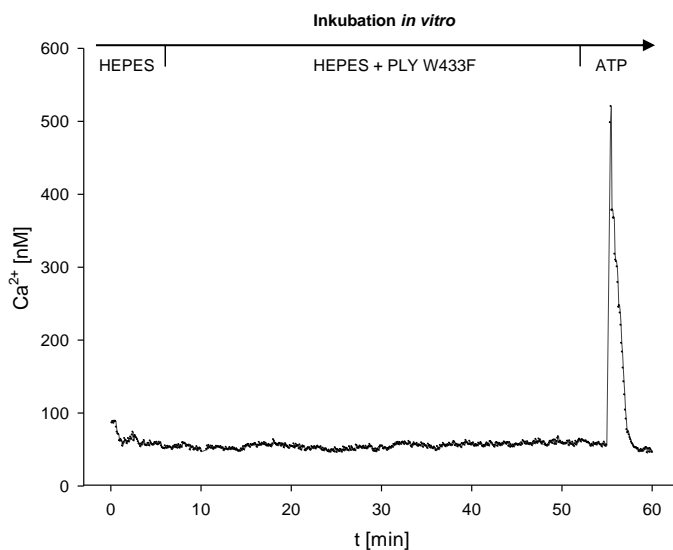


Abb. 11 zeigt die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen vor und nach PLY W433F 10ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 7$.

Ergebnisse

Wurde PLY W433F in einer Konzentration von 480ng/ml verwendet, welche im Hämolyseintest an der Grenze zur hämolytischen Aktivität dieser Mutante lag, zeigte sich ein charakteristisches Ca^{2+} -Signal (Abb. 12).

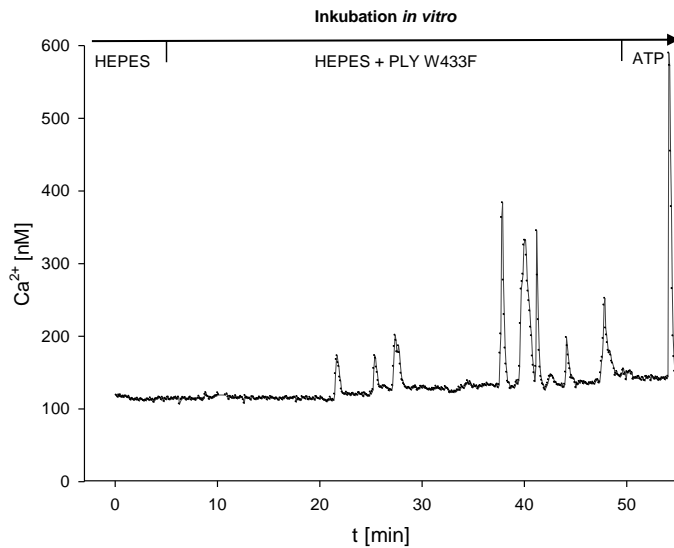


Abb. 12 zeigt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen vor und nach PLY W433F 480ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 9$.

Die PLY-Mutante PLY C428G besitzt nur bis zu 0,1% hämolytische Aktivität (Hammerschmidt et al.). Die Verwendung dieser Mutante zeigte in der Konzentration von 480ng/ml keine Anstiege der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ im Gegensatz zur Mutante PLY W433F (Abb. 13). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in den Konzentrationsbereichen der Mutanten, in denen keine Lyse stattfand, auch keine signifikanten Veränderungen der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ zu erkennen waren.

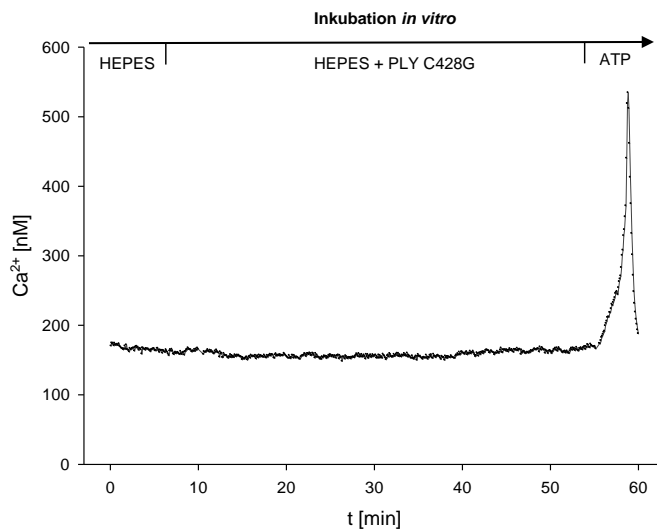


Abb. 13 zeigt die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen vor und nach PLY C248G 480ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 7$.

3.1.1 Einfluss des extrazellulären Ca^{2+} auf das PLY-vermittelte zelluläre Ca^{2+} -Signal

Nach der Inkubation mit PLY WT unter Ca^{2+} -freien Bedingungen in einer Konzentration im niedrigen hämolytischen Bereich von 10ng/ml (Abb. 14) zeigten sich nur einzelne schmale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege über den Inkubationszeitraum von 45min.

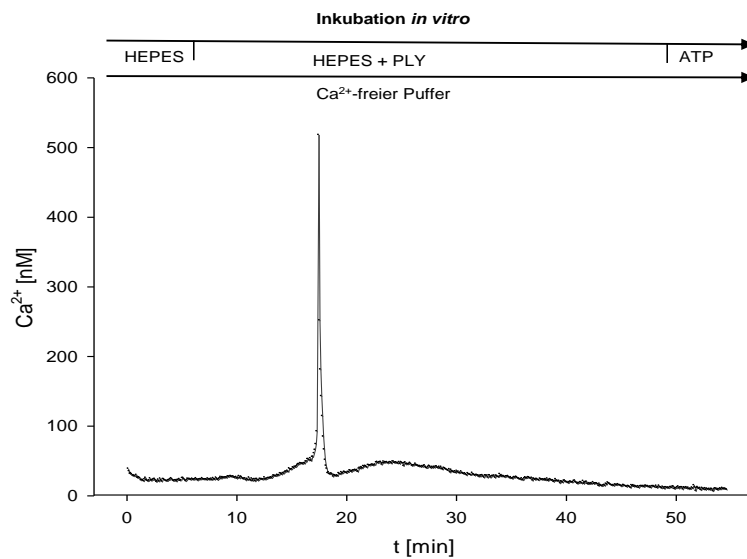


Abb. 14 zeigt die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -freien Bedingungen vor und nach PLY WT 10ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 9$.

Ergebnisse

In den Versuchen mit calciumfreien Medium blieben unter hämolytischen Konzentrationen des PLY W433F in einer Konzentration von 480ng/ml die charakteristischen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege aus (Abb. 15).

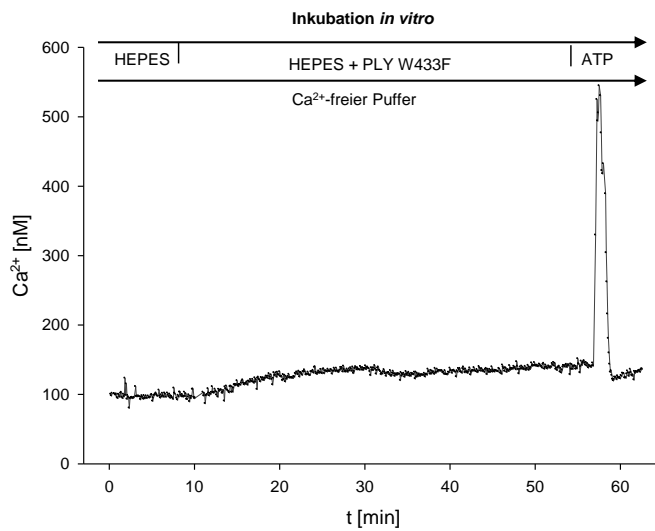


Abb. 15 zeigt die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in einer exemplarischen HPMEC unter Ca^{2+} -freien Bedingungen vor und nach PLY W433F 480ng/ml sowie nach ATP wie angezeigt. $n = 7$.

3.2 Transduktion des Ca^{2+} -Signals - Rezeptorassoziation des Ca^{2+} -Signals

3.2.1 IP_3 -Rezeptor - Xestospongine C

Die Inhibition des IP_3 -Rezeptors fand über 20min Vorinkubation mit 20 μM Xestospongine C unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen statt. Die Inhibition wurde mit ATP in der Versuchskontrolle nach 65min Inkubationszeit mit Xestospongine C überprüft (Abb. 16). Des Weiteren wurde in der Versuchskontrolle die Wirkung des Xestospongine C auf die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ untersucht. Nachdem eine stabile Baseline über 10min gemessen worden war, zeigten sich nach der Vorinkubation mit Xestospongine C bei dem abgebildeten Kontrollversuch mit HEPES keine signifikanten Veränderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$. Im Vergleich dazu waren nach Vorinkubation mit Xestospongine C und Zugabe von WT D39 vereinzelte Anstiege der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ zu erkennen (Abb. 16).

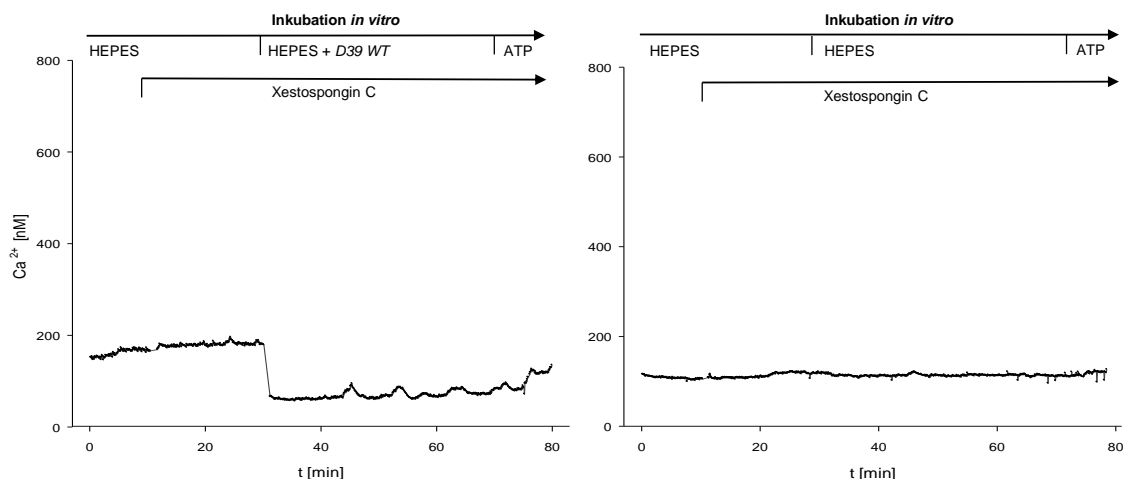


Abb. 16 Beispielhafte Darstellung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HPMEC unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen nach Inkubation mit WT D39 (linke Seite, $n=4$) oder unter Kontrollbedingungen (rechte Seite, $n=2$) während der Inhibition des IP_3 -Rezeptor mit Xestospongine C über 65min. Die Inkubation mit WT D39 zeigt $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege, während die Kontrolle auf dem Niveau der Baseline bleibt.

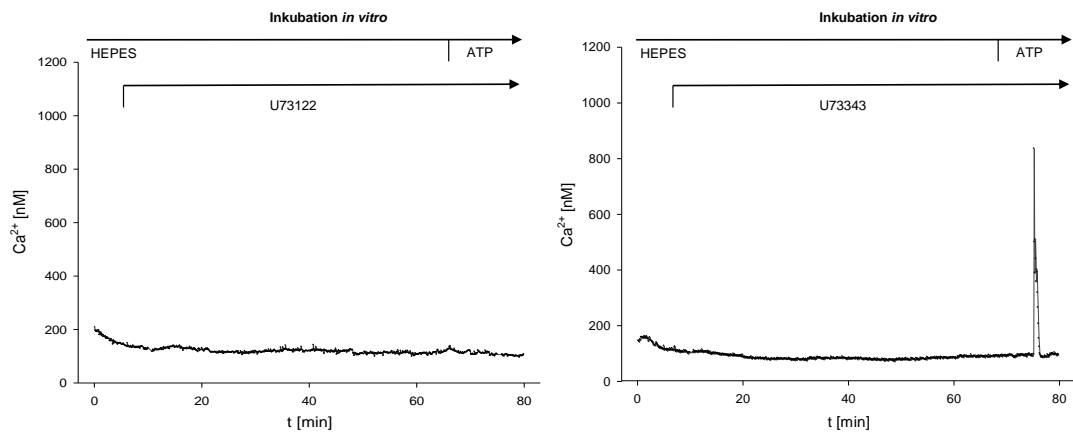
3.2.2 Phospholipase C - U73122 / U73343

Zur Inhibition der Phospholipase C wurde über 20min mit 2 μ M U73122 bzw. mit 2 μ M des Strukturanalogons U73343 vorinkubiert. Die Versuchskontrolle wurde nach 65min Inkubation mit U73122 unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen mit ATP durchgeführt (Abb. 17A). Die ausbleibende ATP-Antwort der Versuchskontrolle zeigte, dass die Phospholipase C durch U73122 über den Zeitraum der Versuchsdauer inhibiert wurde. Diese Versuchskontrolle wurde ebenfalls mit dem Strukturanalogon U73343 als Kontrollsubstanz durchgeführt, welches eine positive Reaktion auf ATP zeigte (Abb. 17A).

Die Werte der [Ca²⁺]_{zyt} nach U73343 lagen auf dem Niveau der Ausgangsbedingungen. Nach U73343 in Kombination mit WT D39 zeigten sich nach kurzer Latenz schmale Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt}, die innerhalb von Sekunden wieder die Ausgangs-[Ca²⁺]_{zyt} erreichten, sowie breite [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiege (Abb. 17B).

Nach U73122 allein zeigten sich in einzelnen Kontrollversuchen Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt}, während in den meisten Kontrollversuchen die [Ca²⁺]_{zyt} auf dem Niveau der Baseline blieb (Abb. 17A). Nach U73122 in Kombination mit WT D39 traten nach kurzer Latenzphase vermehrt breitbasige Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} auf (Abb. 17B). Unter der Intervention mit U73122 und WT D39 zeigte sich entgegengesetzt zu den Kontrollversuchen erneut eine positive ATP-Antwort.

A)



B)

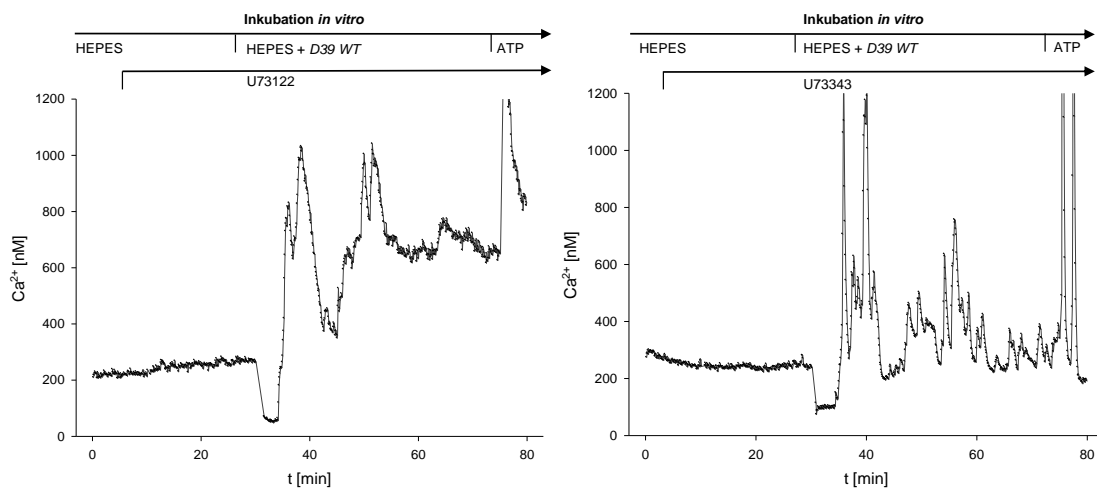


Abb. 17 A-B Beispielhafte Darstellung der $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HPMEC nach Vorinkubation mit U73122 (linke Seite) oder mit U73343 (rechte Seite) und nach A) ATP oder B) WT D39, jeweils $n = 6$.

3.2.3 Rezeptor-Tyrosinkinasen - Genistein

Die tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität wurde mittels 30minütiger Vorinkubation mit 100 μ M Genistein unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen inhibiert. Eine passende Inhibitionskontrolle stand nicht zur Verfügung, sodass die Konzentration des Inhibitors ähnlich derer anderer Arbeitsgruppen gewählt wurde (Fleming et al. 1995). Unter Genistein-Kontrollbedingungen blieb die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ nach der Vorinkubation mit Genistein auf dem Niveau der Baseline (Abb. 18). Nach der Vorinkubation mit Genistein zeigte sich während der Interventionsbedingungen das bekannte Ca^{2+} -Signal (Abb. 18).

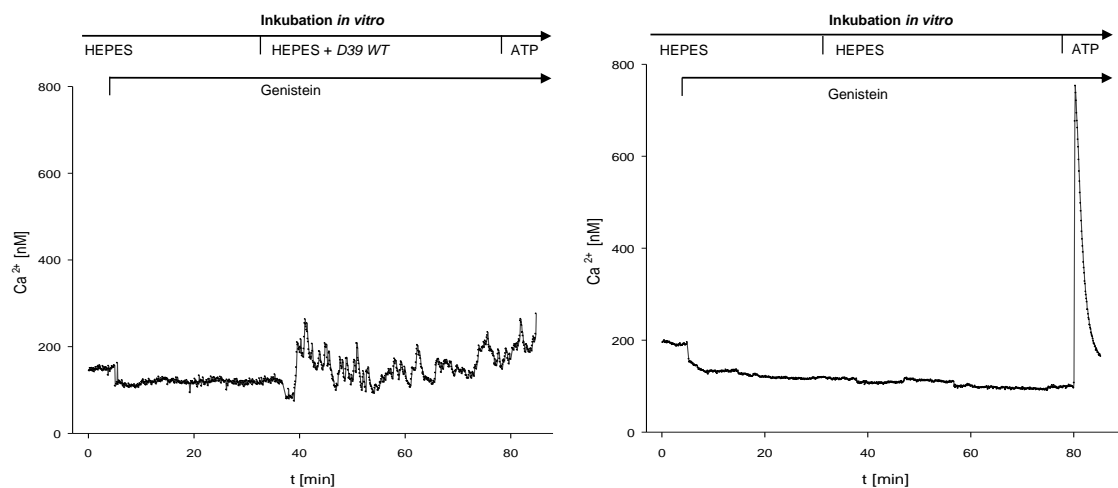


Abb. 18 zeigt die beispielhafte Darstellung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HPMEC über 80 min. Es wird über 30min die tyrosin-spezifische Proteinkinaseaktivität mit Genistein inhibiert und über 45min mit WT D39 (links, $n = 6$) oder HEPES-Puffer (rechts, $n = 5$) inkubiert. Die Inkubation mit WT D39 zeigt schmale und breitbasige $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege, während die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ des Kontrollversuches unverändert bleibt.

3.2.4 Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca²⁺-Signales und der ATP-Antwort nach WT D39 mit oder ohne Inhibition verschiedener Signalwege

Der Anteil der reagiblen Zellen nach WT D39 allein betrug $79,9 \pm 12,9\%$. Nach Xestospongine C in Kombination mit WT D39 zeigte sich ein Anteil reagibler Zellen von $50,37 \pm 34,39\%$. Der Anteil der reagiblen Zellen nach U73122 in Kombination mit WT D39 lag bei $93,33 \pm 14,91\%$, während dieser nach U73343 in Kombination mit WT D39 bei $81,34 \pm 21,64\%$ lag. Nach Genistein in Kombination mit WT D39 war der Anteil der reagiblen Zellen bei $94,72 \pm 10,02\%$. Der Anteil der reagiblen Zellen zwischen den genannten Interventionsgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 19).

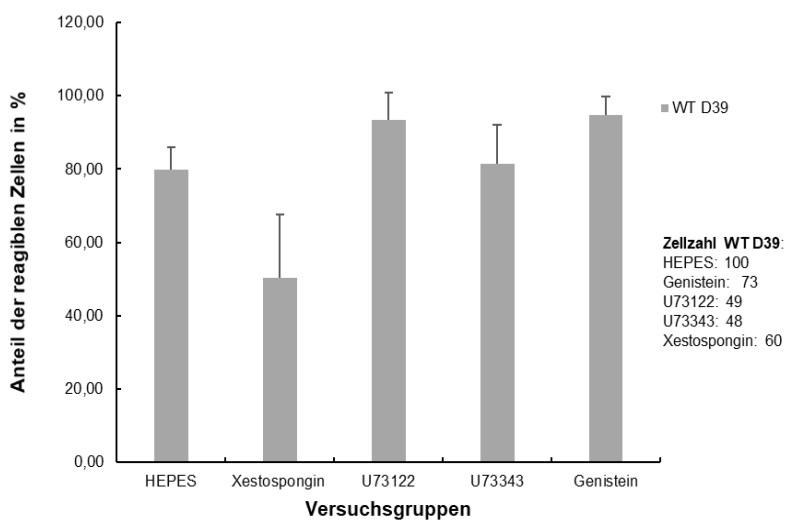


Abb. 19: Durchschnittliche Anzahl der reagiblen Zellen in Prozent je Versuchsgruppe wie gekennzeichnet in HPMEC. Alle Zellen wurden mit WT D39 behandelt. Dargestellt als MW ± SD in %, * = $p < 0,05$ versus HEPES.

Ergebnisse

Die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes nach WT D39 allein lag bei $3,85 \pm 2,31$ pro 45min. Nach Xestospongine in Kombination mit WT D39 lag die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes bei $1,65 \pm 1,21$ pro 45min. Die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes nach U73122 in Kombination mit WT D39 zeigte sich mit $2,81 \pm 1,9$ pro 45min, während diese nach U73343 in Kombination mit WT D39 bei $4,52 \pm 3,13$ pro 45min lag. Nach Genistein in Kombination mit WT D39 war die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes bei $4,88 \pm 1,62$ pro 45min. Die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes zwischen den genannten Interventionsgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 20).

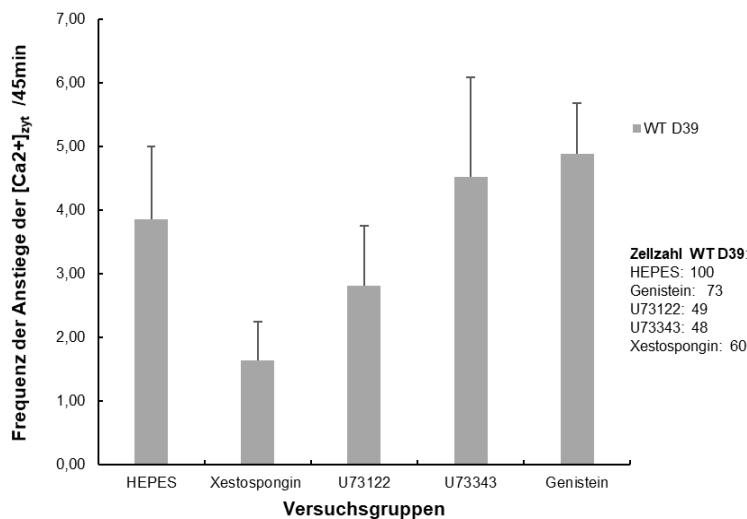


Abb. 20: Frequenz der Ca^{2+} -Spikes pro 45min je Versuchsgruppe wie gekennzeichnet in HPMEC. Alle Zellen wurden mit WT D39 behandelt. Dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ in absoluten Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HEPES

Das Verhältnis der Amplitude (Verhältnis der maximalen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ der Intervention zur durchschnittlichen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ der Baseline) nach WT D39 allein lag bei $6,51 \pm 5,02$. Nach Xestospongin in Kombination mit WT D39 ergab sich ein Verhältnis der Amplitude von $2,23 \pm 0,71$. Das Verhältnis der Amplitude nach U73122 in Kombination mit WT D39 betrug $9,34 \pm 13,11$, während es nach U73343 in Kombination mit WT D39 bei $18,73 \pm 31,9$ lag. Nach Genistein in Kombination mit WT D39 war das Verhältnis der Amplitude $3,46 \pm 0,49$.

Zwischen den genannten Interventionsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich des Verhältnisses der Amplitude (Abb. 21).

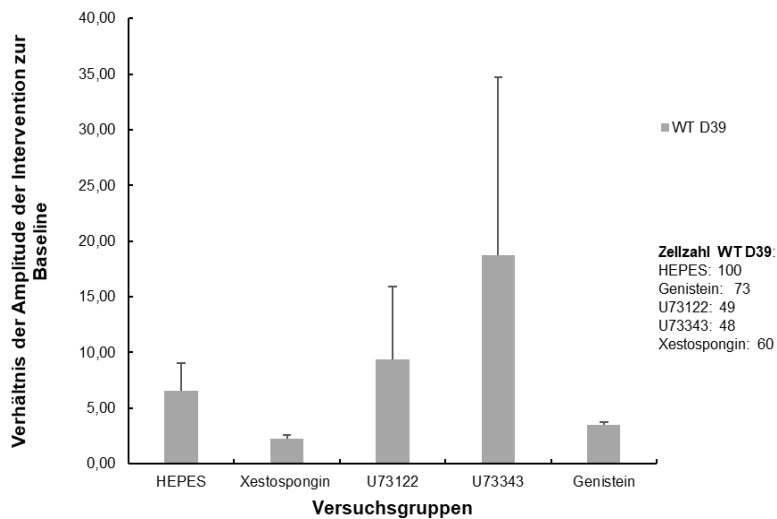


Abb. 21: Verhältnis der Amplitude der Intervention zur Baseline je Versuchsgruppe wie gekennzeichnet in HPMEC. Alle Zellen wurden mit WT D39 behandelt. Dargestellt als MW ± SD in absoluten Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HEPES

Als Kontrolle der Inhibition der verwendeten Substanz wurde die relative ATP-Antwort in den Versuchen ausgewertet (0=negativ und 1=positiv).

Die relative ATP-Antwort nach WT D39 allein lag bei $0,87 \pm 0,12$ Zellen/Versuch. Nach Xestospongine in Kombination mit WT D39 war die relative ATP-Antwort bei $0,58 \pm 0,29$ Zellen/Versuch. Die relative ATP-Antwort nach U73122 in Kombination mit WT D39 lag bei $0,82 \pm 0,13$ Zellen/Versuch, während diese bei U73343 in Kombination mit WT D39 bei $0,92 \pm 0,12$ Zellen/Versuch lag. Nach Genistein in Kombination mit WT D39 ergab sich eine relative ATP-Antwort von $0,86 \pm 0,29$ Zellen/Versuch.

Zwischen den genannten Interventionsgruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der relativen ATP-Antwort (Abb. 22).

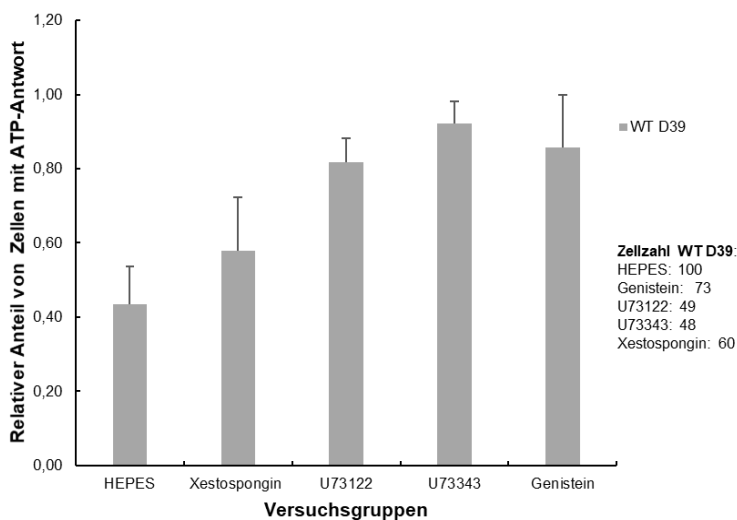


Abb. 22: Relativer Anteil von Zellen mit positiver ATP-Antwort je Versuchsgruppe wie gekennzeichnet in HPMEC. Alle Zellen wurden mit WT D39 behandelt. Dargestellt als MW \pm SD in relativen Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HEPES

3.3 Validierung des Ca²⁺-Signales in Reaktion auf Pneumokokken in HEK-Zellen

Die HEK-Zellen wurden auf Grund ihrer besseren Transfektionseigenschaft in den nachfolgenden Versuchen verwendet. Daher wurde zur Datenvalidierung das Ca²⁺-Signal in HEK-Zellen nach WT D39 untersucht und mit dem Ca²⁺-Signal nach WT D39 in HPMEC verglichen.

3.3.1 Humane embryonale Nierenzellen

Die HEK-Zellen wurden für 45min mit WT D39 oder mit HEPES-Puffer unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen inkubiert (Abb. 23A). Nach WT D39 zeigten sich in allen Zellen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiege über den gesamten Zeitraum, die bereits in den HPMEC als typisches Signal beschrieben wurden. Unter Kontrollbedingungen zeigten sich keine Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen (Abb. 23A).

Nach WT D39 unter Ca²⁺-freien-Bedingungen waren lediglich in den ersten Minuten des Inkubationszeitraumes (Abb. 23B) wenige schmale Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} in 98,26% ± 2,39% der Zellen zu erkennen. Unter Ca²⁺-freien-Kontrollbedingungen zeigten sich in 10,53 ± 21,05% der Zellen Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} (Abb. 23B).

Die Ca²⁺-Speicher des ER wurden zudem mit Thapsigargin, einem nicht kompetitiven Inhibitor der SERCA, entleert. Unter Kontrollbedingungen zeigte sich während der 30minütigen Vorinkubation mit Thapsigargin zunächst ein kurzer Anstieg der [Ca²⁺]_{zyt} durch die Entleerung der Speicher des endoplasmatischen Retikulums. Während der darauf folgenden Inkubation mit Ca²⁺-haltigen HEPES-Puffer (Abb. 23C) waren keine Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} nachweisbar. Nach WT D39 (Abb. 23C) traten vermehrt breitbasige und wenige schmale Anstiege der [Ca²⁺]_{zyt} in 98,29% ± 3,15% der Zellen auf. Damit reagierten die HEK-Zellen nach WT D39 vergleichbar zu den HPMEC.

Tab. 5: HEK-Zellen - Durchschnittliche Zellzahl sowie Anteil der reagiblen Zellen

	Zellzahl/ Versuch MW \pm SD	Reagible Zellen/Versuch in % MW \pm SD
WT D39	25 \pm 3,63	100 \pm 0
HEPES	21,4 \pm 3,97	0 \pm 0
WT D39 Ca²⁺-frei	25 \pm 2,83	98,26 \pm 2,39
HEPES Ca²⁺-frei	20,25 \pm 3,95	10,53 \pm 21,05
TG + WT D39	22,71 \pm 6,78	98,29 \pm 3,15
TG	17,8 \pm 6,83	0,01 \pm 0,02

Ergebnisse

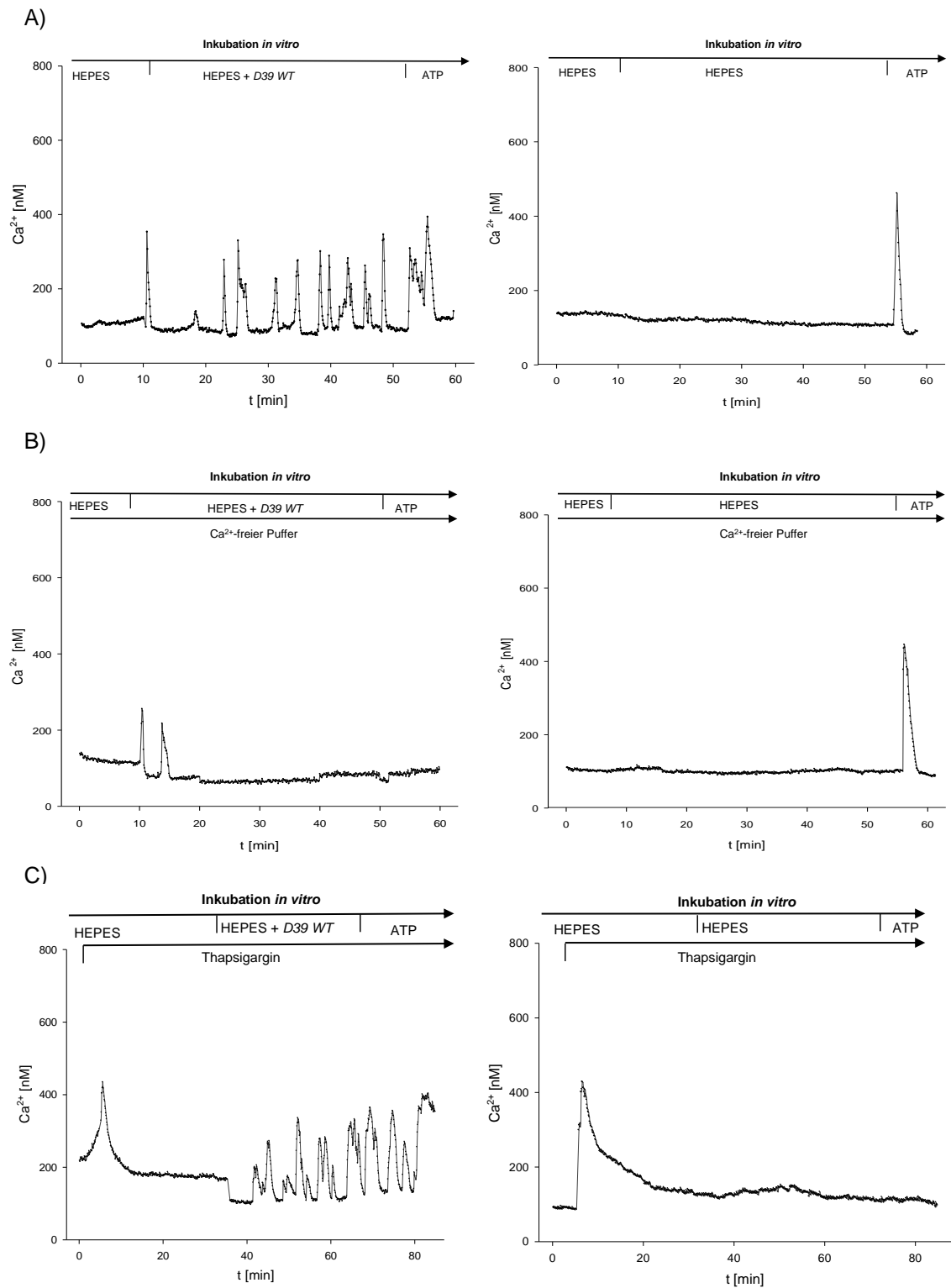


Abb. 23 A) - C): Beispielhafte Darstellung der $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HEK-Zellen nach Inkubation mit WT D39 (linke Seite) oder unter Kontrollbedingungen (rechte Seite) unter Verwendung von A) Ca^{2+} -haltigem HEPES-Puffer, B) Ca^{2+} -freiem HEPES-Puffer, C) nach 30min Vorinkubation mit Thapsigargin.

3.4 Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca²⁺-Signales und der ATP-Antwort von HPMEC und HEK-Zellen

Die Anzahl der reagiblen Zellen unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen war bei den HPMEC nach WT D39 mit 79,79% ± 12,29% geringer verglichen mit den HEK-Zellen nach WT D39 mit einem Anteil von 100,00% ± 0,00% (Abb. 24). In den Kontrollgruppen zeigte sich weder bei den HPMEC noch HEK-Zellen eine Reaktion, sodass der Anteil reagibler Zellen jeweils in der Interventionsgruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe war.

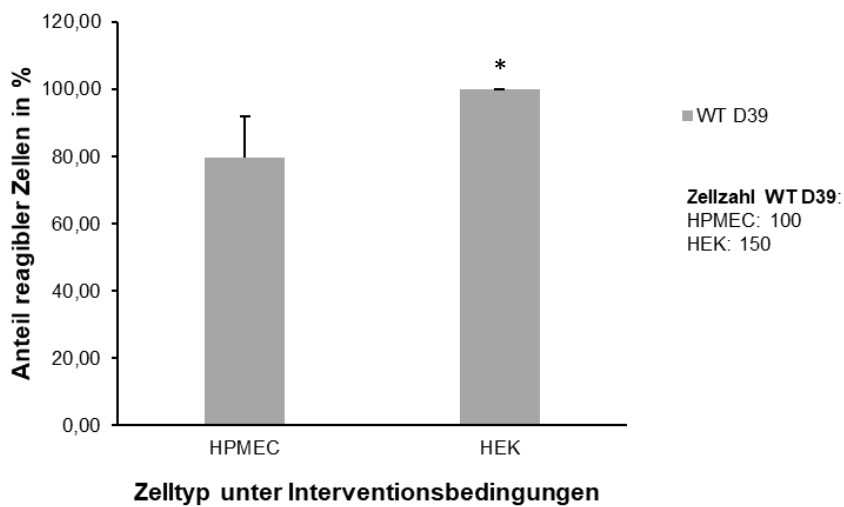


Abb. 24: Durchschnittliche Anzahl der reagiblen Zellen in Prozent je Zelltyp nach WT D39. Dargestellt als MW ± SD in %, * = $p < 0,05$ versus HPMEC.

Die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes lag nach WT D39 in der Gruppe der HPMEC bei $3,85 \pm 2,31$ pro 45min je Versuch, welches sich nicht zur Frequenz der Ca^{2+} -Spikes der HEK-Zellen nach WT D39 mit $6,59 \pm 1,51$ pro 45min unterschied (Abb. 25).

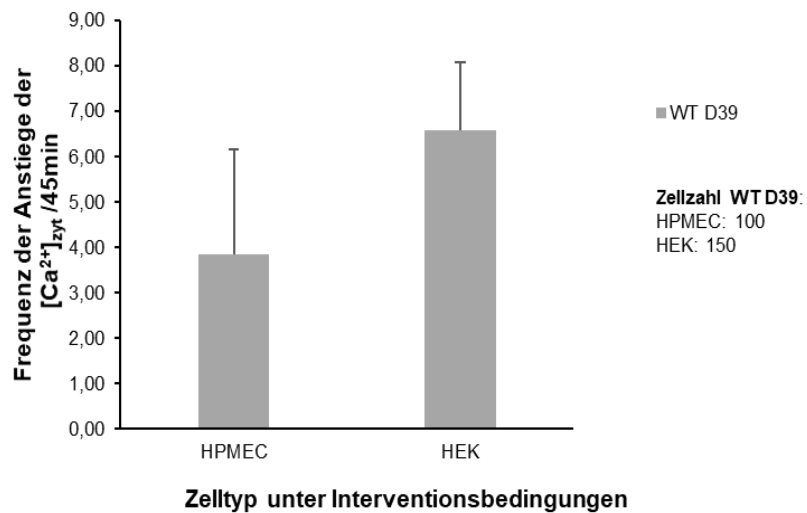


Abb. 25: Frequenz der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege um $>50\%$ des Ausgangswertes/45min je Zelltyp nach WT D39. Dargestellt als $\text{MW} \pm \text{SD}$ in absoluten Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HPMEC

Das Verhältnis der Amplitude nach WT D39 zeigte bei den HPMEC mit $6,51 \pm 5,02$ keinen Unterschied zu den HEK-Zellen nach WT D39 mit $2,62 \pm 0,46$ (Abb. 26).

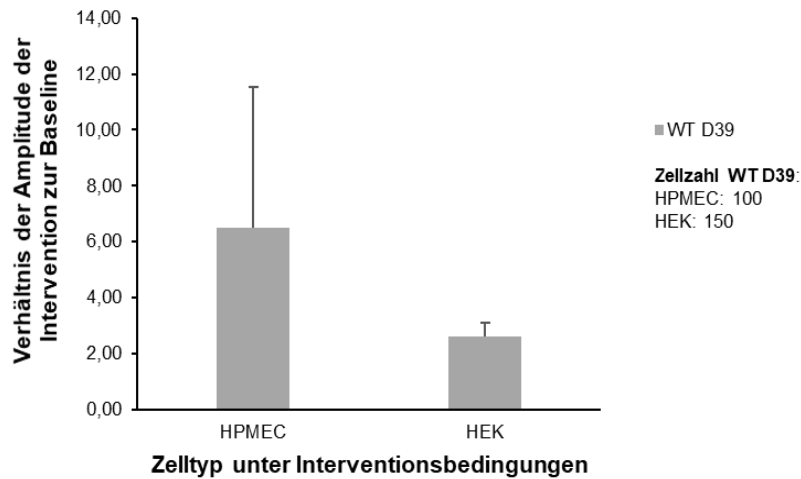


Abb. 26.: Verhältnis der Amplitude nach WT D39 je Zelltyp. Dargestellt als MW \pm SD in absoluten Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HPMEC

Die relative ATP-Antwort der HPMEC nach WT D39 lag bei $0,87 \pm 0,12$ Zellen/Versuch, welches sich nicht zu den HEK-Zellen nach WT D39 mit $0,49 \pm 0,3$ Zellen/Versuch unterschied (Abb. 27). Zwischen den Kontrollgruppen bestand ebenfalls kein Unterschied (HPMEC-Kontrollgruppe $0,83 \pm 0,41$ Zellen, HEK-Zellen-Kontrollgruppe $0,83 \pm 0,38$ Zellen).

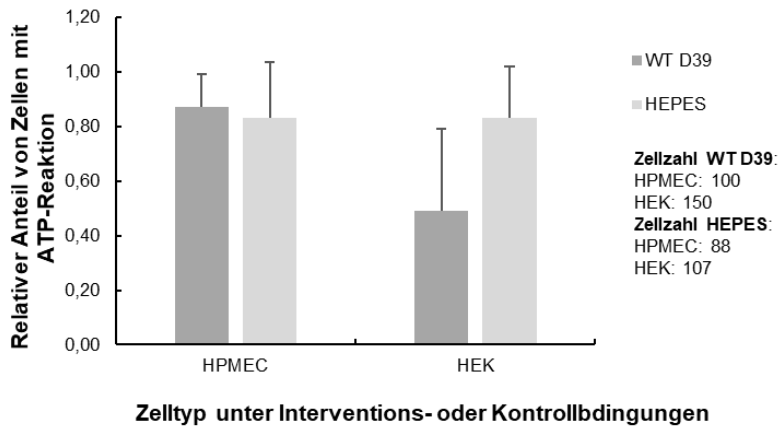


Abb. 27: Relativer Anteil von Zellen mit positiver ATP-Reaktion nach WT D39 oder HEPES je Versuchgruppe. Dargestellt als MW ± SD in relativen Zahlen. * = $p < 0,05$ versus HPMEC WT D39

3.5 Untersuchung zur Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren am WT D39 getriggertem Ca^{2+} -Signal

3.5.1 Nachweis der Expression des $\text{G}\alpha\text{Q}$ und des $\text{G}\alpha\text{11}$ in HEK-Zellen und in HPMEC

Die Versuche zum *Knockdown* des $\text{G}\alpha\text{Q}$ und des $\text{G}\alpha\text{11}$ wurden auf Grund der besseren Transfektionsverträglichkeit in HEK-Zellen durchgeführt. Daher überprüften wir zur Vergleichbarkeit der Daten die Expression des $\text{G}\alpha\text{11}$ und des $\text{G}\alpha\text{Q}$ sowohl in HEK-Zellen als auch in HPMEC. Es zeigte sich, dass die Expression beider G-Proteine in den beiden Zelltypen vorhanden ist (Abb. 28). Die Beladung des Gels wurde mit dem Haushaltsgen 18-S überprüft.

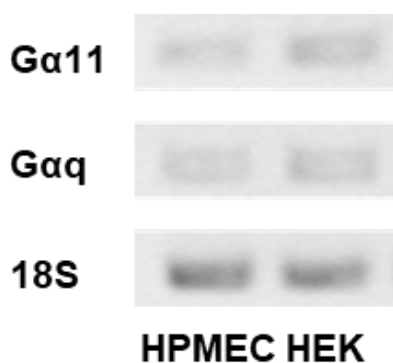


Abb. 28 zeigt die Expression des $\text{G}\alpha\text{11}$, $\text{G}\alpha\text{Q}$ sowie zur Kontrolle das Haushaltsgen 18-S in HEK-Zellen oder HPMEC auf RNA-Ebene (invertierte Darstellung).

Bei fehlendem Normwert der Expression des $\text{G}\alpha\text{Q}$ und des $\text{G}\alpha\text{11}$ fand die Auswertung des Gels als relative Densitometrie im Vergleich zum Hintergrund statt. Die Beladung des Gels wurde durch das Expressionsverhältnis zum Haushaltsgen 18-s korrigiert (Abb. 29). Es zeigte sich, wie in Abb. 29 dargestellt, eine 0,4-fache Expression des $\text{G}\alpha\text{Q}$ in den HPMEC und eine 0,64-fache Expression in den HEK-Zellen im Vergleich zum Hintergrund. Die Expression des $\text{G}\alpha\text{11}$ war in den HPMEC 0,46-fach und in den HEK-Zellen 0,73-fach im Vergleich zum Hintergrund.

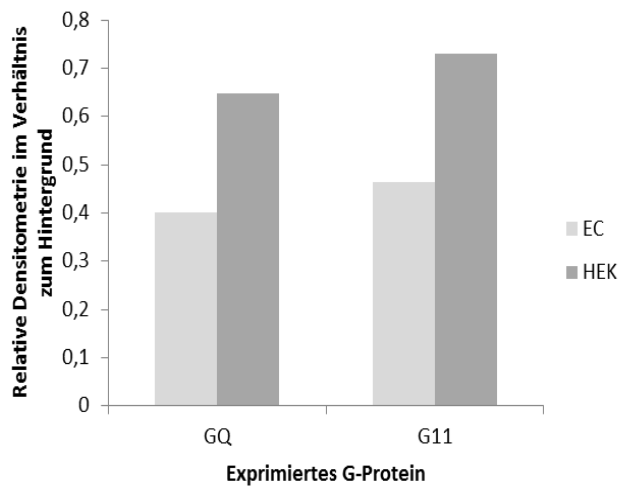


Abb. 29: Vergleich der Expressionsstärke des GaQ oder des Ga11 je Zelltyp als relative Densitometrie im Verhältnis zum Hintergrund sowie korrigiert durch das Expressionsverhältnis des Haushaltgens 18-s zur Vergleichbarkeit der Daten in den verschiedenen Zelltypen. n= 1

3.5.2 Überprüfung der Expression von G α Q und G α 11 in den Einzel- und Doppeltransfektionsversuchen auf RNA-Ebene

Die Bande des G α Q lag wie erwartet bei 400bp und des G α 11 bei 230bp, während die von 18-S bei 200bp lag. Die Abb. 30 zeigt die Gruppen Nativ, Einzeltransfektion mit der siRNA von G α Q oder G α 11 mit je 100pmol, die Doppeltransfektion von G α Q/11 mit je 50pmol siRNA für G α Q und G α 11 und die Kontrolle mit 100pmol scrambled (scr) siRNA. Die eingesetzte RNA-Menge der Versuchsgruppen wurde mit dem Haushaltsgen 18-S quantifiziert, um die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen zu gewährleisten.

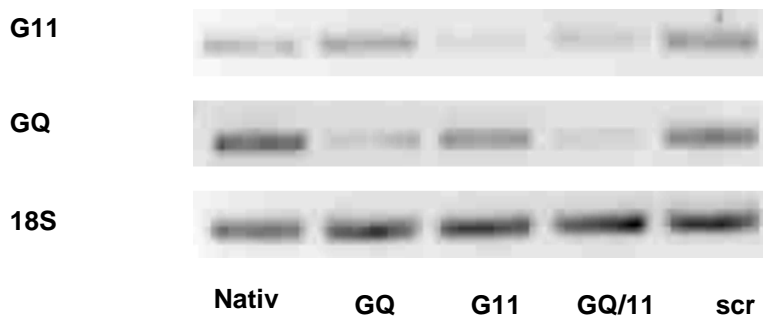


Abb. 30 zeigt den Knockdown der Einzel- oder Doppeltransfektion des G α Q und G α 11 in HEK-Zellen in den unterschiedlichen Versuchsgruppen im Agarosegel (invertierte Darstellung).

In den Abb. 31 und 32 ist die durchschnittliche RNA-Expression nach der Doppeltransfektion des $G\alpha Q$ und des $G\alpha 11$ *Knockdowns* (n=5) abgebildet. Der *Knockdown* der G-Proteine wurde im Vergleich zur Expression der Nativprobe angegeben. In Abb. 31 zeigt sich ein *Knockdown* des $G\alpha 11$ auf 16% im Vergleich zur Nativprobe bei der Einzeltransfektion der $G\alpha 11$ -siRNA sowie ein *Knockdown* auf 44% im Vergleich zur Nativprobe bei der Doppeltransfektion der $G\alpha Q/11$ -siRNA. Da die scr-Probe in einigen Versuchen bereits signifikant weniger $G\alpha 11$ exprimierte, erfolgte die statistische Auswertung im Vergleich zur scr-siRNA-Gruppe. Die Expression des $G\alpha 11$ war in der Gruppe des $G\alpha 11$ -*Knockdowns* signifikant geringer als in der Gruppe der mit scr transfizierten siRNA. Die Gruppen des $G\alpha Q$ - und $G\alpha Q/11$ -*Knockdowns* unterschieden sich in der Expression des $G\alpha 11$ nicht statistisch signifikant gegenüber der scr-Gruppe.

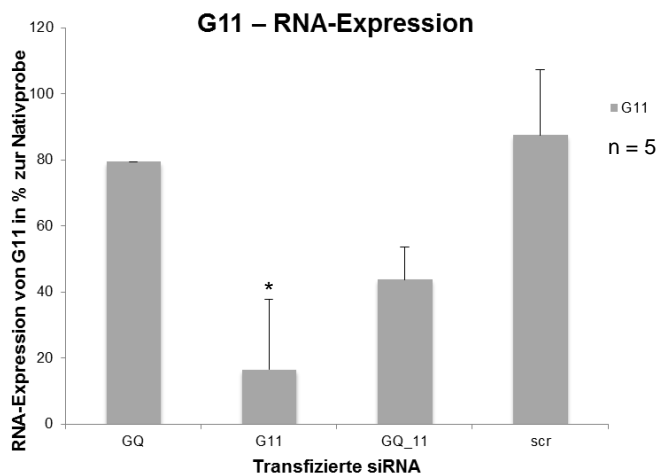


Abb. 31 zeigt die RNA-Expression des $G\alpha 11$ in Prozent zur Nativprobe je nach verwendeter siRNA. Dargestellt als $MW \pm SD$ in %, * = $p < 0,05$ versus scr (Nativ nicht dargestellt).

Die Abb. 32 gibt den *Knockdown* des GαQ wieder. Im Vergleich zur Nativprobe ist dieser bei der Einzeltransfektion auf 14% und bei der Doppeltransfektion auf 12% herunterreguliert. Es erfolgte ebenfalls der Vergleich mit der scr-siRNA-Gruppe, da diese bereits gegenüber der Nativgruppe signifikant weniger GαQ exprimiert. Gegenüber der scr-siRNA-Gruppe exprimierten die Gruppen des GαQ-, Gα11- und GαQ/11-Knochdowns signifikant weniger GαQ.

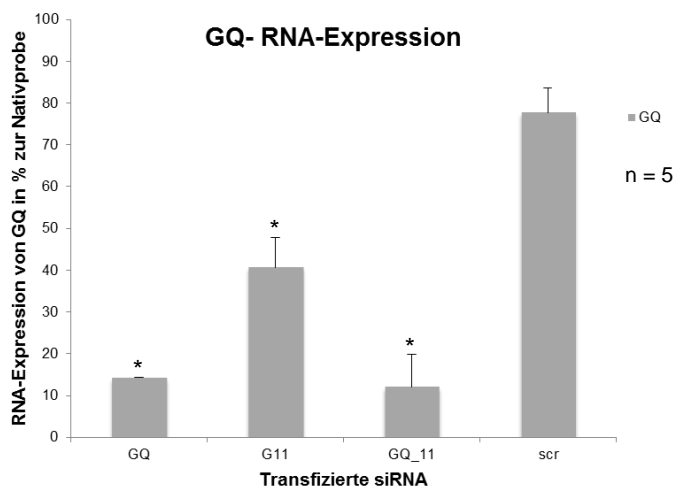


Abb. 32 zeigt die RNA-Expression des GαQ in Prozent zur Nativprobe je nach verwendeter siRNA. Dargestellt als $MW \pm SD$ in %, * = $p < 0,05$ versus scr (Nativ nicht dargestellt).

3.5.3 Überprüfung der Expression von GαQ und Gα11 in den Einzel- und Doppeltransfektionsversuchen auf Protein-Ebene

Neben der Kontrolle des *Knockdowns* auf RNA-Ebene wurde der *Knockdown* auch auf Proteinebene im Western Blot überprüft. Die Bande des GαQ lag wie erwartet bei 45kDa und des Gα11 bei 40kDa, während die von Beta-Actin bei 42kDa lag. Die Abb. 33 zeigt die Gruppen Nativ, Einzeltransfektion mit siRNA von GαQ oder Gα11 mit je 100pmol, die Doppeltransfektion von GαQ/11 mit je 50pmol und die Kontrolle mit 100pmol scrambled siRNA. Die Vergleichbarkeit der Versuchsgruppen wurde mit dem Haushaltsgen Beta-Actin validiert.

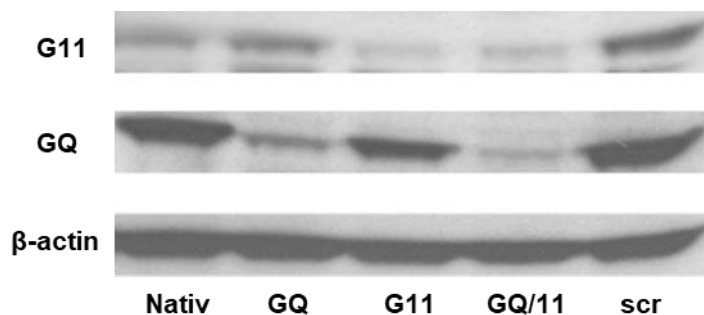


Abb. 33 zeigt den *Knockdown* der Einzel- oder Doppeltransfektion des GαQ und Gα11 in HEK-Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen im Western Blot.

In den Abb. 34 und 35 sind jeweils die durchschnittlichen Proteinexpressionen nach der Doppeltransfektion des Gα11 (n=4) oder des GαQ (n=5) *Knockdowns* abgebildet. Der *Knockdown* der G-Proteine wurde erneut im Vergleich zur Expression der Nativprobe angegeben. Es zeigte sich ein *Knockdown* des Gα11 auf 35,3% im Vergleich zur Nativprobe bei der Einzeltransfektion sowie ein *Knockdown* auf 36,7% im Vergleich zur Nativprobe bei der Doppeltransfektion (Abb. 34). Die statistische Auswertung erfolgte gegenüber der mit scr-siRNA transfizierten Gruppe. Es ergab sich eine statistisch signifikant geringere Expression des Gα11 in der Gruppe des Gα11-*Knockdowns* und des GαQ/11-*Knockdowns*.

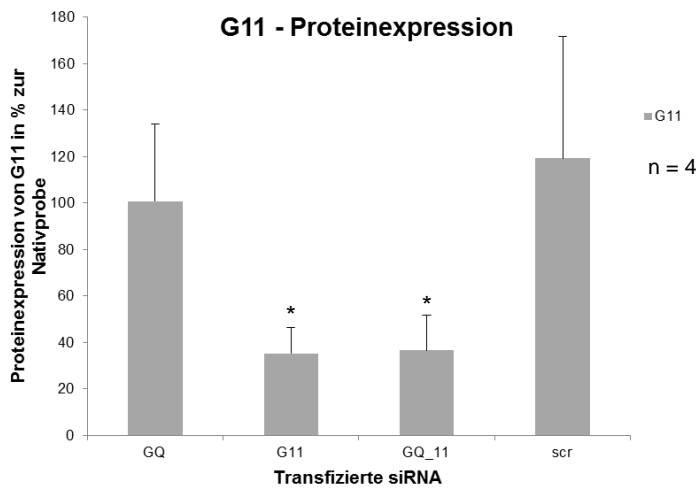


Abb. 34 zeigt die Protein-Expression des Gα11 in Prozent zur Nativprobe je nach verwendeter siRNA. Dargestellt als MW ± SD in %, * = p < 0,05 versus scr (Nativ nicht dargestellt).

Die Abb. 35 zeigt die Ergebnisse bezüglich des *Knockdown* von GαQ. Im Vergleich zur Nativprobe war dieser bei der Einzeltransfektion auf 36,5% und bei der Doppeltransfektion auf 19,5% herunterreguliert. Die statistische Auswertung erfolgte gegenüber der scr-siRNA-Gruppe. Die Expression des GαQ war in der Gruppe des GαQ-*Knockdowns* und der des GαQ/11-*Knockdowns* signifikant geringer gegenüber der Gruppe scr.

Sowohl für den GαQ als auch für den Gα11 erfolgte die Translation des *Knockdowns* auf Proteinebene in der Einzel- und Doppeltransfektion in HEK-Zellen.

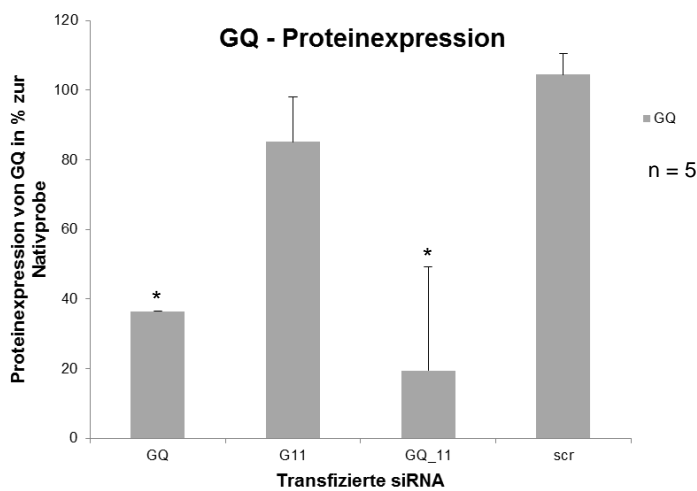
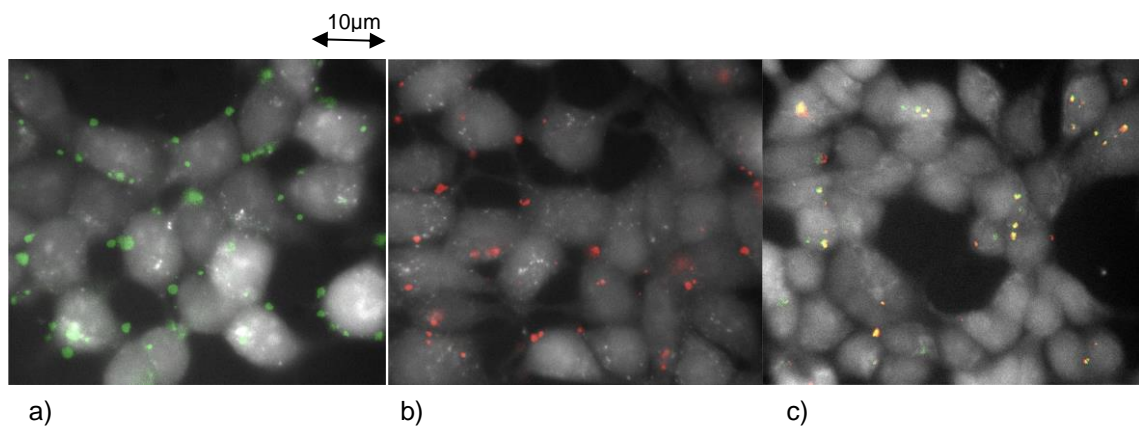


Abb. 35 zeigt die Protein-Expression des GαQ in Prozent zur Nativprobe je nach verwendeter siRNA. Dargestellt als MW ± SD in %, * = $p < 0,05$ versus scr (Nativ nicht dargestellt).

3.5.4 Knockdown von GαQ und Gα11 in HEK-Zellen – Versuche unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen

Die verwendete siRNA war fluoreszenzmarkiert, sodass eine Lokalisation transfizierter Zellen für die Ca²⁺-Imaging-Versuche stattfinden konnte und nur diese ausgewertet wurden. In der Abb. 36a) sind mit der grünlich fluoreszierenden siRNA Gα11 transfizierte HEK-Zellen markiert. In Abb. 36b) wurde rötlich fluoreszierende siRNA für mit GαQ transfizierte HEK-Zellen verwendet. Bei der Doppeltransfektion mit GαQ/Gα11 (Abb. 36c)) wurde die grünlich fluoreszierende siRNA von Gα11 und die rötlich fluoreszierende siRNA von GαQ verwendet und doppeltransfizierte Zellen zeigten rot und grün fluoreszierende siRNA an. Es zeigt sich in den Abb. 36a-c) randständig in den Zellen aufgenommene siRNA.



In Abb. 36 ist die fluoreszenzmarkierte siRNA des Gα11 (a, grünlich fluoreszierend), des GαQ (b, rötlich fluoreszierend) und der Doppeltransfektion des GαQ/Gα11 (c, rötlich und grünlich fluoreszierend) in den Calcium-Imaging Versuchen abgebildet.

Ergebnisse

Nach dem *Knockdown* des $G\alpha Q$ und des $G\alpha 11$ in HEK-Zellen wurden Ca^{2+} -Imaging-Versuche durchgeführt. In der Abb. 37 ist die Inkubation der mit $G\alpha Q/11$ oder scr transfizierten Zellen über 45min mit WT D39 oder HEPES-Puffer jeweils unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen gezeigt. Nach WT D39 zeigten sich unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen schmale und breitbasige $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege in der $G\alpha Q/G\alpha 11$ -*Knockdown*-Gruppe sowie in der scr-Gruppe. Unter Kontrollbedingungen waren in beiden Gruppen keine $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiege vorhanden.

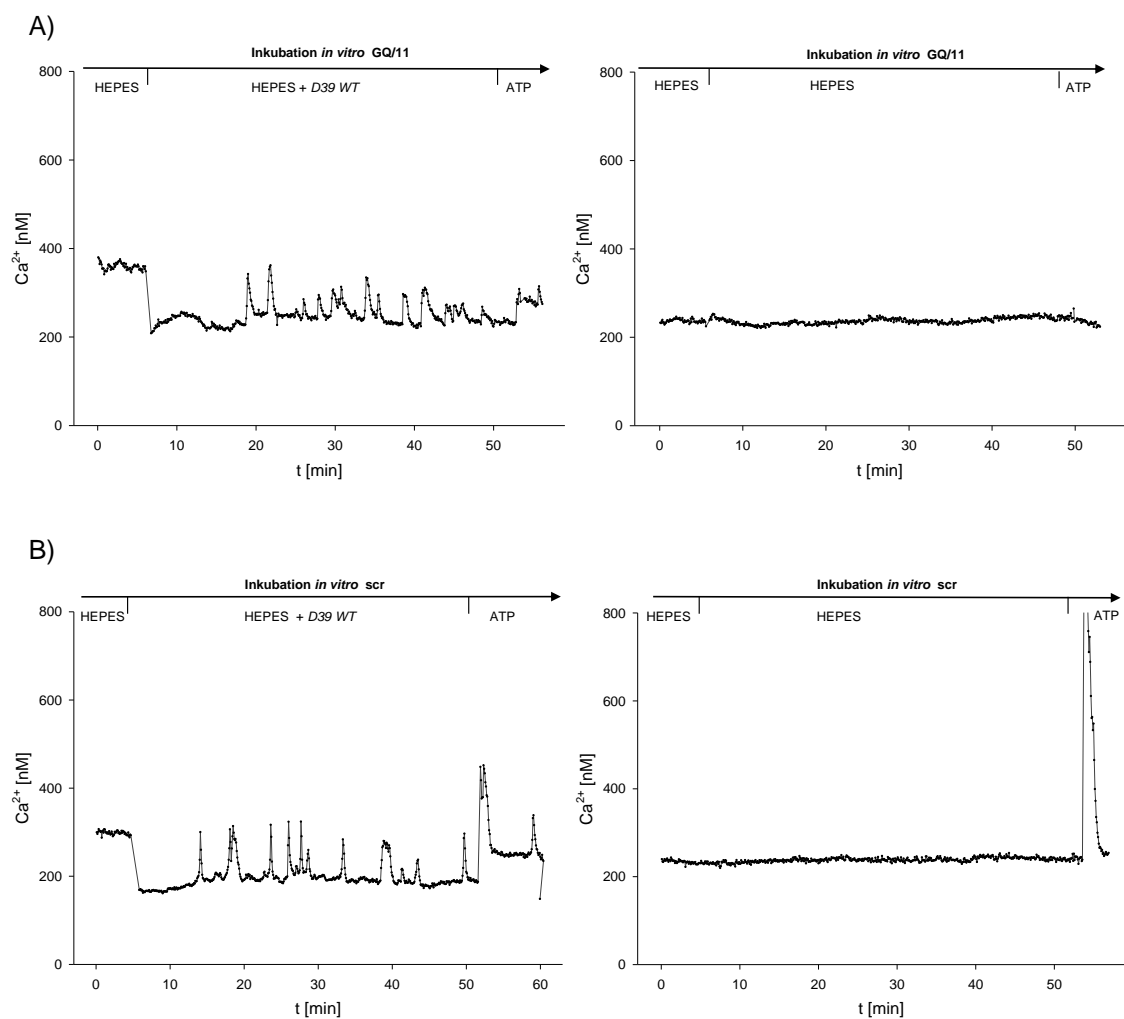


Abb.37 A) - B): Beispielhafte Darstellung der $[Ca^{2+}]_{zyt}$ in HEK nach WT D39 (linke Seite) oder unter Kontrollbedingungen (rechte Seite) unter Verwendung von A) HEK mit dem *Knockdown* von $G\alpha Q/11$, B) HEK transfiziert mit scr-siRNA, $n=5$ für alle Gruppen scr sowie für $G\alpha Q/11$ WT D39, $n=2$ für $G\alpha Q/11$ HEPES.

3.5.5 Knockdown von GaQ und Ga11 in HEK-Zellen - Versuche unter Ca^{2+} -freien Bedingungen

In der Abb. 38 sind dieselben Versuchsgruppen mit WT D39 oder HEPES-Puffer jeweils unter Ca^{2+} -freien Bedingungen abgebildet. Es zeigten sich in beiden Transfektionsgruppen keine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege unter Kontrollbedingungen. Nach WT D39 zeigten sich in der scr-Kontrollgruppe wenige schmale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege, die in der GaQ/Ga11-Knockdown-Gruppe ausbleiben.

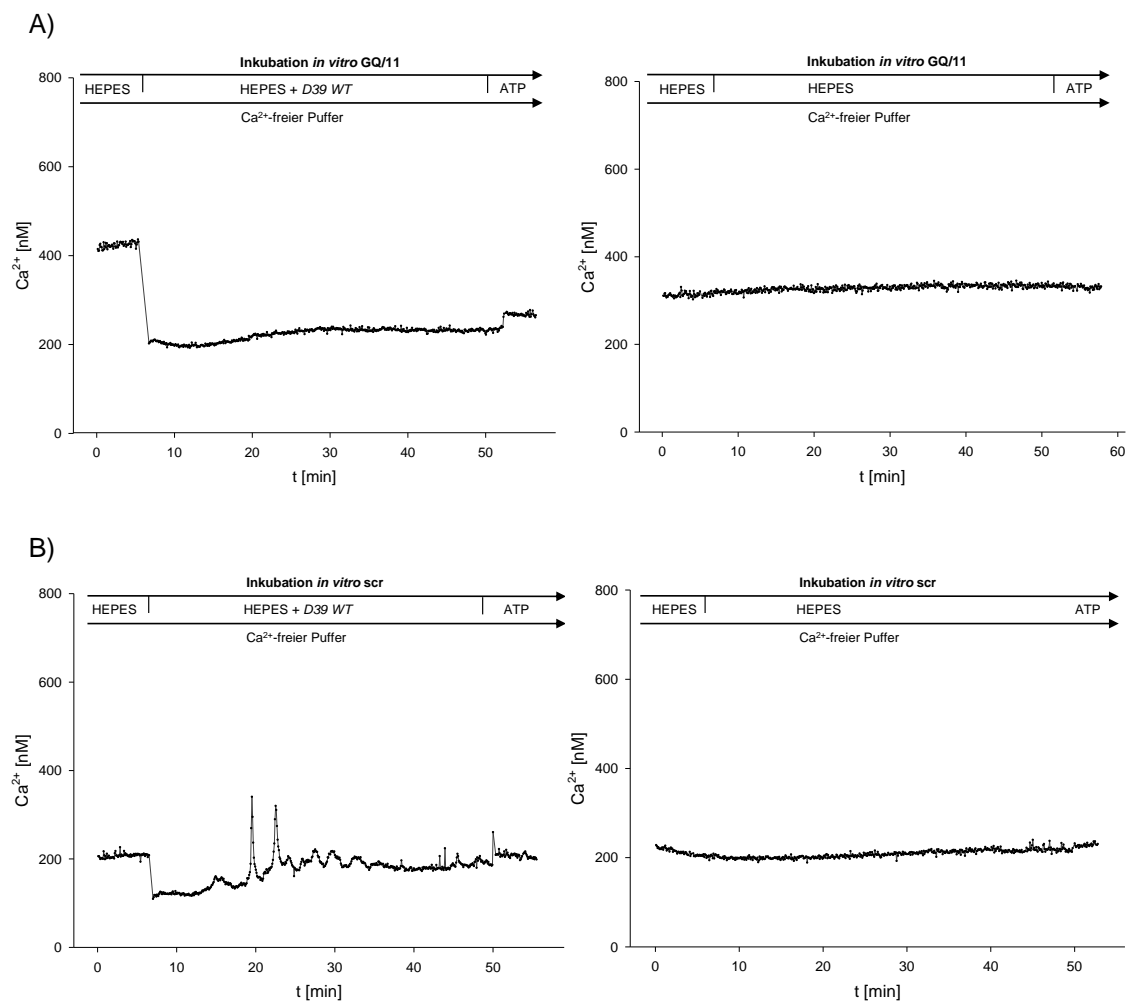


Abb.38 A) - B): Beispielhafte Darstellung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ in HEK unter Ca^{2+} -freien Bedingungen nach WT D39 (linke Seite) oder unter Kontrollbedingungen (rechte Seite) unter Verwendung von A) HEK mit dem Knockdown von GaQ/11, B) HEK transfiziert mit scr-siRNA, $n=4$ für GaQ/11 und $n=5$ für scr.

3.5.6 Vergleich des Anteils reagibler Zellen, der Frequenz, der Amplitude des Ca^{2+} -Signales und der ATP-Antwort in den unterschiedlichen Transfektionsgruppen

Es wurde der Anteil der reagiblen Zellen der scr-Gruppe mit der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe nach WT D39 oder HEPES unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen verglichen (Abb. 39).

Unter Kontrollbedingungen reagierten in keiner Versuchsgruppe Zellen. Nach WT D39 unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen unterschied sich der Anteil reagibler Zellen der scr-Gruppe mit $93,81\% \pm 6,83\%$ Zellen nicht von der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe mit $79,66\% \pm 14,6\%$ reagiblen Zellen.

Nach WT D39 unter Ca^{2+} -freien Bedingungen war der Anteil reagibler Zellen in der scr-Gruppe bei $66,58\% \pm 39,42\%$, welches keinen Unterschied zur GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe mit $6,75\% \pm 9,43\%$ Zellen darstellte.

Wurde jedoch die GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe nach WT D39 in Ca^{2+} -freiem Medium mit der scr-Gruppe nach WT D39 in Ca^{2+} -haltigem Medium verglichen, zeigten sich signifikant weniger reagible Zellen in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe.

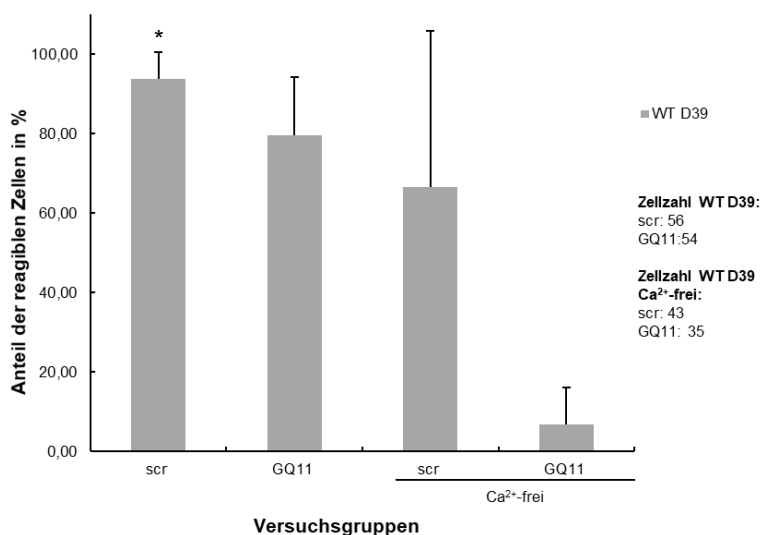


Abb. 39: Anteil der reagiblen Zellen nach WT D39 in scr- oder GαQ/11-transfizierten HEK-Zellen unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen, wie dargestellt. Dargestellt als MW \pm SD in %, * = $p < 0,05$ versus GαQ/11 Ca^{2+} -frei.

Die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes der scr-Gruppe wurde im Vergleich zur Frequenz der Gruppe des $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -*Knockdown* jeweils nach WT D39 unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen untersucht (Abb. 40).

Unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen lag die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes nach WT D39 in der scr-Gruppe bei $6,15 \pm 2,42$ pro 45min, welche sich von der $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -*Knockdown*-Gruppe nach WT D39 mit $5,34 \pm 2,45$ Ca^{2+} -Spikes pro 45min nicht unterschied.

Unter Ca^{2+} -freien Bedingungen lag die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes nach WT D39 der scr-Gruppe mit $1,73 \pm 1,16$ pro 45min nicht höher im Vergleich zur $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -*Knockdown*-Gruppe mit $0,25 \pm 0,34$ Ca^{2+} -Spikes pro 45min.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nach WT D39 zwischen der Frequenz der $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -*Knockdown*-Gruppe unter Ca^{2+} -freien Bedingungen gegenüber der scr-Gruppe sowie gegenüber der $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -*Knockdown*-Gruppe jeweils unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen.

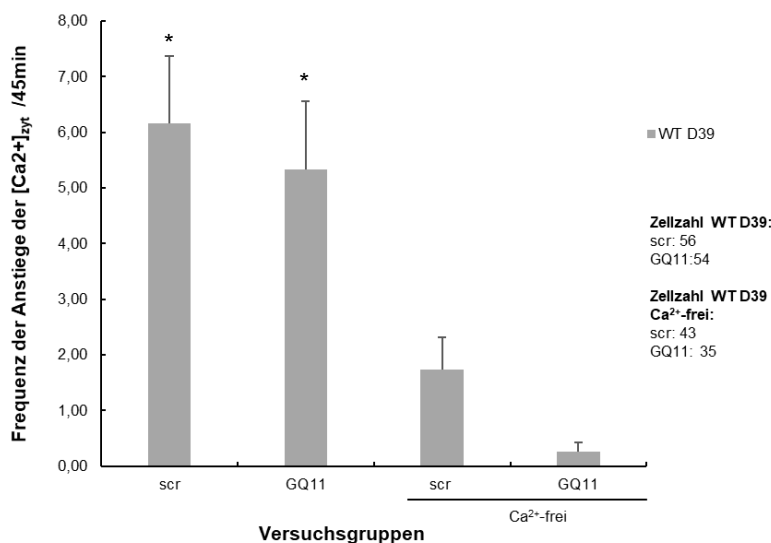


Abb. 40: Frequenz der Ca^{2+} -Spikes/45min nach WT D39 in scr- oder $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ -transfizierten HEK-Zellen unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen, wie dargestellt. Dargestellt als MW \pm SD in %, * = $p < 0,05$ versus $\text{G}\alpha\text{Q}/11$ Ca^{2+} -frei.

Das Verhältnis der Amplitude der scr-Gruppe oder der *GαQ/11-Knockdown*-Gruppe wurde nach WT D39 unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen untersucht (Abb. 41). Das Verhältnis der Amplitude nach WT D39 unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen ergab in der scr-Gruppe $1,56 \pm 0,31$, welches keinen Unterschied zur *GαQ/11-Knockdown*-Gruppe mit $1,55 \pm 0,2$ darstellte.

Nach WT D39 unter Ca^{2+} -freien Bedingungen war das Verhältnis der Amplitude der scr-Gruppe $1,61 \pm 0,41$, welches sich nicht zur *GαQ/11-Knockdown*-Gruppe mit $1,29 \pm 0,24$ unterschied.

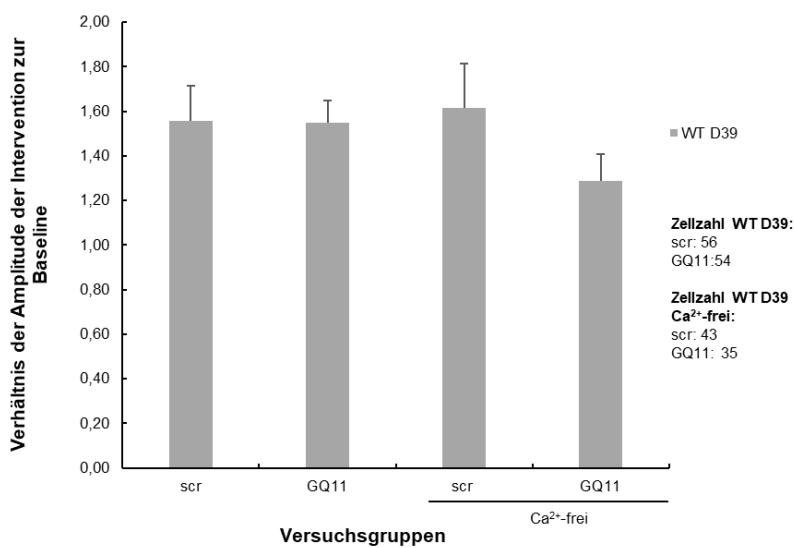


Abb. 41: Verhältnis der Amplitude nach WT D39 in scr- oder *GαQ/11*-transfizierten HEK-Zellen unter Ca^{2+} -haltigen oder Ca^{2+} -freien Bedingungen, wie dargestellt. Dargestellt als MW ± SD in %, * = $p < 0,05$ versus *GαQ/11* Ca^{2+} -frei.

Die relative ATP-Antwort der scr-Gruppe oder der GaQ/11-*Knockdown*-Gruppe wurde nach WT D39 unter Ca²⁺-haltigen oder Ca²⁺-freien Bedingungen untersucht (Abb. 42).

Nach WT D39 unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen unterschied sich die relative ATP-Antwort der scr-Gruppe mit $0,99 \pm 0,02$ Zellen/Versuch nicht gegenüber der GaQ/11-*Knockdown*-Gruppe mit $0,61 \pm 0,38$ Zellen/Versuch. Unter Ca²⁺-freien Bedingungen ergab die relative ATP-Antwort nach WT D39 der scr-Gruppe $0,6 \pm 0,55$ Zellen/Versuch, welches keinen Unterschied zur GaQ/11-*Knockdown*-Gruppe mit $0,5 \pm 0,58$ Zellen/Versuch darstellte.

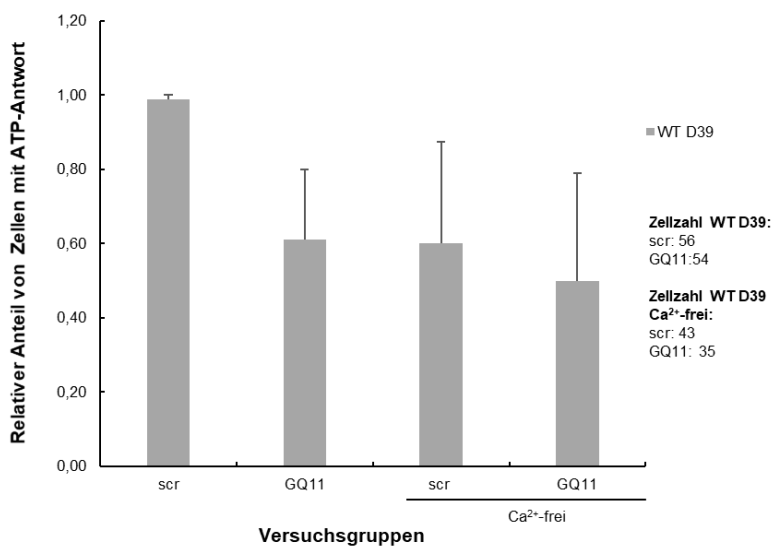


Abb. 42: Relativer Anteil von Zellen mit positiver ATP-Reaktion nach WT D39 in scr- oder GaQ/11-transfizierten HEK-Zellen nach WT D39 unter Ca²⁺-haltigen oder Ca²⁺-freien Bedingungen, wie dargestellt. Dargestellt als MW ± SD in %, * = $p < 0,05$ versus GaQ/11 Ca²⁺-frei.

3.6 Zytotoxizität von *S. pneumoniae*

3.6.1 Abhängigkeit der LDH-Freisetzung vom *S. pneumoniae* ausgelöstem Ca^{2+} -Signal

Die LDH-Freisetzung in Abhängigkeit vom Calciumsignal wurde als Verhältnis der LDH-Freisetzung zur Postivkontrolle nach acht Stunden Inkubationszeit in den HPMEC untersucht. Es wurden die Versuchsgruppen WT D39, WT D39 Δ PLY und die Kontrollgruppe HEPES unter Ca^{2+} -haltigen oder unter Ca^{2+} -freien Bedingungen betrachtet. Für die Ca^{2+} -freien Versuche fand eine Vorinkubation mit dem intrazellulären Ca^{2+} -Chelator 1,2-Bis-Aminophenoxyethan-Acetylsäure (BAPTA) statt. Nach der Vorinkubation mit BAPTA zeigte sich wie in Abb. 43 kein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ nach WT D39. Zum Vergleich ist in der gleichen Abbildung das Ca^{2+} -Signal einer repräsentativen nicht vorbehandelten HPMEC nach WT D39 abgebildet.

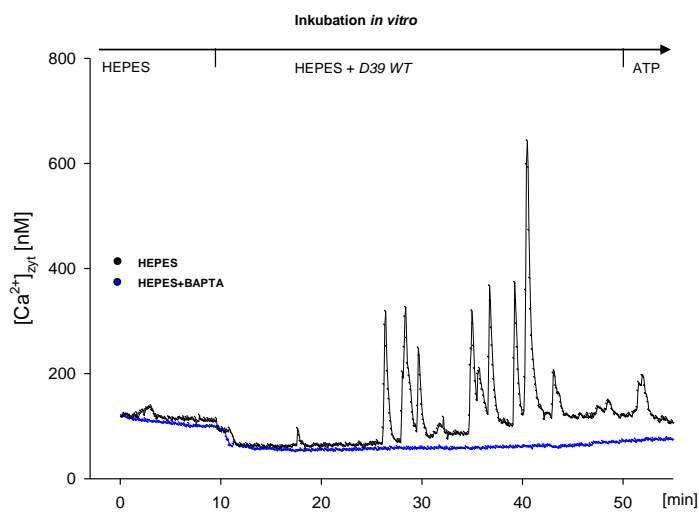


Abb. 43: Beispielhafte Zelle unter Ca^{2+} -haltigen (schwarz) oder unter intrazellulären Ca^{2+} -freien Ausgangsbedingungen unter BAPTA-Inkubation (blau) und nachfolgender Inkubation mit WT D39.

3.6.2 Führt PLY zu einer verstärkten LDH-Freisetzung?

In der folgenden Abb. 44 ist die prozentuale LDH-Freisetzung des durch Pneumokokken vermittelten $[Ca^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieges im Verhältnis zur Positivkontrolle gezeigt.

Nach WT D39 ergab sich ein signifikant höherer Anteil der LDH-Freisetzung mit $49,73\% \pm 9,99\%$ im Vergleich zur Versuchsgruppe HEPES mit $0,16\% \pm 12,72\%$. Die Versuchsgruppe D39 Δ PLY zeigte mit $-5,36\% \pm 9,76\%$ prozentualer LDH-Freisetzung eine signifikant geringe LDH-Freisetzung im Vergleich zum WT D39 (Abb. 44).

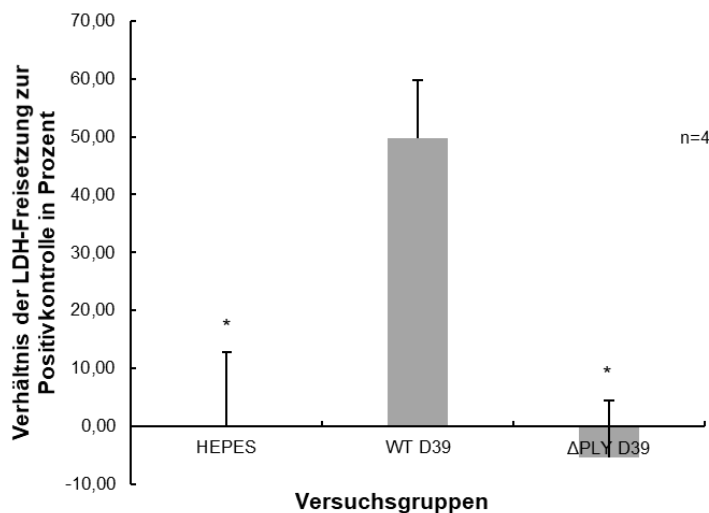


Abb. 44: Prozentuale LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Positivkontrolle nach acht Stunden Inkubationszeit im LDH-Assay (Positivkontrolle nicht dargestellt). Dargestellt als $MW \pm SD$ in %, * = $p < 0,05$ versus WT D39 ohne BAPTA-Vorinkubation.

3.6.3 Reduziert die BAPTA-Vorinkubation die PLY-induzierte LDH-Freisetzung?

Nach der Vorinkubation mit BAPTA erhöhte sich die prozentuale LDH-Freisetzung nach HEPES mit $9,6\% \pm 8,38\%$ im Vergleich zur Versuchsgruppe HEPES ohne BAPTA-Vorinkubation mit $0,16\% \pm 12,72\%$.

Nach WT D39 sowie BAPTA-Vorinkubation reduzierte sich die LDH-Freisetzung mit $21,31\% \pm 19,36\%$ im Vergleich zu WT D39 ohne BAPTA-Vorinkubation mit $49,73\% \pm 9,99\%$.

In der Versuchsgruppe D39 Δ PLY ergab die LDH-Freisetzung mit $-1,93\% \pm 9,83\%$ nach BAPTA-Vorinkubation keinen signifikanten Unterschied zur Versuchsgruppe D39 Δ PLY ohne BAPTA-Vorinkubation mit $-5,36\% \pm 9,76\%$ (Abb. 45).

Die LDH-Freisetzung nach WT D39 und BAPTA-Vorinkubation blieb jedoch wie WT D39 ohne BAPTA-Vorinkubation erhöht im Vergleich zur Versuchsgruppe HEPES ohne BAPTA-Vorinkubation (Abb. 45).

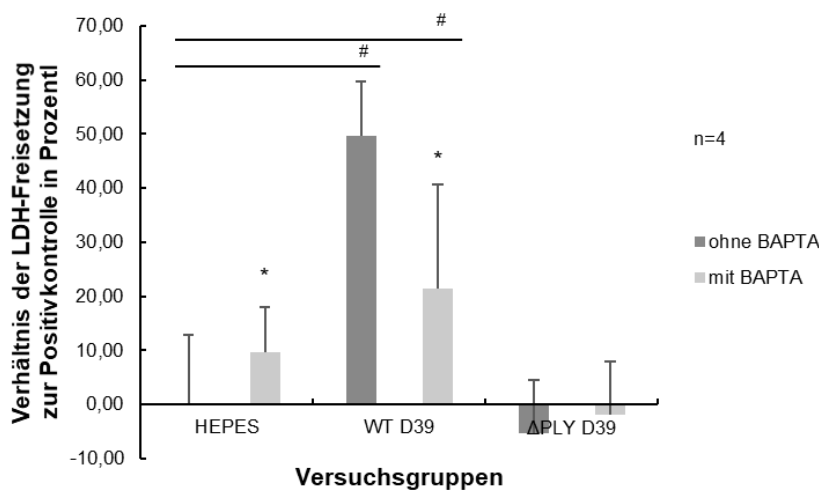


Abb. 45: Prozentuale LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Positivkontrolle nach acht Stunden Inkubationszeit im LDH-Assay mit oder ohne BAPTA-Vorinkubation (Positivkontrolle nicht dargestellt).

Dargestellt als $MW \pm SD$ in %, * = $p < 0,05$ versus jeweilige Kontrollgruppe ohne BAPTA-Vorinkubation. # = $p < 0,05$ versus HEPES ohne BAPTA-Vorinkubation.

(nicht dargestellt: WT D39 mit BAPTA $p < 0,05$ versus D39 Δ PLY mit BAPTA)

3.6.4 Zeitkinetik der Zytotoxizität von *S. pneumoniae* und Abhängigkeit vom Ca²⁺-Signal im Calcein-Ethidiumhomodimer-Vitalitätsassay

Die Zeitkinetik der Zytotoxizität der WT D39 für die HPMEC wurde im Calcein–EthD-III-Vitalitätsassay untersucht. Es wurden die Versuchsgruppen WT D39, D39 Δ PLY und HEPES über einen Inkubationszeitraum von einer, zwei, vier und acht Stunden unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen im Vitalitäts-Assay gemessen. Dieselben Versuchsgruppen wurden ebenfalls unter Ca²⁺-freien Bedingungen durch die Vorinkubation mit BAPTA nach acht Stunden Inkubationszeit untersucht.

Nach acht stündiger Inkubationszeit mit WT D39 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der EthD-III gefärbten nicht vitalen Zellen gegenüber der Gruppe HEPES und gegenüber den D39 Δ PLY sowohl unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen als auch unter Ca²⁺-freien Bedingungen. Der Anstieg nicht vitaler Zellen nach acht Stunden unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen mit oder ohne BAPTA-Vorinkubation.

Die Versuchsgruppen HEPES und die Versuchsgruppe D39 Δ PLY zeigten über den gesamten Inkubationszeitraum keinen signifikanten Anstieg nicht vitaler Zellen (Abb. 46).

Calcein/Ethidiumhomodimer-Viability-Assay

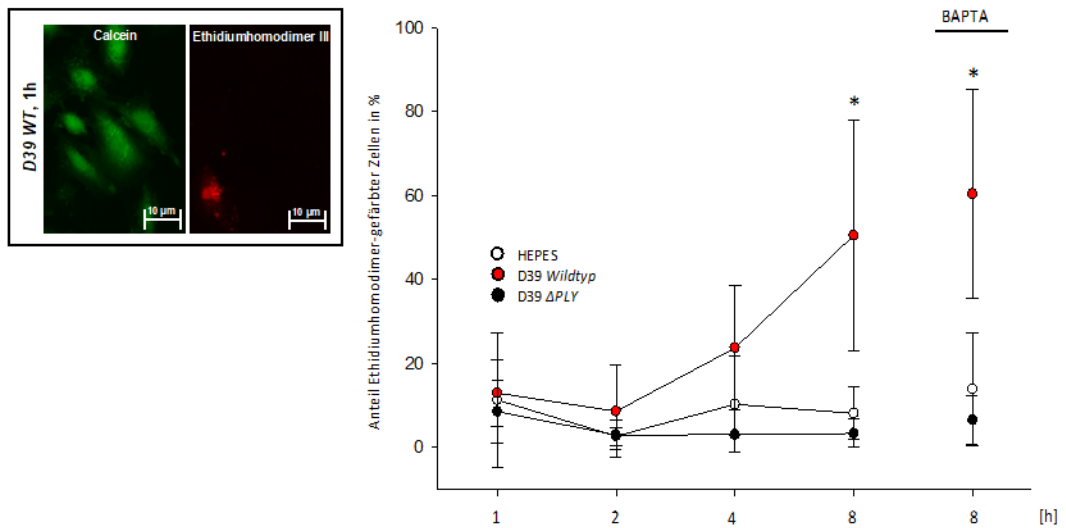


Abb. 46 (links) stellt beispielhafte epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach der Inkubation mit Calcein (grün, vitale Zellen) und EthD-III (rot, nicht vitale Zellen) dar.

Abb. 46 (rechts) zeigt den Anteil an EthD-III-gefärbten Zellen an der Gesamtzellzahl nach Inkubation mit HEPES-Puffer allein oder in Kombination mit WT D39 bzw. D39 ΔPLY für 1,2,4 und 8 Stunden bzw. für 8 Stunden nach Vorbehandlung mit BAPTA in Prozent im Calcein-EthD-III-Vitalitäts-Assay.

MW ± SD; * = $p < 0,05$ vs. HEPES und D39 ΔPLY; je Zeitpunkt und Gruppe $n=6$.

4. Diskussion

Wir stellten uns die Frage, über welche Mechanismen das endotheliale Ca^{2+} -Signal vermittelt wird und haben dazu verschiedene Signaltransduktionswege untersucht. Hierzu soll zunächst die Validität der Daten diskutiert werden.

4.1 Datenvalidierung

4.1.1 Limitationen der Inhibitoren und siRNA

Xestospongin C

Xestospongin C wurde erstmals 1997 von *Gafni et al.* als selektiver membranpermeabler Inhibitor des IP_3R beschrieben (Gafni et al. 1997). Die Wirkung von Xestospongin C wurde als konzentrations- und zeitabhängig beschrieben und zeigte eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) von 358nM und konnte nach 10min Präinkubation in einer Konzentration von 20 μM den bradykinininduzierten Peak in einer Phäochromozytomzelllinie PC12 um 66% gegenüber der Kontrolle reduzieren (Gafni et al. 1997). In permeabilisierten glatten Muskelzellen der Aorta von Ratten wurde gezeigt, dass Xestospongin C zusätzlich zum IP_3R die Ca^{2+} -Aufnahme ins ER inhibierte (De Smet et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von *De Smet et al.* verwendete mit 40-100 μM jedoch deutlich höhere Konzentrationen als die in dieser Arbeit verwendeten 2 μM Xestospongin, sodass dieser Effekt möglicherweise nur konzentrationsbedingt auftrat. Des Weiteren wäre, bei fehlender Aufnahme des Ca^{2+} ins ER, ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ aufgetreten, der sich in den Versuchen dieser Arbeit nicht zeigte.

U73122/ U73343

Die Inhibition der Phospholipase C durch das Aminosteroid U73122 wurde von *Bleasdale et al.* in humanen Thrombozyten und polymorphkernigen Neutrophilen 1990 nachgewiesen (Bleasdale et al. 1990). Die von dieser Arbeitsgruppe verwendete Kontrollsubstanz U73343 zeigte diese Inhibition

nicht. Viele Arbeitsgruppen beschrieben jedoch weitere Effekte der Substanz U73122. Hierzu gehören *Mogami et al.*, die nach Zugabe von U73122 in *patch-clamp*-Versuchen eine direkte Aktivierung von Ionenkanälen in intakten Zellen sowie eine verstärkte Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensiblen Speichern in permeabilisierten Zellen beschrieben (Mogami et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigten sich nach der Inkubation mit U73122 sowie WT D39 vermehrt breitbasige Ca^{2+} -Signale, sodass deren Entstehung durch eine Potenzierung der Ca^{2+} -Freisetzung durch die Substanz U73122 selbst diskutiert werden muss. Um dies auszuschließen, wurden Kontrollversuche nach 60 minütiger Inkubation mit U73122 durchgeführt. Hier zeigten sich in wenigen Versuchen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege, sodass eine Beeinflussung des Ca^{2+} -Signales durch die Substanz U73122 nicht ganz auszuschließen ist.

Für die Kontrollsubstanz U73343 konnte in Hepatozyten nach der Zugabe von Vasopressin ein verminderter Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär ohne Einfluss auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern nachgewiesen werden (Berven et Barrit 1995). Nach der Inkubation mit U73343 und WT D39 in HPMEC änderte sich das Ca^{2+} -Signal nicht gegenüber den Versuchen mit WT D39 allein, sodass von keiner inhibitorischen Wirkung auf den Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär auszugehen ist.

Genistein

Akiyama et al. konnten nachweisen, dass Genistein EGF-abhängige Phosphorylierung inhibiert (Akiyama et al. 1987) und somit zu den Inhibitoren der Tyrosinkinasen gehört, wobei der genaue Inhibitionsmechanismus unklar bleibt. Genistein werden zusätzlich Auswirkungen auf die Endothelfunktion zugesprochen, die unter anderem durch einen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Proteinkinase A abhängigen Signalweg mit Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthetase (eNOS) ausgelöst werden (Liu et al. 2004). Da cAMP auch zur Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen der Plasmamembran führt, könnte das in dieser Arbeit beschriebene Ca^{2+} -Signal nach der Inhibition der Tyrosinkinasen durch Genistein dadurch verfälscht worden sein. Die in dieser Arbeit

dargestellten Versuche zeigten jedoch keine Veränderung des Ca^{2+} -Signales nach der Inhibition von Tyrosinkinasen und Inkubation mit WT D39 im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit WT D39. Kritisch sei an dieser Stelle angemerkt, dass die Inhibitionskontrolle der Tyrosinkinaseinhibitoren schwierig war, da kein passender Agonist zur Inhibitionskontrolle zur Verfügung stand und für den Inhibitor eine von bereits anderen Arbeitsgruppen beschriebene inhibitorisch wirksame Konzentration verwendet wurde (Fleming et al. 1995). Möglich ist daher, dass keine Inhibition der Tyrosinkinasen vorhanden war und diese fälschlicherweise ausgeschlossen wurden.

siRNA

Das angeborene Immunsystem kann Einzel- und Doppelstrang-RNA über die Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs) erkennen, welches über die Aktivierung von *Toll-like receptors* (TLRs) zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine führt (Foged 2012, Heil et al. 2004). Dieser immunstimulatorische Effekt, der auch durch siRNA ausgelöst werden kann, führte dazu, dass von siRNA Sequenzen, beispielsweise gegen das Nukleoprotein oder die Polymerase des Influenzavirus, fälschlicherweise eine spezifische antivirale Aktivität angenommen wurde (Robbins et al. 2008). Der antivirale Effekt der untersuchten siRNA lag nicht an der Herunterregulation eines spezifischen Zielgens, sondern nach Angaben von *Robbins et al.* viel mehr an der Freisetzung inflammatorischer Zytokine, die ebenfalls durch nicht spezifische siRNA ausgelöst wurde. Die verwendeten Kontroll-siRNAs in diesen Versuchen von *Robbins et al.* hatten auf Grund von Modifizierungen wie dem grün fluoreszierenden Protein nur einen abgeschwächten immunstimulatorischen Effekt und führten zu einer Fehlinterpretation (Robbins et al. 2008).

Dies lässt die Frage aufkommen, ob die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse durch die Aktivierung immunmodulatorischer Effekte der siRNA entstanden sein könnten. Da jedoch die verwendete Kontroll-siRNA von Quiagen nach Angaben von *Robbins et al.* ebenfalls einen immunstimulatorischen Effekt besitzt, hätten die immunstimulatorischen Effekte

auch die Kontrollversuche dieser Arbeit beeinflusst und die erhobenen Ergebnisse als ganzes im Sinne eines Systemfehlers verfälscht.

Omidi et al. beschrieben die Herauf- oder Herunterregulation von Genen bei der Transfektion mit kationischen Lipiden durch diese Transfektionsreagenzien (*Omidi et al.* 2003). Das in dieser Arbeit verwendete kationische Lipid Lipofectamin RNAimax wurde diesbezüglich nicht von *Omidi et al.* untersucht. Daher sind Veränderungen der Genexpression durch das Transfektionsreagenz selbst in den Kontroll- und in den Interventionsversuchen in dieser Arbeit nicht sicher auszuschließen.

Validierung des Ca^{2+} -Signales in Reaktion auf Pneumokokken in HEK Zellen

Das bereits in den HPMEC in Reaktion auf *S. pneumoniae* beschriebene Ca^{2+} -Signal aus schmalen und breitbasigen $[Ca^{2+}]_{zyt}$ -Anstiegen war in den HEK-Zellen gleichermaßen vorhanden. Die Untersuchung hinsichtlich der Frequenz, der Amplitude und der ATP-Antwort ergab keine signifikanten Unterschiede. Lediglich der Anteil der reagiblen Zellen war für die HEK-Zellen signifikant größer.

Berridge beschrieb bereits 1993 für den *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release* (CICR), dass die Variationen in der Frequenz und Amplitude durch Variationen in der Sensitivität des IP_3R entstehen könnten (*Berridge* 1993). So wäre es denkbar, dass durch eine höhere Sensitivität des IP_3R in den HEK-Zellen mehr Zellen bei einer bestimmten Konzentration eines Stimulus reagieren.

Weitere Optionen wären die unterschiedlich starke Expression von am Ca^{2+} -Signal beteiligten Akteuren oder höhere $[Ca^{2+}]_{ER}$ (*Berridge* 1993) bzw. höhere $[Ca^{2+}]$ der anderen Ca^{2+} -speichernden Organellen, die bereits bei geringeren Stimuluskonzentrationen zu einer Reaktion führen.

Für Keratinozyten wurde von *Gniadecki et Bang* beschrieben, dass diese in Phasen hoher mitotischer Aktivität vermehrt *Lipid rafts* exprimieren (*Gniadecki et Bang* 2003), in denen Rezeptoren verschiedener Signalwege exprimiert werden. Eine höhere mitotische Aktivität der HEK-Zellen mit erhöhter Expression von *Lipid rafts* sowie vermehrter Aktivierung der dort lokalisierten

Rezeptoren könnte einen höheren Anteil reagibler Zellen der HEK gegenüber den HPMEC erklären.

Da die HEK-Zellen insgesamt mit einem mit den HPMEC vergleichbaren Ca^{2+} -Signal nach WT D39 reagierten, konnten die HEK-Zellen in den Transfektionsversuchen verwendet werden.

4.2 Das Ca²⁺-Signal entsteht durch Porenbildung

Um die Abhängigkeit des Ca²⁺-Signales von der Porenbildung zu überprüfen, wurden neben dem PLY WT die PLY Mutanten PLY W433F (porenbildende Aktivität erst ab 500ng/ml (entsprechend 1% porenbildende Aktivität)) und PLY C428G (<0,1% porenbildende Aktivität) untersucht. Diese PLY Mutanten zeigten kein Ca²⁺-Signal in nicht porenbildenden Konzentrationen. Erst als PLY W433F in einer Konzentration an der Grenze zur hämolytischen Aktivität eingesetzt wurde, zeigte sich erneut ein Ca²⁺-Signal. Dementsprechend ist das beobachtete intra- und extrazelluläre Ca²⁺-Signal abhängig von der Porenbildung.

Passend zu diesen Ergebnissen wies Förtsch eine Depolarisation der Zellmembran mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Bis(1,3-dibutylbarbiturate)trimethine oxonol* (Dibac4(3)) nach der Zugabe von PLY WT in nicht lytischer Konzentration nach. Nach der Zugabe nicht porenbildender PLY Mutanten blieb die Depolarisation an der Zellmembran trotz stattfindender Membranbindung aus. Als Ursache der Depolarisation durch den PLY WT wurde hier die Bildung von Mikroporen diskutiert (Förtsch 2012). Dibac4(3) gelangt bei Depolarisation ins Zytosol und zeigt dann eine höhere Fluoreszintensität (Förtsch 2012). Kritisch angemerkt sei an dieser Stelle jedoch, dass der Fluoreszenzfarbstoff Dibac4(3) auch durch die Mikroporen und nicht über die Depolarisation in die Zelle gelangt sein könnte und damit gar keine Depolarisation stattfinden müsste.

In Patch clamp Versuchen in *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen von *Ei-Rachkidy et al.* zeigte sich nach einem initial ausgeprägten Anstieg der Leitfähigkeit durch die Poren des PLY WT eine rapide Abnahme der Leitfähigkeit (Ei-Rachkidy et al. 2008), die zu dem Ca²⁺-Signal der Ca²⁺-Imaging-Versuche dieser Arbeit passt. CHO Zellen haben wenig intrinsische Kanäle, sodass die Änderung der Leitfähigkeit nach Angaben der Arbeitsgruppe durch die Porenbildung entstanden war. Außerdem beschrieb *Rachkidy et al.* seltenere Erhöhungen der Leitfähigkeit nach Zugabe von PLY W433F im Vergleich zum PLY WT. Ebenfalls wurden von der Porenbildung abhängige Eigenschaften wie die Interaktionen von PLY mit Aktin, dessen Polymerisierung

und nachfolgende Formveränderungen der Zelle beschrieben, die bei den nicht porenbildenden PLY Mutanten nicht stattfand (Hupp et al. 2013).

Ein interessantes Ergebnis der Versuche mit den verwendeten PLY Mutanten war, dass der PLY WT auch unter extrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen ein Ca^{2+} -Signal auslöste, während dies bei PLY W433F in bereits hämolytischer Konzentration nicht auftrat.

Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass das beobachtete Ca^{2+} -Signal nach Inkubation mit PLY W433F unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen von extrazellulär stammt und PLY W433F keine intrazelluläre Signalkaskade auslöst. Dies könnte damit begründet sein, dass die strukturelle Veränderung des PLY W433F nicht nur relevant für die Porenbildung, sondern auch für eine Rezeptorbindung und damit die Auslösung der beobachteten intrazellulären Signalkaskade wäre. In Versuchen von *Förtsch* wurde zusätzlich eine verminderte Membranbindung für PLY W433F gegenüber PLY WT nachgewiesen, welche sich über eine erhöhte Konzentration des PLY W433F ausgleichen ließ (Förtsch 2012). In den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen wurde die [PLY W433F] zur Konzentration in der eine Porenbildung stattfand angehoben, sodass ein fehlendes intrazelluläres Ca^{2+} -Signal durch verminderte Zellmembranbindung nicht anzunehmen ist.

Eine andere Ursache könnte die Auslösung der intrazellulären Signalkaskade durch die Endozytose von PLY WT sein, die in Astrozyten nach 3-5min Inkubationszeit beschrieben wurde (Förtsch 2012). Denn PLY W433F zeigte in den Versuchen von *Förtsch* eine Bindung an die Zellmembran, wurde jedoch nicht internalisiert. Für das porenbildende Streptolysin wurde ebenso eine ATP und Ca^{2+} -abhängige Endozytose der Poren unter anderem in HEK-Zellen beschrieben, die ähnlich der PLY-WT Ca^{2+} -Imaging Versuche transiente $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege zeigten, die innerhalb von weniger als 30sek wieder die Konzentration der Baseline erreichten (Idone et al. 2008).

Zu diskutieren ist außerdem eine mögliche verminderte porenbildende Aktivität des PLY W433F durch die Reduktion der $[\text{Ca}^{2+}]$ des extrazellulären Mediums, welches ein fehlendes intrazelluläres Ca^{2+} -Signal erklären würde. *Förtsch et al.* wiesen jedoch eine erhöhte Endozytose und vermehrte LDH-Freisetzung in

Ca²⁺-freien extrazellulären Medium nach (Frötsch 2012). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Beeinflussung der Leitfähigkeit der PLY Poren durch die extrazelluläre [Ca²⁺] nachweisen. Eine Reduktion der Leitfähigkeit der PLY-Poren durch den Anstieg der extrazellulären [Ca²⁺] wurde insbesondere für den PLY WT und auch für PLY W433F beschrieben (Korchev et al. 1992). *Frötsch et al.* konnten hingegen keine Veränderung der Leitfähigkeit der PLY-Poren nach Veränderung der extrazellulären [Ca²⁺] von 0-2mM nachweisen (Frötsch 2012, Wippel et al. 2011).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass PLY WT auch eine Porenbildung an der zytosolischen Seite der Zellmembran auslöst (El-Rachkidy et al. 2008). Nach diesen Ergebnissen von *El-Rachkidy et al.* wäre lediglich die Cholesterolbindung und kein Rezeptor auf der äußeren Zellmembran, wie bei dem cholesterinabhängigen Zytolysin Intermedilysin, das primär an CD59 bindet (Giddings et al. 2004), notwendig. Es sei denn, der Rezeptor wäre sowohl auf extrazellulärer und zytosolischer Seite der Plasmamembran vorhanden.

Umso mehr stellt sich die Frage nach der Auslösung der intrazellulären Signalkaskade. Da diese von der Porenbildung abhängig ist, wäre eine durch die Porenbildung stattfindende Konformitätsänderung der Plasmamembran und Aktivierung von Rezeptoren z.B. in den cholesterolreichen *Lipid rafts* möglich. Die Bindung an *Lipid rafts* wurde für PLY WT und eine andere porenbildende PLY Mutante in humanen Epithelzellen der Kornea nachgewiesen, während nicht porenbildende Mutanten nicht spezifisch in den *Lipid rafts* lokalisiert waren (Taylor et al. 2013). Für das cholesterinabhängige Zytolysin Listerolysin wurde beschrieben, dass abhängig von dessen Aggregatbildung eine Cluster-Bildung der *Lipid rafts* stattfindet, die auch ohne Porenbildung zur Aktivierung von Tyrosinkinasen führt (Gekara et al. 2005). Dies deutet auf einen wichtigen Einfluss der *Lipid rafts* für das durch PLY-Poren entstehende intrazelluläre Ca²⁺-Signal hin, dessen Entstehung im Folgenden detailliert besprochen wird.

4.3 Der Signalweg der intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiege in Reaktion auf inflammatorische Agonisten wie Histamin wurden über die Freisetzung aus dem ER durch IP_3 und eine Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bereits von *Tiruppathi et al.* in Endothelzellen beschrieben (Tiruppathi et al. 2003).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in dieser Arbeit vorausgehenden Versuchen bereits nachweisen, dass das Ca^{2+} -Signal aus einem extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom und einer intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER besteht. Eine signifikante Beteiligung der Mitochondrien oder der Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran konnte von der Arbeitsgruppe jeweils über die Inhibitoren Rotenone und Gadolinium in vorherigen Versuchen ausgeschlossen werden.

Wie jedoch führt PLY zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung in den durchgeführten Versuchen?

4.3.1 Wird das Ca^{2+} -Signal durch IP_3 -R und die PLC vermittelt?

Nach der Inhibition des IP_3 -R mit Xestospongin C und der Inkubation mit WT D39 waren vermehrt breitbasige Ca^{2+} -Signale oder das Ausbleiben des Ca^{2+} -Signales zu erkennen.

Der Anteil der reagiblen Zellen, der Frequenz und der Amplitude nach Xestospongin C und WT D39 zeigte sich im Vergleich zu HEPES und WT D39 reduziert, dies war jedoch bei der geringen n-Zahl nicht signifikant. Nach Xestospongin C allein zeigte sich keine ATP-Antwort, während diese nach Xestospongin C und WT D39 in $0,58 \pm 0,29$ Zellen/Versuch erneut auftrat. Dies könnte durch eine Reduktion der inhibitorischen Wirkung von Xestospongin C durch den WT D39 entstehen. Auch nach U73122 mit WT D39 zeigte sich eine ATP-Antwort, die bei U73122 allein nicht auftrat. Diese erneute Reaktion auf ATP nach WT D39 bei vorher nachgewiesener Inhibition sowohl bei Xestospongin C als auch bei U73122, könnte ebenso auf einen veränderten Aktivierungsmechanismen des ER nach erfolgter PLY-Porenbildung hinweisen.

Von der Arbeitsgruppe wurde bereits beschrieben, dass der Ca^{2+} -Einstrom von intrazellulär zu schmalen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstiegen führte, welches die Beteiligung des

IP₃-R an diesem Ca²⁺-Einstrom vermuten ließ und in den Versuchen mit Xestospongin bestätigt wurde. Diese These wurde zusätzlich durch ein vermehrt breitbasiges Ca²⁺-Signal nach der Inhibition der PLC mit U73122 unter der Inkubation mit WT D39 unterstützt. Nach U73122 und WT D39 zeigte sich ein tendenziell höherer Anteil reagibler Zellen sowie eine höhere Amplitude zwischen Baseline und Intervention als nach HEPES und WT D39. Die Frequenz nach U73122 und WT D39 war jedoch tendenziell geringer als bei HEPES und WT D39. Diese Ergebnisse waren nicht signifikant. Auch in den Kontrollversuchen zeigten sich vereinzelte unspezifische [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiege nach U73122. Daher muss diskutiert werden, dass die Substanz U73122 an sich bereits zu einer Veränderung des Calciumsignals führte. Dies könnte den tendenziell höheren Anteil reagibler Zellen gegenüber HEPES und WT D39 erklären.

Zusätzlich war das Verhältnis zwischen Amplitude und Baseline nach U73122 und WT D39 höher als bei HEPES und WT D39. Es wäre möglich, dass nach der Inhibition der PLC durch U73122 das Ca²⁺, welches über die PLY-Poren einströmt, nicht mehr in intrazelluläre Organellen aufgenommen wird oder die Endozytose bzw. der Verschluss der PLY-Pore nicht mehr funktioniert. Dies würde durch den Konzentrationsgradienten zu einem anhaltendem Einstrom von Ca²⁺ über die PLY-Pore nach intrazellulär und zu einem Anstieg auf eine höhere [Ca²⁺]_{zyt} führen. Die tendenziell niedrigere Frequenz nach U73122 und WT D39 gegenüber HEPES und WT D39 könnte durch die bereits höhere [Ca²⁺]_{zyt} mit nur noch wenig erkennbaren Ca²⁺-Spikes erklärt sein.

Der Anstieg auf eine höhere [Ca²⁺]_{zyt} ließ sich jedoch nicht für Xestospongin C darstellen, sodass entweder die PLC eine besondere Stellung bei der Ca²⁺-Aufnahme oder der Endozytose der PLY-Pore einnimmt oder doch eine unspezifische Wirkung der Substanz U73122 diskutiert werden muss. Letztlich müsste die n-Zahl der Versuche für eine signifikante Aussage erhöht werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass sowohl der IP₃-R als auch die PLC an der Generierung des Ca²⁺-Signales beteiligt sind, dies soll in weiteren Versuchen bestätigt werden.

4.3.2 Entsteht das Ca²⁺-Signal durch Tyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren?

Die Aktivierung der PLC über Tyrosinkinasen wurde ausgeschlossen, da sich nach der Inhibition der Tyrosinkinasen weiterhin ein Ca²⁺-Signal aus schmalen und breitbasigen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiegen zeigte. Dementsprechend sind Tyrosinkinasen wahrscheinlich nicht an der Generierung des beobachteten Ca²⁺-Signales beteiligt.

Um eine mögliche Beteiligung der GPCR am Ca²⁺-Signal zu untersuchen, wurde ein siRNA-*Knockdown* der G-Proteine GαQ und Gα11 in HEK-Zellen durchgeführt, nachdem die Expression dieser G-Proteine in HEK-Zellen und HPMEC nachgewiesen worden war. Die Transkription auf RNA- und Translation auf Proteinebene wurde bestätigt. Dabei deutete sich auf RNA-Ebene eine Abhängigkeit der Expression des Gα11 vom GαQ an, da nach dem siRNA-*Knockdown* des GαQ auch die RNA-Expression des Gα11 signifikant reduziert war. Dies ließ sich jedoch auf Proteinebene nicht bestätigen. Zusätzlich wurde die siRNA spezifisch fluoreszenzmarkiert und in den Ca²⁺-Imaging Versuchen nur doppeltransfizierte Zellen ausgewertet. Die ATP-Reaktion war in 50-61% der doppeltransfizierten HEK-Zellen positiv, jedoch deutlich abgeschwächt, sodass diese Zellen ebenfalls in die Auswertung eingingen, da ein vollständiger *Knockdown* nicht erreicht werden konnte.

Während unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen ein Ca²⁺-Signal sowohl in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe als auch in der scr-siRNA-Gruppe ähnlich häufig auftrat (Anteil reagibler Zellen: scr-siRNA 93,8%, GαQ/11-*Knockdowns* 79,7%), war der Anteil reagibler Zellen unter Ca²⁺-freien Bedingungen in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe (GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe 6,8%) signifikant geringer gegenüber der scr-Gruppe unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen. Die Frequenz der Ca²⁺-Signale war in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe unter Ca²⁺-freien Bedingungen signifikant niedriger im Vergleich zur GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe oder zur scr-siRNA-Gruppe unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen.

Die geringere Anzahl reagibler Zellen und die niedrigere Frequenz in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe unter Ca²⁺-freien Bedingungen bestätigt die Beteiligung der untersuchten G-Proteine an der Generierung der intrazellulären

Ca²⁺-Freisetzung. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass die intrazelluläre Ca²⁺-Freisetzung in Reaktion auf PLY aktiv über die G-Proteine GαQ/11 entsteht und über die Aktivierung der PLC und des IP₃-R erfolgt.

Es lässt sich schlussfolgern, dass das unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen entstehende Ca²⁺-Signal in der GαQ/11-*Knockdown*-Gruppe größtenteils von extrazellulär generiert wird. Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, lässt sich vermuten, dass das GαQ/11-abhängige Signal durch die Porenbildung und ggf. Endozytose der Poren des PLY WT entsteht. Denn bereits in den Versuchen der PLY Mutanten mit verminderter porenbildender Aktivität wurde gezeigt, dass die Entstehung des Ca²⁺-Signals abhängig von der Porenbildung ist und die These aufgestellt, dass das intrazelluläre Ca²⁺-Signal abhängig von der Endozytose der PLY-Pore ist.

Des Weiteren wäre es möglich, dass PLY WT direkt an einen Rezeptor bindet, welches PLY W433F gegebenenfalls durch seinen fehlenden Tryptophanrest nicht möglich wäre. Dies könnte zu einem fehlenden intrazellulären Ca²⁺-Signal des PLY W433F führen. Der fehlende Tryptophanrest ist für die Cholesterolbindung wichtig, eine zusätzliche Bindung an einen Rezeptor ist bisher noch nicht bekannt. *Malley et al.* beschrieben lediglich eine direkte Interaktion zwischen PLY und TLR4 (*Malley et al. 2003*). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass TLR2 und der C-Typ Lektinrezeptor *Mincle* *S. pneumoniae* erkennen, beide haben jedoch nur eine untergeordnete Bedeutung in der Immunantwort auf *S. pneumoniae* (*Knapp et al. 2004*, *Rabes et al. 2015*). *Shewell et al.* zeigten an Erythrozyten, dass vor der Bindung an Cholesterol eine Bindung an das Sialyl Lewis X Antigen des Lewis Blutgruppensystems stattfindet (*Shewell et al. 2014*). Hierbei würde es sich allerdings lediglich um einen Rezeptor auf Erythrozyten handeln.

Die Aktivierung der GαQ/11 in *Lipid rafts* über Konformitätsänderung der Plasmamembran durch die PLY-Pore wäre möglich und bleibt in nachfolgenden Versuchen zu klären. Für den Oxytocin-Rezeptor und den Cholezystokinin-Rezeptor, die beide zu den GPCR gehören, wurde gezeigt, dass ein höherer Cholesterolgehalt in der Plasmamembran ihre Ligandenbindungsaffinität durch spezifische molekulare Interaktion (Oxytocin-Rezeptor) bzw. über die

Veränderung der Fluidität der Plasmamembran (Cholezystokinin-Rezeptor) verstärken kann (Gimpl et al. 1997). Da PLY an Cholesterol bindet, dass besonders häufig in den *Lipid rafts* vorkommt, könnten dort die GPCR aktiviert werden, da sie durch den hohen Cholesterolgehalt in den *Lipid rafts* eine höhere Ligandenbindungsaffinität besitzen. Allerdings zeigten nicht alle untersuchten GPCR eine Zunahme der Affinität abhängig vom Cholesterolgehalt der Plasmamembran (Gimpl et al. 1997, Chini et al. 2004).

Eine weitere mögliche Aktivierung der GPCR wäre durch den Austritt von ATP (Molekülgröße 0,507kDa (National Center for Biotechnology Information 2016a) durch die PLY-Poren ins extrazelluläre Medium und die Aktivierung dieser Rezeptoren von extrazellulär. Dies wäre in Einklang mit einem ausbleibenden Ca^{2+} -Signal bei fehlender Porenbildung. Dies wurde von der Arbeitsgruppe in dieser Arbeit nachfolgenden Versuchen untersucht und pharmakologisch ausgeschlossen. Der Aktivierungsmechanismus der GPCR bleibt Bestandteil zukünftiger Versuche.

4.4 Das Ca²⁺-Signal stellt kein Todessignal der Zelle dar

S. pneumoniae besitzt, wie bereits beschrieben, das porenbildende Zytotoxin PLY und kann konzentrationsabhängig zur Apoptose und Zelllyse führen. Es wurden zwei verschiedene Vitalitätsassays durchgeführt, um zu untersuchen, ob das Ca²⁺-Signal einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat und ob es in vitalen Zellen stattfindet oder diese bereits durch Zelllyse geschädigt wurden. Im LDH-Assay und im Calcein-EthD-III-Vitalitätsassay zeigten sich signifikante Anstiege der LDH-freisetzenden bzw. der nicht vitalen Zellen erst nach acht Stunden in der Gruppe WT D39 gegenüber den Gruppen HEPES und D39 ΔPLY unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen. In beiden Vitalitätsassays wurden intrazellulär Ca²⁺-freie Bedingungen durch die Vorinkubation mit BAPTA erreicht. Im Calcein-EthD-III-Vitalitätsassay stieg die Anzahl nicht vitaler Zellen unter intrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen ebenfalls nach acht Stunden in der Gruppe WT D39 signifikant gegenüber den Gruppen HEPES und D39 ΔPLY an. Im LDH-Assay zeigte sich unter intrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen ein signifikanter Anstieg der LDH-Freisetzung der Gruppe WT D39 lediglich gegenüber der Gruppe D39 ΔPLY, nicht jedoch gegenüber der Gruppe HEPES. Die Gruppe HEPES zeigte jedoch bereits unter intrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen einen signifikanten Anstieg der LDH-Freisetzung gegenüber der Gruppe HEPES unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen. Dies deutet darauf hin, dass bereits die intrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen oder die Substanz BAPTA an sich toxisch für die Zelle sein könnten. Umso deutlicher ist daher die signifikante Reduktion der LDH-Freisetzung nach WT D39 unter intrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen gegenüber WT D39 unter intrazellulär Ca²⁺-haltigen Bedingungen. Dies deutet auf einen toxischen Aspekt zu hoher intrazellulärer [Ca²⁺] hin.

Im Calcein-EthD-III-Vitalitätsassay bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl nicht vitaler Zellen, wenn dieselben Versuchsgruppen unter Ca²⁺-freien versus Ca²⁺-haltigen Bedingungen verglichen wurden.

Die Ergebnisse des LDH-Assay deuten auf einen toxischen Aspekt zu hoher intrazellulärer [Ca²⁺] hin, der sich im Calcein-EthD-III-Vitalitätsassay nicht bestätigte. *Wolfmeier et al.* konnten für die Reperatur der PLY-Poren die

Notwendigkeit eines Ca^{2+} -Einstroms von extrazellulär mit nachfolgender intrazellulärer Sequestrierung nachweisen (Wolfmeier et al. 2014). Dies würde zu den Daten des LDH-Assays passen, in denen die Reduktion der intrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ zu verminderter LDH-Freisetzung, gegebenenfalls durch erfolgte Reperatur der PLY-Pore, führte.

Rückblickend sind die verwendeten Methoden kritisch zu bewerten, da beide als Vitalitätsnachweis auf dem Bestehen einer intakten Zellmembran basieren. Trypanblau wird ebenso wie EthD-III als Vitalitätsmarker verwendet, da es intakte Zellmembranen aufgrund seiner negativen Ladung nicht passieren kann. *Tran et al.* zeigten jedoch, dass Trypanblau (Molekülgröße 0,960kDa) die Poren des porenbildenden Toxins von *Bacillus cereus* (Porengröße 1,5-4,6nm (Andreeva et al. 2007)) in vitalen Zellen passieren kann (Tran et al. 2011). Nachdem die Inkubation des Toxins in den Versuchen von *Tran et al.* beendet wurde, zeigten die Zellen ein erneutes Zellwachstum, welches als Vitalitätsmarker gewertet wurde.

EthD-III hat eine Molekülgröße von 0,856kDa (National Center for Biotechnology Information 2016b) und kann die von PLY WT gebildeten Poren (1-2nm - 30nm) vermutlich ebenfalls passieren. Denn Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 1,3kDa haben einen *Stokes Radius* um 1nm, während Moleküle mit einem Molekulargewicht bis 2000kDa einen Stokes Radius um 28nm besitzen (Pakhomov et al. 2010). Da die LDH ein Molekulargewicht von 135kDa (Harper et al. 2013) hat, kann diese erst wesentlich größere Poren passieren als EthD-III. In beiden Assays war der Anteil nicht vitaler Zellen der Gruppe WT D39 unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen vergleichbar (im LDH-Assay $49,73\% \pm 9,99\%$ und im Calcein-EthD-III $50,53 \pm 27,43\%$), während sich der Anteil nicht vitaler Zellen unter Ca^{2+} -freien Bedingungen mit $21,31\% \pm 19,36\%$ im LDH-Assay und $60,40 \pm 24,85\%$ im Calcein-Ethdiumhomodimer-Assay deutlich unterschied. Versucht man die ähnlichen Ergebnisse der Assays unter Ca^{2+} -haltigen Bedingungen und unterschiedlichen Ergebnisse unter intrazellulär Ca^{2+} -freien Bedingungen anhand der unterschiedlichen Molekülgröße der verwendeten Substanzen zu erklären, könnte dies auf eine Bildung von kleineren Poren unter Ca^{2+} -freien Bedingungen hindeuten. Dies könnte den

unter Ca^{2+} -freien Bedingungen höheren Anteil nicht vitaler Zellen im Calcein-EthD-III-Assay im Vergleich zum LDH-Assay erklären.

Es bleibt zu klären, ob mit den durchgeführten Assays die Porenbildung (ggf. Mikroporen) oder der Anteil nicht vitaler Zellen gemessen wurde. Dazu könnte beispielsweise in einem neuen Versuchsansatz das Zellwachstum nach dem Ende der Inkubation mit WT D39 gemessen werden.

Da EthD-III die Zellen erst nach acht Stunden signifikant gegenüber den Kontrollgruppen anfärbte, das beobachtete Ca^{2+} -Signal jedoch mit einer Latenz von 3,25min in den HEK-Zellen bis 19,74min in den HPMEC auftrat, ist dieses Signal sicherlich nicht mit direkter Zellyse verbunden.

Außerdem ließ sich die vorhandene Vitalität der Zellen durch die Calceinfärbung bestätigen, da diese unabhängig von der Porenbildung ist. Außerdem blieb das Calcein mit einer Molekülgröße von 0,623kDa in den Zellen und entwich nicht über die durch PLY gebildeten Mikroporen aus den Zellen. Es ist also zu schlussfolgern, dass das in den Ca^{2+} -Imaging Versuchen beschriebene Ca^{2+} -Signal kein Todessignal darstellt.

Andere Arbeitsgruppen führten ähnliche Versuche mit höheren [PLY] durch. In höheren Konzentrationen führte PLY zu einem schnellen Ca^{2+} -Einstrom und zur Zellyse (Wolfmeier et al 2014). In einem von *Iliev et al.* durchgeführten LDH Assay konnten bei [PLY] von 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – 0,35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bereits nach 8-12 Minuten PLY induzierte Zellyse gemessen werden (Iliev et al. 2007). Für die Permeabilisation von HEK-Zellen wurden $\geq 0,25\mu\text{g}/\text{ml}$ PLY WT beschrieben (Wolfmeier et al 2014). Da in dieser Arbeit in allen Versuchsgruppen $5 \cdot 10^5 \text{CFU}/\text{ml}$ WT D39 entsprechend der Reaktion bei 5ng/ml PLY WT verwendet wurden, ist es unwahrscheinlich, dass das beschriebene Ca^{2+} -Signal durch Zellyse entstand.

Wippel et Förtsch beschrieben für die extrazelluläre [Ca^{2+}] in Astrozyten eine mögliche protektive Funktion, da die Ca^{2+} -Depletion des Mediums zu einem Anstieg der Zytotoxizität durch PLY WT im LDH-Assay führte (Förtsch 2012, Wippel et al. 2011). Die erhöhte Zytotoxizität wurde in den Versuchen von

Wippel et Förtsch auf eine verstärkte Bindung von PLY WT unter extrazellulär Ca^{2+} freien Bedingungen, ggf. durch Erhöhung der Fluidität der Plasmamembran, zurückgeführt. Die extrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ wurde in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vitalitätsassays nicht untersucht und sollte in zukünftigen Assays eingeschlossen werden.

4.5 Entstehung und Terminierung des extrazellulären Ca²⁺-Einstroms – Ausblick auf zukünftige Versuche

Die Arbeitsgruppe konnte bereits in den Vorversuchen einen Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär nachweisen. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einstrom von extrazellulär abhängig von der porenbildenden Aktivität des PLY ist. Es konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, wodurch der Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär entsteht und wodurch er beendet wird. Über den Konzentrationsgradient zwischen dem Extra- und dem Intrazellularraum kommt es nach der Porenbildung zu einem Ca²⁺-Einstrom über die PLY-Pore. Denn die extrazelluläre [Ca²⁺] beträgt 1mM im HEPES-Puffer dieser Arbeit, während sich die intrazelluläre [Ca²⁺] auf lediglich ~100nM beläuft (Wolfmeier et al. 2014). Es stellt sich die Frage, wie sich der erneute Abfall der [Ca²⁺]_{zyt} auf das Niveau der Baseline erklärt, wenn ein kontinuierlicher Ca²⁺-Einstrom über die PLY-Pore bestehen bleibt.

Dies könnte durch die Ca²⁺-abhängige Endozytose von PLY-Poren erklärt werden (Wolfmeier et al. 2014). Die Arbeitsgruppe *Wolfmeier et al.* beschrieb, dass bei [PLY] von 0,25-2µg/ml 60% der untersuchten HEK-Zellen zunächst permeabilisiert werden. Ihre Läsionen konnten sie jedoch über vom extrazellulären Ca²⁺-abhängige Endozytose reparieren (auch für weitere Zelltypen gezeigt, Wolfmeier et al. 2014). Dies erklärt auch die beschriebene erhöhte Zytotoxizität von PLY in Ca²⁺-freien Medium (Förtsch 2012, Wippel et al. 2011), da unter diesen Bedingungen der Reperaturmechanismus der Plasmamembran eingeschränkt wäre. Für die Reparatur der Poren ist ebenso die Ca²⁺-Sequestration in intrazelluläre Organellen notwendig um, einen exzessiven [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg zu verhindern (Wolfmeier et al. 2014). Die Arbeitsgruppe von *Wolfmeier et al.* vermutet, dass dieses bei der Porenbildung und Reparatur entstehende Ca²⁺-Signal zur Zytokinproduktion und somit zur Pathogenerkennung sowie Immunsystemaktivierung des Wirtes führt und unphysiologisch hohe [Ca²⁺]_{zyt} überschießende Reaktionen des Immunsystems erklären könnten. In Astrozyten wurde die Endozytose von 0,2µg/ml PLY WT bereits nach 3-5min beschrieben (Förtsch 2012). Das in dieser Arbeit beschriebene Ca²⁺-Signal trat in HEK-Zellen nach 3,25min ± 4,19min, sodass

es zeitlich ebenfalls durch eine Endozytose der PLY-Poren bedingt sein könnte und den beobachteten Ca^{2+} -Einstrom von extrazellulär erklären würde. Jedoch verwendeten wir nur $5 \cdot 10^5$ CFU WT D39, welches in anderen Versuchen der Reaktion von 5ng/ml PLY WT entsprach. In dieser [PLY] wäre nach *Wolfmeier et al.* keine Permeabilisierung der Zellen zu erwarten. Dies könnte erklären, dass das Ca^{2+} -Signal in HPMEC erst nach $19,74\text{min} \pm 8,94\text{min}$ auftrat. In dem von uns durchgeführten LDH-Assay trat ebenfalls erst ab acht Stunden eine erhöhte Zytotoxizität auf. Entgegengesetzt der Daten von *Wolfmeier et al.* wäre es möglich, dass in unserem Zellmodell und der untersuchten [PLY] bereits wenige Poren oder die bereits beschriebenen Mikroporen gebildet werden und die Zelle sich über die Endozytose dieser frühen Poren vor der Zelllyse schützt. Um dies zu verifizieren, müsste die Endozytose von PLY-Poren mit den in dieser Arbeit verwendeten Toxin-Konzentrationen überprüft werden.

Atanassoff et al. beschrieben für Streptolysin (SLO) eine vom extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom abhängige Reperatur der SLO-Poren in HEK 293 Zellen (*Atanassoff et al. 2014*). Der lokalisierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ führt sowohl bei SLO als auch PLY zur Rekrutierung von Annexinen, die zunächst über die Bindung an Phosphatidylserin der Plasmamembran eine Barriere zwischen Extra- und intrazellulärem Milieu bilden (*Clogging*) (*Wolfmeier et al 2014, McNeil et al. 2006, Etxaniz et al. 2018*). Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ könnte zur Aktivierung der calciumabhängigen Protease Calpain mit nachfolgender Destabilisierung des Zytoskeletts führen (*Atanassoff et al. 2014*). Dies erleichtert das im Anschluss stattfindende *Shedding*, bei dem es zur Exozytose von Vesikeln mit Annexinen und der SLO-Pore kommt (*Atanassoff et al. 2014*). Des Weiteren wäre es möglich, dass je nach dem gebildeten Durchmesser der Pore unterschiedliche Reperaturmechanismen stattfinden (*Etxaniz et al. 2018*). Die Höhe der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ nach Ca^{2+} -Einstrom über die SLO-Pore entscheidet, ob eine Reperatur der Zellmembran ($5\text{-}10\mu\text{M } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) oder Apoptose stattfindet ($>10\mu\text{M } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$) (*Babiychuk et al. 2009*). Zellen, die ihre Plasmamembran nicht vollständig reparieren können, zeigen anhaltende Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ (*Babiychuk et al. 2009*).

Einen weiteren Reperaturmechanismus der SLO-Poren durch Substitution der Plasmamembran mit Lysosomen (*Patching*) konnten *Atanasasoff et al.* in der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, jedoch nicht in HEK-Zellen zeigen. Dieser Reperaturmechanismus trat besonders in durch die SLO-Poren schwer geschädigten Zellen auf und war ebenfalls abhängig vom extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom über die SLO-Pore. *Tam et al.* konnten zeigen, dass es nach der Fusion von Lysosomen mit der Plasmamembran zur Exozytose der sauren Sphingomyelinase kommt, welche durch die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid zur Endozytose von SLO-Poren enthaltenden Endosomen führte (Tam et al. 2010). Dies wurde von *Coretto et al.* ergänzt, die eine Endozytose wenige Sekunden nach SLO-Porenbildung nachwiesen, welche in Caveolin1-positiven Vesikeln stattfand (Coretto et al. 2013). Bei der Endozytose über Caveolae könnte zeitgleich die Aktivierung von G-Proteinen oder dem IP_3 -Rezeptor stattfinden, die die Aktivierung des in dieser Arbeit beschriebenen Signalswegs erklären könnte.

Dies könnte die Generierung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstromes über die Beteiligung des IP_3 -R, der nicht nur am ER, sondern ebenfalls in den Caveolae der Plasmamembran lokalisiert ist, vermuten lassen. In DT 40 Zellen wurden IP_3 -R in der Plasmamembran (Dellis et al. 2006, Taylor et al. 2009) und in EC der Aorta von Rindern ein IP_3 -R ähnliches Protein in den Caveolae beschrieben (Fujimoto et al. 1992). Für den IP_3 -R wurde eine von der $[\text{Ca}^{2+}]$ und $[\text{IP}_3]$ abhängige Öffnungszeit des Kanals nachgewiesen (Taylor et al. 2009), welches einen Ca^{2+} -Einstrom von unterschiedlicher Intensität und Dauer erklären könnte. Da PLY in cholesterolreichen Regionen seine Poren bildet (Johnson et al. 1980) und Caveolae besonders cholesterolhaltig sind, könnte die Bindung an Caveolae und dortige Aktivierung des IP_3 -R ähnlichen Proteins mit der Generierung eines Ca^{2+} -Signales einhergehen. Dies würde erklären, dass nach der Inhibition des IP_3 -R mit Xestospongin C in den meisten Versuchen kein Ca^{2+} -Signal mehr stattfand. Nach der Inhibition der PLC über U73122 würde demnach der IP_3 -R des ER nicht mehr, jedoch der IP_3 -R in den Cavolae der Plasmamembran aktiviert werden und das nach U73122 entstehende Ca^{2+} -Signal verursachen.

Neben dem IP₃-R ist der *store-operated Ca²⁺-entry* (SOCE) in EC ein wichtiger Mechanismus zur Erhöhung der [Ca²⁺]_{zyt}. *Tiruppathi et al.* zeigten in EC nach der Stimulation mit dem GPCR-Agonisten Thrombin einen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg (Tiruppathi et al. 2003). Unter Ca²⁺-freien Bedingungen des extrazellulären Mediums zeigte sich in diesen Versuchen nur ein kurzer Anstieg der [Ca²⁺]_{zyt} mit einem nachfolgenden Abfall der [Ca²⁺]_{zyt} zur Baseline. Wurde extrazelluläres Ca²⁺ ins Medium hinzugefügt, erfolgte ein erneuter längerer [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg und anschließender Abfall der [Ca²⁺]_{zyt} zur Baseline. Dies lässt auf einen Einstrom von extrazellulär nach Entleerung der Ca²⁺-Speicher als SOCE schließen (Tiruppathi et al. 2003). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen ein ähnliches Ca²⁺-Signal aus schmalen und breitbasigen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiegen unter Ca²⁺-haltigen Bedingungen und nur wenigen schmalen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstiegen unter extrazellulär Ca²⁺-freien Bedingungen. Daher stellt sich die Frage, ob das beschriebene Ca²⁺-Signal durch den SOCE über den Agonisten PLY entstehen könnte. Da die Entleerung des ER den Trigger für den SOCE darstellt, müsste bereits in den Kontrollversuchen mit Thapsigargin nach dem initialen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg durch die Entleerung des ER ein weiterer [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg auftreten, der jedoch ausblieb. Unter der Intervention mit WT D39 kam es jedoch nach der Entleerung des ER mit Thapsigargin und einem initialen [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg zu einem weiteren Ca²⁺-Einstrom von extrazellulär. Dies lässt annehmen, dass der [Ca²⁺]_{zyt}-Anstieg während der Inkubation mit WT D39 und Thapsigargin nicht allein durch den SOCE entstehen kann, wie er von *Tiruppathi et al.* für den Agonisten Thrombin beschrieben wurde.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Öffnung und Schließung von Ca²⁺-Kanälen der Plasmamembran, diese wurden jedoch über die unspezifische Inhibition mit Gadolinium bereits in vorherigen Versuchen der Arbeitsgruppe ausgeschlossen. Intrazelluläre Ca²⁺-Signale wurden durch den Einfluss von Scherstress auf bovine EC der Aorta beschrieben (Shen et al. 1992). Der Scherstress in den vorliegenden Versuchen entstand durch das Auf- und Abpipettieren bei der Zugabe der Substanzen, sodass er sowohl unter Interventions- und Kontrollbedingungen gleichermaßen vorhanden war. Möglich wäre, dass WT D39 eine höhere Viskosität als das in dieser Arbeit verwendete Zellmedium

besitzt und darüber ein Ca^{2+} -Signal auslösen könnte. *Yamamoto et al.* zeigten einen stärkeren Scherstress bedingten Ca^{2+} -Einstrom unter Verwendung eines Mediums mit erhöhter Viskosität (Yamamoto et al. 2003). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe *Yamamoto et al.* in humanen EC der Pulmonalarterie eine Scherstress abhängige endogene ATP-Freisetzung mit Aktivierung des Purinrezeptors P2X4 und nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran nachweisen (Yamamoto et al. 2000). Dieses intrazelluläre beschriebene Ca^{2+} -Signal ließ sich weder durch Inhibitoren der PLC (mit U73122) noch der SERCA (mit Thapsigargin) beeinflussen, blieb jedoch unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (Zugabe von 1mM Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) ins Zellmedium) oder der Zugabe von ATP-degradierenden Enzymen (Apyrase) aus. Die ATP-Freisetzung und das nachfolgend initiierte Ca^{2+} -Signal entstand besonders in Caveolae-reichen Regionen (Yamamoto et al. 2011).

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene von intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} -Signal war durch U73122 und Thapsigargin beeinflussbar. Der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom war jedoch nicht durch die Inhibition der PLC oder der SERCA beeinflussbar, sodass nur dessen Entstehung durch Scherstress erklärbar wäre. Jedoch konnte in HEK-Zellen 293 ein Scherstress abhängiges Ca^{2+} -Signal erst nach der Transfektion des P2X4, der in nativen HEK-Zellen kaum exprimiert wird (Yamamoto et al. 2000), gezeigt werden. HEK-Zellen und HPMEC zeigten in dieser Arbeit gleichermaßen ein Ca^{2+} -Signal.

Ein weiterer Akteur bei der Entstehung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstromes könnten die TRP-Kanäle sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom über G-Proteine und die nachfolgende Aktivierung der PLC stattfand. Die PLC generiert neben IP_3 auch DAG, welches die Ca^{2+} -permeablen Kanäle TRPC3, TRPC6 und TRPC7 direkt aktiviert (Earley et Brayden 2015). Dies könnte zu einem $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{zyt}}$ -Anstieg durch einen Ca^{2+} -Einstrom über die durch DAG aktivierten TRP-Kanäle der Plasmamembran führen. So wären sowohl der intrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom über IP_3 , als auch der extrazelluläre Einstrom über die TRP-Kanäle abhängig von der PLC. Da jedoch nach der Inhibition der PLC mit U73122 noch ein Ca^{2+} -

Einstrom von extrazellulär bestand, müsste ein weiterer Mechanismus den Ca^{2+} -Einstroms von extrazellulär auslösen.

Unsere Daten geben also keinen eindeutigen Hinweis auf eine Kopplung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstromes an den intrazellulären Ca^{2+} -Einstrom. Jedoch sind beide von der Porenbildung abhängig. Bisher bleiben die Akteure des extrazellulären Ca^{2+} -Einstromes unseres Signales ungeklärt und sind Gegenstand weiterer Versuche. Besonders der mögliche Zusammenhang des extrazellulären Ca^{2+} -Einstromes von der Endozytose oder dem Verschluss der PLY-Pore durch Annexine ist ein interessanter und pathophysiologisch relevanter zu untersuchender Aspekt.

5. Zusammenfassung

S. pneumoniae ist mit ca. 70% der häufigste Auslöser ambulant erworbener Pneumonien, die mit gravierenden Komplikationen wie der Sepsis und dem ARDS verbunden sein können. Beim ARDS entsteht eine erhöhte Kapillarpermeabilität mit einer vermehrten intraalveolären Flüssigkeitsansammlung und Reduktion des pulmonalen Gasaustausches.

Die dadurch verminderte Oxygenierung des Blutes führt zum Multiorganversagen des Patienten. In den ersten Erkrankungstagen invasiver Pneumokokkenerkrankungen zeigt die antibiotische Therapie gegenüber der Placebobehandlung noch keinen Vorteil hinsichtlich der Mortalität und andere therapeutische Interventionen werden benötigt.

Das Zytotoxin PLY von *S. pneumoniae* bewirkt in hohen Konzentrationen eine Zellyse und kompromittiert in geringeren Konzentrationen durch Permeabilitätssteigerung die endotheliale Barriere und verstärkt die Entzündungsreaktion. Für einige inflammatorische Stimuli ist bereits bekannt, dass sie über die $[Ca^{2+}]_{zyt}$ die Permeabilität in Endothelzellen erhöhen können.

Wir konnten bereits zuvor zeigen, dass durch die Inkubation mit dem Pneumokokkenstamm WT D39 und PLY *in vitro* in HPMEC und *in vivo* in EC der Rattenlunge die Entstehung eines spezifischen Ca^{2+} -Signales induziert wird.

Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass der intra- und extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom abhängig von der porenbildenden Aktivität des PLY sind. Dennoch stellt das Calciumsignal kein Todessignal dar, wie in den Zytotoxizitätsassays gezeigt wurde. Des Weiteren konnte erstmals nachgewiesen werden, dass WT D39 über die Aktivierung der G-Proteine $G\alpha_{11}$ und $G\alpha_Q$ zu einer PLC und IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER führt, die zur intrazellulären Ca^{2+} -Freisetzung beiträgt. Die Entstehung des extrazellulären Ca^{2+} -Signales sowie der genaue Aktivierungsmechanismus der G-Proteine bleiben Gegenstand zukünftiger Versuche.

5.1. Summary

Community acquired pneumonia is caused by *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) in 70% of all cases. Pneumonia can lead to severe complications such as sepsis or acute respiratory distress syndrome (ARDS). ARDS results from an enhanced capillary permeability which leads to an increased alveolar fluid accumulation and reduced pulmonary gas exchange. This impairment of blood oxygenation can lead to multiple organ failure of the patient.

During the first days of invasive pneumococcal disease antibiotic treatment does not show any advance regarding mortality compared with placebo treatment. This emphasizes the demand for other treatment options especially during the first days of infection.

Pneumolysin (PLY) is the pore-forming cytotoxin of *S. pneumoniae*. High concentrations of PLY cause cell lysis while low concentrations intensify the inflammatory reaction and reduce the endothelial barrier function by increasing the permeability of the endothelial cells. It is known that some inflammatory agents increase endothelial permeability by a change in cytosolic calcium concentration $[Ca^{2+}]_{cyt}$.

Our research group has already proved a specific calcium signal after the incubation of human pulmonary endothelial cells (HPMEC) with *S. pneumoniae* WT D39 or PLY *in vitro* and *in vivo* in endothelial cells of the rat lung.

The results of this research confirm the necessity of PLY pore formation for the intracellular calcium release and extracellular calcium influx. Despite pore formation the specific calcium signal is not due to a death signal of the cell as shown in the results of the cytotoxicity assay. Furthermore this work describes the activation of the heterotrimeric G protein G α 11 and G α Q by *S. pneumoniae* resulting in calcium release from the endoplasmatic reticulum triggered by the phospholipase C (PLC) and inositol trisphosphate (IP $_3$). This calcium release contributes to the generation of the intracellular calcium signal. The formation of the extracellular calcium signal and the exact cause for the activation of the heterotrimeric G proteins remain part of further research.

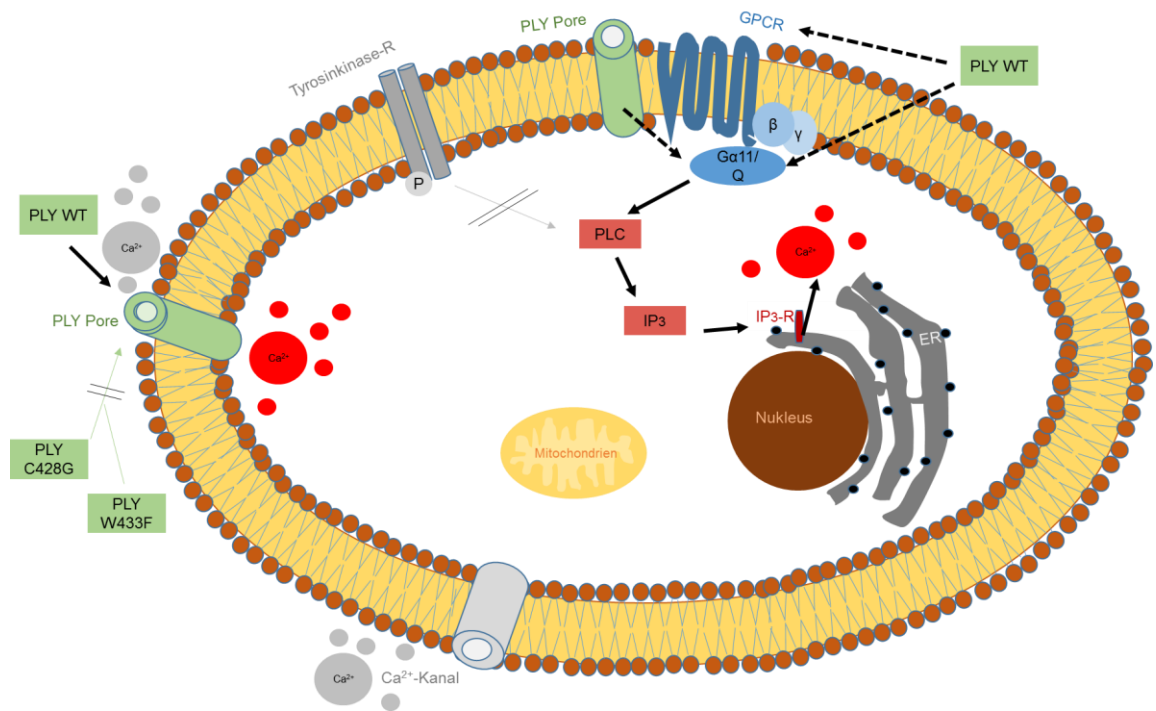


Abb. 47 zeigt eine Zusammenfassung der untersuchten Signalwege.

6. Verzeichnisse

6.1 Literaturverzeichnis

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y (1987). Genestein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem.* 262(12):5592-5595.

Alhamdi Y, Neill DR, Abrams ST, Malak HA, Yahya R, Barrett-Jolley R, et al. (2015) Circulating Pneumolysin Is a Potent Inducer of Cardiac Injury during Pneumococcal Infection. *PLoS Pathog.* 11(5): e1004836.

Andreeva, Z., Nesterenko, V., Fomkina, M., Ternovsky, V., Suzina, N., Yu, A., Solonin, A., Sineva, E. (2007). The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim Biophys Acta.* 1768(2):253-263.

Atanassoff, AP., Wolfmeier, H., Schoenauer, R., Hostettler, A., Ring, A., et al. (2014). Microvesicle Shedding and Lysosomal Repair Fulfill Divergent Cellular Needs during the Repair of Streptolysin O-Induced Plasmalemmal Damage. *PLoS ONE* 9(2): e89743. doi:10.1371/journal.pone.0089743

Austrian R., Gold J. (1964). Pneumococcal bacteremia with especial reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann Intern Med.* 60(5):759-76.

Austrian, R. (1999). The Pneumococcus at the Millennium: Not Down, Not Out. *J Infect Dis.* 179(2):338-341.

Babiychuk, EB., Monastyrskaya, K., Potez, S., Draeger, A. (2009). Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation* 16, 1126–1134

Berven, L., Barritt, G. (1995). Evidence obtained using single hepatocytes for inhibition by the phospholipase C inhibitor U73122 of store-operated Ca²⁺ inflow. *Biochem Pharmacol.* 49(10):1373-1379.

Bishara, N. B., Murphy, T. V., Hill, M. (2002). Capacitative Ca²⁺ entry in vascular endothelial cells is mediated via pathways sensitive to 2 aminoethoxydiphenyl borate and xestospongine C. *Br J Pharmacol.* 135(1):119-128.

Berridge M. J., (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling, *Nature.* 361(6410):315-25.

- Berridge, M.J. (2007). Inositol trisphosphate and calcium oscillations. *Biochem Soc Symp.*74:1-7.
- Bleasdale, J. E., Smith, J., Richie, N., Fitzpatrick, A. (1990). Selective Inhibition of Receptor-Coupled Phospholipase C-dependent Processes in Human Platelets and Polymorphonuclear Neutrophils. *J Pharmacol Exp Ther.* 255(2):756-768.
- Bourguignon L., IIDA N., Sobrin L., Boucignon C.J. (1994). Identification of an IP₃ Receptor in Endothelial Cells. *J Cell Physiol.* 159: 29-34.
- Brini, M., Carafoli, E. (2009). Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev.*89(4):1341-1378.
- Caterall, J. R. (1999). *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* 54:929-937.
- Chini, B., Parenti, M. (2004). G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 32(2): 325-338.
- Corrotte, M., Almeida, P., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M., Millis, B., Cortez, M., Miller, M., Song, W., Maugel, T., Andrews, N. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *eLife* 2013;2:e00926
- Davidson, M., Parkinson, A., Bulkow, L. R., Fitzgerald, M. A., Peters, H. V., Parks, D. J. (1994). The epidemiology of invasive pneumococcal disease in Alaska, 1986-1990--ethnic differences and opportunities for prevention. *J Infect Dis.* 170(2):368-376.
- Dellis, O., Dedos, S., Tovey, S., Taufiq-Ur-Rahman, Dubel, S., Taylor, C. (2006). Ca²⁺ entry through plasma membrane IP₃ receptors. *Science.* 313(5784):229-233.
- De Smet, P., Parys, J., Callewaert, G., Weidema, A., Hill, E., De Smedt, H., Erneux, C., Sorrentino, V., Missiaen, L. (1999). Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1, 4, 5- trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pumps. *Cell Calcium.* 26(1-2):9-13.
- Dömötör, E., Abbott, N., Adam-Vizi, V. (1999). Na⁺-Ca²⁺ exchange and its implications for calcium homeostasis in primary cultured rat brain microvascular endothelial cells. *J Physiol.*515 (Pt 1): 147-155.

- Earley, S., Brayden, J. (2015). Transient receptor potential channels in the vasculature. *Physiol Rev.* 95(2):645-690.
- Ehrlich, B., Watras, J. (1988). Inositol 1,4,5-trisphosphate activates a channel from smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature.* 336: 583-586.
- El-Rachkidy, R., Davies, N., Andrew, P. (2008). Pneumolysin generates multiple conductance pores in the membrane of nucleated cells. *Biochem Biophys Res Commun.*368(3):786-792.
- Etxaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C., Ostolaza, H. (2018). Membrane Repair Mechanisms against Permeabilization by Pore-Forming Toxins. *Toxins* 2018, 10, 234; doi:10.3390/toxins10060234
- Feikin, D. R., Schuchat, A., Kolczak, M., Barrett, N. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L., Mcgeer, A., Farley, M. M., Vugia, D. J., Lexau, C., Stefonek, K. R., Patterson, J. E., Jorgensen, J. H. (2000). Mortality From Invasive Pneumococcal Pneumonia in the Era of Antibiotic Resistance, 1995 – 1997. *Am J Public Health.* 90(2):223-229.
- Fleming, I., Fisslthaler, B., Busse, R. (1995). Calcium signaling in endothelial cells involves activation of tyrosine kinases and leads to activation of mitogen-activated protein kinases. *Circ Res.* 76(4):522-529.
- Foged, C. (2012). siRNA Delivery with Lipid-based Systems: Promises and Pitfalls. *Curr Top Med Chem.*12(2):97-107.
- Förtsch, C. (2012). Pneumolysin: the state of pore-formation in context to cell trafficking and inflammatory responses of astrocytes. Dissertation, Universität Würzburg.
- Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Ogawa, K., (1992) Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol.* 119(6):1507-1513.
- Gafni, J., Munsch, J., Lam, T. H., Catlin, M. C., Costa, L. G., Molinski, T. F., Pessah, I. N. (1997). Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron.* 19(3):723-733.
- Gekara, N., Jacobs, T., Chakraborty, T., Weiss, S. (2005). The cholesterol-dependent cytolysin listeriolysin O aggregates rafts via oligomerization. *Cell Microbiol.* 7(9):1345-1356.

- Gekara, N. O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., Weiss, S. (2007). The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 9(8):2008-2021.
- Giddings, K., Zhao, J., Sims, P., Tweten, R. (2004). Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol.* 11(12):1173-1178.
- Gilbert, R. J., Rossjohn, J., Parker, M. W., Tweten, R. K., Morgan, P. J., Mitchell, T. J., Errington, N., Rowe, A. J., Andrew, P. W., Byron, O. (1998). Self-interaction of pneumolysin, the pore-forming protein toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol.* 284(4):1223-1237.
- Gimpl, G., Burger, K., Fahrenholz, F. (1997). Cholesterol as Modulator of Receptor Function. *Biochemistry.* 36(36):10959-10974.
- Gniadecki, R., Bang, B. (2003). Flotillas of lipid rafts in transit amplifying cell-like keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 121(3):522-528.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260(6):3440-3450.
- Gunter, T., Pfeiffer, D. (1990). Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol.* 258(5 Pt 1):C755-86.
- Hajnóczky, G., Hager, R., Thomas, A. (1999). Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4,5- trisphosphate receptors by Ca²⁺. *J Biol Chem.* 274(20):14157-14162.
- Hammerschmidt, S., Burchhardt, G., Jensch, I.: Hämolysestest für PLY WT und PLY-Mutanten. Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifwald.
- Hammit, L. L., Bruden, D. L., Butler, J. C., Baggett, H. C., Hurlburt, D. A., Reasonover, A., Hennessy, T. W. (2006). Indirect effect of conjugate vaccine on adult carriage of *Streptococcus pneumoniae*: an explanation of trends in invasive pneumococcal disease. *J Infect Dis.* 193(11):1487-1494.
- Harper, H., Löffler, G., Petrides, P., Weiss, L. (2013). Isoenzyme. In: *Physiologische Chemie: Eine Einführung in die medizinische Biochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*, Springer-Verlag, 225.

- Hedlund, J., Kalin, M. (2005). *Streptococcus pneumoniae*: Epidemiology , Risk Factors , and Clinical Features. *Semin Respir Crit Care Med.* 26(6):563-574.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303(5663):1526-1529.
- Hirst, R. A., Kadioglu, A., O'Callaghan, C., Andrew, P. W. (2004). The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol.* 138(2): 195–201.
- Hogan, P., Rao, A. (2015). Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 460(1):40-49.
- Hupp, S., Förtsch, C., Wippel, C., Ma, J., Mitchell, T., Iliev, A. (2013). Direct Transmembrane Interaction between Actin and Cytolysin Pneumolysin. *J Mol Biol.* 425(3):636-646.
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺ dependent endocytosis. *J Cell Biol.* 180(5):905-914.
- Iliev, A. I., Djannatian, J. R., Nau, R., Mitchell, T. J., Wouters, F. S. (2007). Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(8):2897-2902.
- Iino, M. (1990). Biphasic Ca²⁺ Dependence of Inositol in Smooth Muscle Cells of the Guinea Pig *Taenia Caeci*. *J Gen Physiol.* 95(6):1103-1122.
- Johnson, M. K., Geoffroy, C., Alouf, J. E. (1980). Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun.* 27(1):97-101.
- Jounblat, R., Kadioglu, A., Mitchell, T. J., Andrew, P. W. (2003). Pneumococcal Behavior and Host Responses during Bronchopneumonia Are Affected Differently by the Cytolytic and Complement-Activating Activities of Pneumolysin. *Infect Immun.* 71(4):1813-1819.
- Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T. J., Andrew, P. W. (2002). Upper and Lower Respiratory Tract Infection by *Streptococcus pneumoniae* Is Affected by Pneumolysin Deficiency and Differences in Capsule Type. *Infect Immun.* 70(6):2886-2890.

- Kadioglu, A., Coward, W., Colston, M. J., Hewitt, C. R. A., Andrew, P. W. (2004). CD4-T-Lymphocyte Interactions with Pneumolysin and Pneumococci Suggest a Crucial Protective Role in the Host Response to Pneumococcal Infection. *Infect Immun.* 2004 May;72(5):2689-2697.
- Kalin, M. (1998). Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax.* 53(3): 159–162.
- Kanclerski, K., Mollby, R. (1987). Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin). *J Clin Microbiol.* 25(2): 222–225.
- Kaye, D., Kelly RA. (1999). Expression and regulation of the sodium-calcium exchanger in cardiac microvascular endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26(8): 651-655.
- Klugman, K. P. (2000). Antibiotic-Resistant Pneumococci in Pédiatric Disease. *Microb Drug Resist.* 1(1):5-8.
- Knapp, S., Wieland, CW., van 't Veer, C., Takeuchi, O., Akira, S., Florquin, S., van der Poll, T. (2004). Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol* 2004; 172:3132-3138;
- Korchev, Y., Bashford, C., Pasternak, C. (1992). Differential Sensitivity of Pneumolysin-Induced Channels to Gating by Divalent Cations. *J Membr Biol.* 127(3):195-203.
- Korchev, Y. E., Bashford, C. L., Pederzolli, C., Pasternak, C. A., Morgan, P. J., Andrew, P. W., Mitchell, T. J (1998). A conserved tryptophan in pneumolysin is a determinant of the characteristics of channels formed by pneumolysin in cells and planar lipid bilayers. *Biochem J.* 329 (Pt 3):571-577.
- Laflamme, K., Domingue, O., Guillemette, B. I. and Guillemette, G. (2002), Immunohistochemical localization of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to the nucleus of different mammalian cells. *J Cell Biochem.* 85(1): 219-228.
- Liu, D., Homan, L., Dillon, J. (2004). Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology.* 145(12): 5532-5539.

- Lucas, R., Yang, G., Gorshkov, B. A., Zemskov, E. A., Sridhar, S., Umapathy, N. S., Jezierska-drutel, A., Alieva, I. B., Leustik, M., Matthay, M. A., Caldwell, R. W., Romero, M. J., Chakraborty, T. (2012). Protein kinase C- α and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 47(4): 445-453.
- Lum, H., Aschner, J., Fletcher, P., Phillips, G., Malik, A., Asrar (1992). Time course of thrombin-induced increase in endothelial permeability: relationship to Ca^{2+} and inositol polyphosphates. *Am J Physiol.* 263(2 Pt 1): L219-25.
- Lynch, J. P., Zhanel, D. Ph. G. G. (2009). Streptococcus Pneumoniae: Does Antimicrobial Resistance Matter? *Semin Respir Crit Care Med.* 30(2): 210-238.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., Cieslewicz, M. J., Lipsitch, M., Thompson, C. M., Kurt-Jones, E., Paton, J. C., Wessels, M. R., Golenbock, D. T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(4):1966-1971.
- Marriott, H. M., Mitchell, T. J., Dockrell, D. H. (2008). Pneumolysin: A double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med.* 8(6):497-509.
- McNeil, AK., Rescher, U., Gerke, V., McNeil, PL. (2006). Requirement for Annexin A1 in Plasma Membrane Repair. *J Biol Chem.* 2006 Nov 17;281(46):35202-7
- Mecklenburg, A., Albrecht, A., Olotu, C., Hammerschmidt, S., Kiefmann, R. (2012). In Pulmonary Endothelial Cells Calcium Signaling By S. Pneumoniae Is Regulated By Calcium Influx From The Extracellular Space But Also By Calcium Release From Intracellular Stores. American Thoracic Society International Conference Abstracts, B55. Host defense in pulmonary infection and tuberculosis
[Online im Internet.] URL: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A3281.
- Mogami, H., Mills, C. L., Gallacher, D. V. (1997). Phospholipase C inhibitor, U73122, releases intracellular Ca^{2+} , potentiates Ins(1,4,5)P3-mediated Ca^{2+} release and directly activates ion channels in mouse pancreatic acinar cells. *Biochem J.* 324 (Pt 2):645-651.

- Musher, D. M., Thorner, A. R. (2014). Community-Acquired Pneumonia. *N Engl J Med.* 371(17):1619-1628.
- National Center for Biotechnology Information (2016a). ATP. PubChem Compound Database; CID=5957, [Online im Internet.] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5957> (Stand: 1. Mai 2016).
- National Center for Biotechnology Information (2016b). Ethidiumhomodimer. PubChem Compound Database; CID 12328897. [Online im Internet.] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12328897> (Stand: 27. Juli 2016).
- National Heart, Lung, and Blood Institute Health Topics: ARDS (2014), [Online im Internet.] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0062938/> (Stand 27.07.2016).
- Neill, D.R., Mitchell, T. J., Kadioglu A. (2015). Kapitel 14 Pneumolysin. In *Streptococcus pneumoniae. Molecular Mechanisms of Host-Pathogen Interactions.* Brown, J., Hammerschmidt, S., Orihuela, C. Elsevier Verlag 2015.
- Oh, P., Schnitzer, J. (2001). Segregation of Heterotrimeric G Proteins in Cell Surface Microdomains Gq Binds Caveolin to Concentrate in Caveolae , whereas Gi and Gs Target Lipid Rafts by Default. *Mol Biol Cell.* 12(3):685-698.
- Omidi, Y., Hollins, A. J., Benboubetra, M., Drayton, R., Benter, I. F., Akhtar, S. (2003). Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells. *J Drug Target.* 11(6):311-323.
- Pakhomov, A., Miklavcic, D., Markov, M. (2010). Fluorescent probes and their application in Characterizing membrane Electroporation. In: *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine.* CRC Press,125.
- Paton, J. C., Rowan K., B., Ferrante, A. (1984). Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect Immun.* 43(3): 1085–1087.
- Pierrakos, C., Karanikolas, M., Scolletta, S., Karamouzos, V. (2011). Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathophysiology and Therapeutic Options. *J Clin Med Res.* 4(1): 7–16.

- Putney, J. (1987). Calcium-mobilizing receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 481-486.
- Repp, H., Pamukçi, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., Dreyer, F. (2002). Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cell Microbiol.* 4(8):483-491.
- Robbins, M., Judge, A., Ambegia, E., Choi, C., Yaworski, E., Palmer, L., McClintock, K., MacLachlan, I. (2008). Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther.* 19(10):991-999.
- Rubins, J. B., Charboneau, D., Paton, J. C., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., Janoff, E. N. (1995). Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *T J Clin Invest.* 95(1):142-150.
- Sambrook, F. Joseph (1990). The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum. *Cell.* 61(2):197-199.
- Saunders, F. K., Mitchell, T. J., Walker, J. A., Andrew, P. W., Boulnois, G. J. (1989). Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect Immun.* 57(8):2547-2552.
- Shen, J., Lusinskas, F., Connolly, A., Dewey, C., Gimbrone, M. (1992). Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 262(2 Pt 1): C384-390.
- Shewell, L., Harvey, R., Higgins, M., Day, C., Hartley-Tassell, L., Chen, A., Gillen, C., James, D., Alonzo, F., Torres, V., Walker, M., Paton, A., Paton, J., Jennings, M. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(49):E5312-5320.
- Sonnen, A. F-P., Plitzko, J. M., Gilbert, R. J. C. (2014). Incomplete pneumolysin oligomers form membrane pores. *Open Biol.* 4:140044.
- Stringaris, A. K., Geisenhainer, J., Bergmann, F., Balshüsemann, C., Lee, U., Zysk, G., Mitchell, T. J., Keller, B. U., Kuhnt, U., Gerber, J., Spreer, A., Bähr, M., Michel, U., Nau, R. (2002). Neurotoxicity of pneumolysin, a major pneumococcal virulence factor, involves calcium influx and depends on activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Neurobiol Dis.* 11(3):355-368.

- Sullivan, M., Earley, S. (2013). TRP channel Ca^{2+} sparklets: fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization. *Am J Physiol Cell Physiol.* 305(10):C999-C1008.
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, MC., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., Andrews, N. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *J. Cell Biol.* Vol. 189 No. 6 1027–1038
- Taylor, C., Rahman, T., Tovey, S., Dedos, S., Taylor, E., Velamakanni, S. (2009). IP3 receptors: some lessons from DT40 cells. *Immunol Rev.* 231(1):23-44.
- Taylor C., Tovey S. (2010). IP₃-Receptors: Toward Understanding Their Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(12): a004010.
- Taylor, S., Sanders, M., Tullos, N., Stray, S., Norcross, E., Mcdaniel, L., Marquart, M. (2013). The Cholesterol-Dependent Cytolysin Pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* binds to lipid raft microdomains in human corneal epithelial cells. *PLoS One.* 8(4): e61300.
- Tiruppathi, C., Minshall, R., Paria, B., Vogel, S., Malik, A. (2003). Role of Ca^{2+} signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol.* 39(4-5): 173-185.
- Tran, Q., Ohashi, K., & Watanabe, H. (2000). Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 48(1): 13-22.
- Tran, Q., Watanabe, H. (2006). Calcium signalling in the endothelium. *The Vascular Endothelium, Handb Exp Pharmacol.* 176 (Pt 1): 145-187.
- Tran, S., Puhar, A., Ngo-camus, M., Ramarao, N. (2011). Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. *PLoS One.*6(9): e22876.
- TranVan Nhieu, G., Clair, C., Grompone, G., Sansonetti, P. (2004). Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol Cell.* 96(1): 93-101.
- Vermassen, E., Parys, J. B., Mauger, J. (2004). Subcellular distribution of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors: functional relevance and molecular determinants. *Biol Cell.* 96(1): 3-17.

- Vischer, U, Lang, U, Wollheim, C. (1998). Autocrine regulation of endothelial exocytosis: von Willebrand factor release is induced by prostacyclin in cultured endothelial cells. *FEBS Lett.* 424(3): 211-215.
- Walker, J. A., Allen, R. L., Falmagne, P., Johnson, M. K., Boulnois, G. J. (1987). Molecular Cloning, Characterization, and Complete Nucleotide Sequence of the Gene for Pneumolysin, the Sulfhydryl-Activated Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 55(5): 1184-1189.
- Wippel, C., Förtsch, C., Hupp, S., Maier, E., Benz, R., Ma, J., Mitchell, T. J., Iliev, A. I. (2011). Extracellular calcium reduction strongly increases the lytic capacity of pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae* in brain tissue. *J Infect Dis.* 204(6): 930-936.
- Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A. C., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Berger, K., Mitchell, T. J., de los Toyos, J. R., Rosseau, S., Suttorp, N., Schütte, H. (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 34(7): 1947-1954.
- Wolfmeier, H., Schoenauer, R., Atanassoff, A. P., Neill, D. R., Kadioglu, A., Draeger, A., Babychuk, E. B. (2014). Ca²⁺-dependent repair of pneumolysin pores: A new paradigm for host cellular defense against bacterial pore-forming toxins. *Biochim Biophys Acta.* 1853(9): 2045-2054.
- Wood, P., Gillespie, J. (1998). Evidence for mitochondrial Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in permeabilised endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 246(2): 543-548.
- Yamamoto, K., Korenaga, R., Kamiya, A., Ando, J. (2000). Fluid Shear Stress Activates Ca²⁺ Influx Into Human Endothelial Cells via P2X4 Purinoceptors. *Circ Res.* 87(5): 385-391.
- Yamamoto, K., Sokabe, T., Ohura, N., Nakatsuka, H., Kamiya, A., Ando, J. (2003). Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285(2): H793-803.
- Yamamoto, K., Furuya, K., Nakamura, M., Kobatake, E., Sokabe, M., Ando, J. (2011). Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca²⁺ waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 124(Pt 20): 3477-3483.

Yu, F., Yarov-yarovoy, V., Gutman, G., Catterall, W. (2005). Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacol Rev.* 57(4): 387-395.

Zhu, M., Ma, J., Parrington, J., Calcraft, P., Galione, A., Evans, A. (2010). Calcium signaling via two-pore channels : local or global , that is the question. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298(3): C430-441.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AIDS: *Acquired Immune Deficiency Syndrome*

ARDS: akutes Atemnotsyndrom

Astro: primäre Astrozyten

AUT: Österreich

ATP: Adenosintriphosphat

BAPTA: 1,2-Bis-Aminophenoxyethan-Acetylsäure

BCA: Pierce Biochinoninsäure Protein Assay

BEL: Belgien

ØCa²⁺: Calciumfreies Zellmedium

[Ca²⁺]_{zyt}: zytosolische Calciumkonzentration

[Ca²⁺]_{ER}: Calciumkonzentration des Endoplasmatischen Retikulums

cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat

CDC: cholesterinabhängige Zytolysine

CFU: *Colony forming units*

CHE: Schweiz

CICR: *Ca²⁺-induced Ca²⁺-release*

CRAC: *Ca²⁺-release-activated-Ca²⁺-channel*

DAG: Diacylglycerol

DEU: Deutschland

DMEM: *Dulbecco's modified eagle serum*

DT40: klonale B-Zell-Lymphom-Zelllinie

EC: Endothelzellen

EGF: Epidermaler Wachstumsfaktor

EGTA: Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N',N'-tetraessigsäure

eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase

ER: Endoplasmatisches Retikulum

EthD-III: Ethidiumhomodimer III

F: Fluoreszenzintensität

FBS: Fetales Kälberserum

FIN: Finnland

FURA-2-AM: Fura-2-Acetoxymethylester

λ: Wellenlänge

GPCR: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HEK-Zellen 293: Humane embryonale Nierenzellen
HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPMEC: Humane pulmonale embryonale Endothelzellen
IC₅₀: mittlere inhibitorische Konzentration
IL-6: Interleukin-6
ILY: Intermedilysin
IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP₃-R: Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren
JPN: Japan
K: Kontrolle
K_D: Dissoziationskonstante
LDH: Laktatdehydrogenase
MDR: *Multidrug resistant*
MEF: Murine embryonale Fibroblasten_
MEF_WT: Murine embryonale Fibroblasten_Wildtyp
MEF_MT: Murine embryonale Fibroblasten_Mutante
MIC: Minimale Hemmkonzentration
Myd88: *Myeloid differentiation factor 88*
NAADP: Nicotinsäureadenin-dinukleotidphosphat
NAD⁺: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NLD: Niederlande
NO: Stickstoffmonoxid
ΔPLY/ D39 ΔPLY: PLY- defiziente Pneumokokken
PLC- β: Phospholipase C-β
PLC- γ : Phospholipase C-γ
PAMPs: Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PBS: Phosphatgepufferter Salzlösung
PCR: Polymerase-Kettenreaktion
PCV7: heptavalenter Polysaccharid-Konjugat-Impfstoff gegen Pneumokokken
PGI₂: Prostacyclin
PK: primäre Keratinozyten
PKC- α: Proteinkinase C-α

Verzeichnisse

PLY: Pneumolysin

PMCA: *Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*

PPI: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

R: Ratio

RIPA: Radioimmunoprecipitation Analysenpuffer

RyR: Ryanodinrezeptor

Scr: *scrambled*

SERCA: *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase*

siRNA: small interfering ribonucleic acid

SOCE: *store-operated Ca²⁺-entry*

SPCA: *secretory pathway Ca(2+) ATPases* am Golgi-Apparat

S. pneumoniae/Pneumokokken: *Streptococcus pneumoniae*

STIM1: *Stromal interaction molecule 1*

TLR4: *Toll-like receptor 4*

TNF- α : *Tumor-necrosis factor- α*

TPC: *Two-pore channels*

TRP: *Transient receptor potential*

USA: Vereinigte Staaten von Amerika

Visc: Viskosität

vWF: von Willebrand Faktor

WT D39: Wildtyp Pneumokokken Typ D39

6.3 Abbildungsverzeichnis

1: HPMEC in vitro + WT D39	14
2: Formel nach Gryniewicz	24
3: Versuchsaufbau	25
4: Versuchsaufbau der Inhibitionsversuche	29
5: Berechnung der Sterblichkeit der Zellen in Prozent	30
6: Berechnung der Zytotoxizität eines Areal in Prozent	31
7: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion	36
8: Erstellung der Standardkurve zur Berechnung der Proteinkonzentration	38
9: Hämolyseintest	41
10: PLY WT	42
11: PLY W433F 10ng/ml	42
12: PLY W433F 480ng/ml	43
13: PLY C428G 480ng/ml	44
14: PLY WT 10ng/ml Ca^{2+} -frei	45
15: PLY W433F 480ng/ml Ca^{2+} -frei	45
16: HPMEC + Xestospongine C	47
17: HPMEC + U73122/ U73343	49
18: HPMEC + Genistein	50
19: Inhibition der Signalwege – Anteil reagibler Zellen	51
20: Inhibition der Signalwege – Frequenz	52
21: Inhibition der Signalwege – Verhältnis Amplitude zur Baseline	53

Verzeichnisse

22: Inhibition der Signalwege – relative ATP-Antwort	54
23: HEK-Zellen + WT D39, Ca ²⁺ -frei, Thapsigargin	57
24: EC und HEK - Anteil reagibler Zellen	58
25: EC und HEK - Frequenz	59
26: EC und HEK - Verhältnis Amplitude zur Baseline	60
27: EC und HEK - relative ATP-Antwort	61
28: Nachweis der RNA-Expression des GαQ/Gα11 in HEK-Zellen sowie HPMEC	62
29: Relative Densitometrie der Expression des GαQ/Gα11	63
30: Gelelektrophorese: <i>Knockdown</i> des Gα11 und GαQ	64
31: RNA-Expression des Gα11 in Prozent zur Nativprobe	65
32: RNA-Expression des GαQ in Prozent zur Nativprobe	66
33: <i>Knockdown</i> des Gα11 und GαQ im Western Blot.	67
34: Protein-Expression des Gα11 in Prozent zur Nativprobe	68
35: Protein-Expression des GαQ in Prozent zur Nativprobe	69
36: Calcium-Imaging-Versuche mit fluoreszenzmarkierter siRNA	70
37: Calcium-Imaging-Versuche nach siRNA- <i>Knockdown</i>	71
38: Calcium-Imaging-Versuche nach siRNA- <i>Knockdown</i> Ca ²⁺ -frei	72
39: siRNA- <i>Knockdown</i> – Anteil reagibler Zellen	73
40: siRNA- <i>Knockdown</i> – Frequenz	74
41: siRNA- <i>Knockdown</i> – Verhältnis Amplitude zur Baseline	75
42: siRNA- <i>Knockdown</i> – relative ATP-Antwort	76
43: BAPTA-Inkubation + WT D39	77

Verzeichnisse

44: LDH-Assay: Verhältnis der LDH-Freisetzung in Prozent zur Positivkontrolle	78
45: LDH-Assay: Verhältnis der LDH-Freisetzung mit oder ohne BAPTA	79
46: Calcein-Ethidiumhomodimer-Assay	81
47: Zusammenfassende Abbildung	107

6.4 Tabellenverzeichnis

1: Variablen der Kalibration nach Gryniewicz	24
2: Versuchsgruppen mit den durchgeführten Interventionen	26
3a: Versuchs- und Kontrollgruppen der Transfektion	33
3b: Ziel- und siRNA-Sequenzen des GáQ und Gá11	34
4: Primersequenzen der PCR	36
5: HEK-Zellen - Durchschnittliche Zellzahl sowie Anteil der reagiblen Zellen	56

7. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Rainer Kiefmann für die freundliche Überlassung des interessanten Themas sowie für zahlreiche Anregungen zu weiteren Versuchen. Ebenso möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und das entgegengebrachte Vertrauen bei der Umsetzung der Forschungsarbeiten bedanken.

Ein außerordentlich großes Dankeschön geht an Frau Dr. med. Anne Mecklenburg, die mich in der Planung der Arbeit unterstützt, mich in der Umsetzung kontinuierlich beraten und die Ergebnisse immer wieder kritisch mit mir hinterfragt hat. Dank Ihr habe ich in diesen Jahren viel über das eigenständige wissenschaftliche Arbeiten gelernt und mich menschlich weiterentwickeln können.

Herzlich bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Dr. nat. Martina Kiefmann, Julia Jira und Anke Weber, die mir mit ihren biochemischen Kenntnissen bei der Planung und Umsetzung von Versuchen mit fachlichen und kreativen Ideen stets zur Seite standen und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Mein außerordentlicher Dank gilt ebenso Monika Weber, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn, Andrea Pawelczyk, Claudia Lüchau und Stefanie Dora, die mich bei der Einarbeitung in biochemische und mikrobiologische Methoden unterstützen und bei Schwierigkeiten immer bereit waren mir auszuweichen.

Meinen Vorgängern und Mitdoktoranden Anton Casper, Annelie Cuvnhaus und Paula Keller möchte ich für die vielen Gespräche und die gegenseitige Unterstützung danken.

Dann möchte ich mich bei meinen vielen lieben Freunden und besonders bei Lukas Ebert für die unendliche Geduld und den stetigen Glauben an mich bedanken.

Zuletzt genannt, doch am wichtigsten für mich persönlich, geht der größte Dank an meine Eltern und meinen kleinen Bruder: ihr seid die tollste Unterstützung, die ich mir wünschen konnte. Danke, dass ihr in jedem Moment meines Lebens für mich da seid!

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9. Eidesstattliche Erklärung

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: