

**Aus der Universitätsklinik für Anaesthesiologie
und Intensivmedizin Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Unertl**

**Apoptose von respiratorischen
Epithelzellen durch
*Pseudomonas aeruginosa***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Sara Laszlo, geb. Dias Loureiro
aus Stuttgart**

2006

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. K. Unertl
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Riessen

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Die nosokomiale Pneumonie	2
1.1.1	Epidemiologie	2
1.1.2	Pathogenese	3
1.1.3	Mikrobiologie	3
1.2	<i>P. aeruginosa</i>	4
1.2.1	Allgemeiner Überblick über <i>P. aeruginosa</i>	4
1.2.2	Membrangebundene Virulenzfaktoren	5
1.2.3	Sezernierte Virulenzfaktoren	7
1.3	Respiratorische Infektionen durch <i>P. aeruginosa</i>	8
1.3.1	Der Ionenkanal CFTR und dessen Bedeutung bei respiratorischen Infektionen durch <i>P. aeruginosa</i>	8
1.3.2	Die Erkrankung zystische Fibrose als Modell zur Studie der CFTR-vermittelten Eliminationsmechanismen von <i>P. aeruginosa</i> im Respirationstrakt	10
1.3.3	Keimelimination mittels Apoptose – ein hypothetisches Modell	10
1.4	Apoptose	11
1.4.1	Induktionsmechanismen der Apoptose - Todesrezeptoren	12
1.4.2	Mechanismen der Apoptoseinduktion – der intrinsische Weg	13
1.4.3	Mechanismen der Apoptoseinduktion - Die Caspasenkaskade	14
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	20
2.1.1	Chemikalien und käuflich erworbene Lösungen	20
2.1.2	Bakterien	22
2.1.3	<i>P. aeruginosa</i> LPS	22
2.1.4	Zellkultur	23
2.1.5	DAPI-Fluoreszenzmikroskopie	27
2.1.6	Fluöszytometrie	28
2.1.7	Western-Blotting	29
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.2	Herstellung einer geeichten Bakteriensuspension	35
2.2.3	Infektionsversuche bei Zellen in Suspension	36
2.2.4	Infektionsversuche bei adhärenenten A549- oder CFT1-Zellen	37
2.2.5	Durchfluszytometrie	37
2.2.6	DAPI-Fluoreszenzmikroskopie	45
2.2.7	Apoptosenachweis auf Proteinebene	46

3	Ergebnisse	49
3.1	Flusszytometrische Untersuchungen an polaritätslosen Zellen	50
3.1.1	Apoptose durch A549-Zelllinie nach <i>P. aeruginosa</i> Infektion	50
3.1.2	Isoliertes LPS vermittelt keine Apoptose in A549-Zellen	51
3.1.3	Isoliertes LPS moduliert die apoptotische Antwort nicht	52
3.1.4	Apoptose polaritätsloser CFT1-Zelllinien	52
3.2	Untersuchungen an adhärenenten CFT1-Zelllinien	54
3.2.1	Morphologischer Apoptosenachweis	54
3.2.2	Apoptose durch Pao1v und Pak R1 <i>alg::tet</i>	57
3.2.3	Apoptose durch klinische Stämme	63
3.2.4	Keine Apoptose durch <i>P. aeruginosa</i> -LPS	66
3.2.5	LPS beeinflusst die <i>P. aeruginosa</i> -induzierte Apoptose nicht	67
3.2.6	Caspasenaktivierung durch <i>P. aeruginosa</i> -Infektion	69
3.3	Die Signaltransduktion über Todesrezeptoren	70
3.3.1	Zur Apoptoseinduktion ist CD95 in Jurkat-Zellen entbehrlich	70
3.3.2	Caspase-8 und FADD sind keine Bedingung für Apoptose	71
3.3.3	<i>P. aeruginosa</i> vermittelte Apoptose erfolgt über Mitochondrien	72
4	Diskussion	75
4.1	Apoptose durch das LPS von <i>P. aeruginosa</i>	77
4.2	Der Einfluss eines polaren epithelialen Zellverbands in der <i>P. aeruginosa</i> – induzierten Apoptose	81
4.3	Die modulierende Wirkung von CFTR auf die Apoptose durch den Keim <i>P. aeruginosa</i>	83
4.3.1	Die Beteiligung des Chloridkanals CFTR an der Apoptosemaschinerie der Zelle	84
4.3.2	CFTR beeinflusst via spezifischer <i>P. aeruginosa</i> - LPS – Interaktion die Apoptoseantwort	87
4.4	Der Signaltransduktionsweg von <i>P. aeruginosa</i> induzierter Apoptose	91
4.4.1	Die Rolle der Lipid-reichen Membranplattformen	93
4.4.2	Die Rolle von Apoptose vermittelt durch Todesrezeptoren	94
4.4.3	Die Rolle intrinsisch vermittelter Apoptose	95
4.5	Die Rolle der Apoptose für respiratorische Infektionen durch <i>P. aeruginosa</i>	98
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	109
7	Abkürzungsverzeichnis	123
8	Publikationsverzeichnis	124
9	Danksagung	125
10	Lebenslauf	127

1 Einleitung

1.1 Die nosokomiale Pneumonie

1.1.1 Epidemiologie

Die nosokomiale Pneumonie ist definiert als eine nach länger als 48 Stunden nach Krankenhausaufnahme auftretende Pneumonie.¹

Sie ist nach Infektionen des Urogenitaltrakts die zweithäufigste im Krankenhaus erworbene Infektion.¹⁰⁶

Die Inzidenz der nosokomialen Pneumonie variiert abhängig von den zugrunde liegenden Erkrankungen zwischen 5-10 Fällen pro 1000 Krankenhausaufnahmen. Die Wahrscheinlichkeit, eine nosokomiale Pneumonie zu erwerben, steigt mit der Dauer des Aufenthaltes auf einer Intensivstation; nach 7 Tagen beträgt die Rate 15,8% und nach 14 Tagen schon 23,4 %. Wenn man künstlich beatmete Patienten auf Intensivstationen als isoliertes Patientenkollektiv betrachtet, werden in der Literatur noch höhere Inzidenzen angegeben.⁷²

Das Risiko, eine nosokomiale Pneumonie zu erwerben, ist also durch den Einsatz von künstlicher Beatmung an sich erhöht und steigt mit zunehmender Beatmungsdauer: Eine Ventilator-assoziierte Pneumonie (VAP) findet sich nach 5 Tagen mechanischer Beatmung bei 5 % aller Patienten, nach 30 Tagen schon bei über 65 %.²⁶

Die Letalität einer nosokomialen Pneumonie wird mit Werten zwischen 14% und 38% angegeben¹⁰⁷, bei Hochrisiko Keimen wie *Pseudomonas aeruginosa* liegt sie sogar bei 42,8%.⁴⁵

Verglichen mit Patienten ohne Infektionen verursachen nosokomiale Pneumonien längere Liegezeiten (zwischen 6,5 und 25 Tagen)²⁷, höhere Behandlungskosten durch Erhöhung der behandlungsassoziierten Komplikationsrate und höhere Prävalenzen von Antibiotikaresistenzen.¹¹³

1.1.2 Pathogenese

In den meisten Fällen ist eine nosokomiale Pneumonie das Ergebnis von Mikroaspirationen der Bakterien, die den Oropharynx des Patienten besiedeln. Der oropharyngealen bakteriellen Besiedelung geht häufig die Kolonisierung des Magens mit pathogenen Keimen voran.¹² Bei künstlich beatmeten Patienten sammeln sich oropharyngeale Sekrete subglottisch oberhalb des Cuffs. Dies führt zur Mikroaspiration von Keimen in den Tracheobronchialbaum.

Die oropharyngeale Kolonisierung kann sowohl auf endogenem wie auch auf exogenem Wege erfolgen: auf dem endogenen Weg bewirten die Patienten ihre pathogenen Keime im Gastrointestinaltrakt schon vor der Aufnahme in ein Krankenhaus. Die Keime expandieren dann aufgrund eines antimikrobiellen Selektionsdrucks oder aufgrund der zugrunde liegenden Erkrankung. Im Fall der exogenen Kolonisierung erwerben die Patienten erst nach Krankenhausaufnahme ihren Keim, meistens durch horizontale Übertragung zwischen verschiedenen Patienten durch die Hände der Krankenhausmitarbeiter.⁷⁵

Auf alternativem Weg werden Patienten mittels der nicht belebten Umwelt kolonisiert. Beispielsweise können Keime auf Arbeitsflächen oder im Trinkwasser nachgewiesen werden.⁷⁵

1.1.3 Mikrobiologie

Es gibt vielfältige mikrobiologische Verursacher der nosokomialen Pneumonie. Diese Mikroorganismen teilen sich die Fähigkeit, einen Defekt der Lungenabwehr zu nutzen, der durch die pulmonalen oder systemischen Effekte der schweren Grunderkrankung oder deren Therapie verursacht ist.

Die mikrobielle Flora der betroffenen Patienten ist in vielen Fällen im Rahmen der Grunderkrankung oder einer begleitenden antibiotischen Therapie verändert. Das Spektrum der verursachenden Keime erstreckt sich von typischen Erregern für respiratorische Infektionen über atypischen Erregern zu symbiotischen Kommensalen. Auch Viren und Pilze kommen als Erreger von nosokomialen Pneumonien in Frage.² Die Prävalenz der Erreger hängt stark vom untersuchten Patientenkollektiv ab. Dabei spielen Grunderkrankung, Länge

des Krankenhausaufenthaltes, künstliche Beatmung und Antibiotikaexposition eine Rolle.⁸³ Im Folgenden handelt es sich um die Betrachtung des speziellen Patientenkollektivs, das an einer beatmungsassoziierten Pneumonie erkrankt ist. Bei 58 % der Proben, die aus diesen Patienten isoliert werden, handelt es sich um aerobe gram – negative Keime, gram – positive Kokken machen weitere 35 % aus. Der am häufigsten isolierte Erreger ist mit 24 % *P. aeruginosa*, gefolgt von *Staphylococcus aureus* mit 20 %.⁸³ Die beatmungsassoziierte Pneumonie durch *P. aeruginosa* ist eine schwerwiegende Komplikation auf Intensivstationen mit einer Letalitätsrate von 34 – 48 %.¹ Entsprechende *P. aeruginosa* Infektionen verlängern Krankenhausaufenthalte signifikant zwischen 4 und 42 Tagen.⁷⁷

P. aeruginosa ist für 10,1 % aller nosokomialen Infektionen verantwortlich.²¹

Die ambulant erworbene Pneumonie wird in 1,5 – 5 % der Fälle durch *P. aeruginosa* verursacht.¹⁰⁰ Bei in Pflegeheimen erworbenen Pneumonien wird in 4 % *P. aeruginosa* isoliert.²³

1.2 P. aeruginosa

1.2.1 Allgemeiner Überblick über P. aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa ist ein bewegliches, aerobes, gram-negatives, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Pseudomonaceae. Zu seiner Beweglichkeit tragen mehrere monotriche Geißeln bei. Die Familie der Pseudomonaceae ist eine Gruppe von Keimen, die in der Natur weit verbreitet vorkommt.⁵⁰ Sie sind vorwiegend in feuchter Umgebung zu finden. Ihr biochemischer Apparat erlaubt es ihnen, mit einer minimalen Menge an Nährstoffen zu überleben.⁸⁹ *P. aeruginosa* wird in Oberflächengewässern inklusive Ozeanen, im Erdboden und auf Pflanzen angetroffen. *P. aeruginosa* ist ein typischer intestinaler Keim des Menschen. *P. aeruginosa* kann in Handwaschbecken, Luftbefeuchtern und Oberflächen im Krankenhaus angetroffen werden. Krankenhauspersonal kann *P. aeruginosa* durch direkten Kontakt übertragen.

P. aeruginosa benötigt O₂ als terminalen Elektronenakzeptor. Daher wächst er in Nährbouillon an der Oberfläche unter Bildung einer Kahmhaut. Unter geeigneten Kulturbedingungen zeigen seine Kolonien auf Agar Metallglanz (aes = lat. Erz), was auf die Synthese der beiden Pigmente Pyocyanin und 1-Hydroxyphenazin zurückzuführen ist.¹⁰⁸ Unter den Mitgliedern der Familie der Pseudomonaceae ist *P. aeruginosa* das wichtigste humanpathogene Bakterium. Als Opportunist zeichnet sich *P. aeruginosa* dadurch aus, dass er meist nur abwehrgeschwächte Individuen befällt.

1.2.2 Membrangebundene Virulenzfaktoren

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist das wichtigste Oberflächenantigen von *P. aeruginosa*. Dieses amphiphile Molekül ist über den Lipidanteil in der äußeren Membran gram-negativer Bakterien verankert und ragt mit seinen hydrophilen Anteilen aus der Bakterienoberfläche. Der LPS-Komplex besteht aus dem Lipid A Anteil, dem Kern-Oligosaccharid und der O-spezifischen Polysaccharidseitenkette. Das Kern-Oligosaccharid und die O-spezifischen Polysaccharidseitenkette setzen sich aus sich wiederholenden Oligosaccharideinheiten zusammen. Sowohl das Lipid A als auch das Kern-Oligosaccharid sind sehr stetige Strukturbestandteile, während die O-spezifischen Polysaccharidketten einer enormen Variabilität ihrer Struktur und Zusammensetzung unterliegen.⁶⁴ Die innere Kernregion ist bei allen bisher untersuchten LPS-Molekülen verschiedener *P. aeruginosa* Stämme identisch.^{65,92} Manche *P. aeruginosa* Stämme synthetisieren zwei Glykoformen der äußeren Kernregion.⁶⁵ Auch die Struktur von Lipid A ist bekannt.^{11,68}

Bei akuten respiratorischen Infektionen durch *P. aeruginosa* beteiligt sich das vollständige LPS-Molekül als essentieller Virulenzfaktor, das in dieser vollständigen phänotypischen Ausprägung auch als „smooth“ LPS bezeichnet wird.¹⁰¹ Eine der Immunantworten des Wirtes auf diesen LPS - Phänotyp wird auf spezifische Art und Weise über Wirtsproteine vermittelt. Zu diesen Proteinen zählen Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP) und CD14 in membrangebundener (membrane-bound = mCD14) und löslicher Form (soluble = sCD14). Diese Proteine führen in Zusammenhang mit LPS zur Zellaktivierung

1. Einleitung

von Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen.^{103,35} Chronische respiratorische Infektionen mit *P. aeruginosa* hingegen führen zu einer Veränderung des LPS - Phänotyps. Das so genannte „rough“ LPS dieser *P. aeruginosa* Stämme zeichnet sich durch das Fehlen der O – spezifischen Seitenkette aus. Dadurch verliert das Serumkomplementsystem einen Angriffspunkt für seine bakterizide Wirkung. *P. aeruginosa* Stämme mit verändertem LPS sind weniger immunogen.^{85,94}

Die Ursache für einen Wechsel des Phänotyps während der chronischen Infektion ist nicht bis ins Detail bekannt. Möglicherweise erwirbt *P. aeruginosa* das veränderte LPS durch eine genetische Mutation. Dafür spricht, dass einige genetische Alterationen identifiziert worden sind, die zur stabilen Synthese des rough LPS führen.²⁵

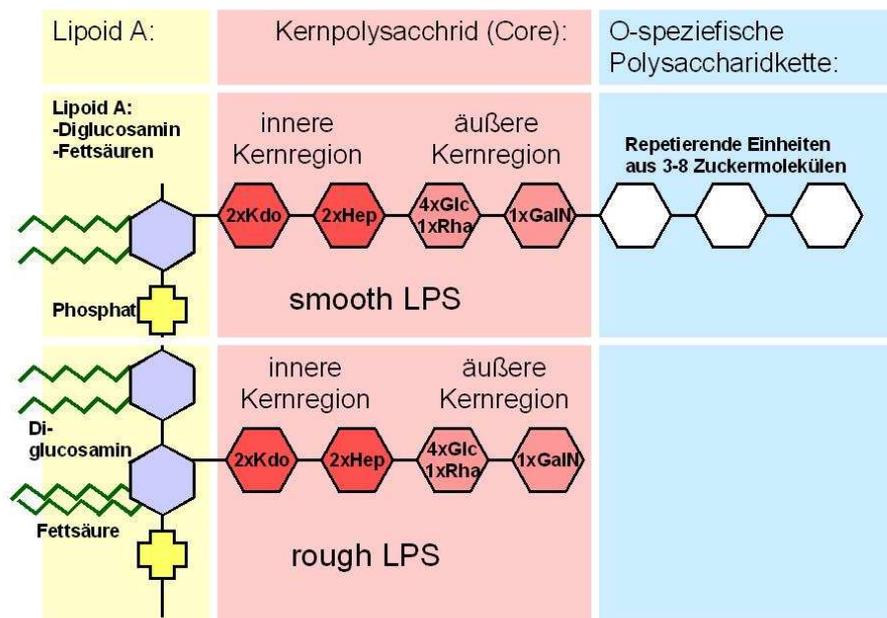


Abbildung 1: Lipopolysaccharide von *P. aeruginosa*. Der dreiteilige Lipopolysaccharidkomplex ist über den lipophilen Anteil in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* verankert. Bei chronischen Infektionen mit *P. aeruginosa* beherbergen betroffene Patienten meist Stämme, die phänotypisch verändert sind: sie synthetisieren ein LPS-Molekül, dessen O-spezifische Polysaccharidkette fehlt (rough LPS).

1.2.3 Sezernierte Virulenzfaktoren

P. aeruginosa sezerniert eine Reihe von Proteinen, die dem respiratorischen Epithel erheblichen Schaden zufügen können.

Für die Platzierung von prokaryoten Effektorproteinen in das eukaryote Zytosol haben eine Reihe von pathogenen gram-negativen Bakterien – so auch *P. aeruginosa* – das so genannte Typ III-Proteinsekretionssystem entwickelt.⁵⁹ Dieses trägt zur Virulenz des Keimes bei, indem die eingeschleusten Effektorproteine Funktionen der eukaryoten Wirtszelle alterieren.^{20,93} Vier Effektorproteine sind für *P. aeruginosa* derzeit bekannt: ExoS (Exoenzym S), ExoT (Exoenzym T), ExoU (Exoenzym U) und ExoY (Exoenzym Y).²⁹

Die Expression des Typ III- Sekretionsystems ist genau reguliert. Bekannte Faktoren, die die Expression induzieren, sind der Kontakt zur eukaryoten Wirtszelle, das Vorhandensein von Serum oder das Vorhandensein von Calcium Chelatbildnern.¹⁰⁴

1.3 Respiratorische Infektionen durch *P. aeruginosa*

Bei der Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Wirtsorganismus spielt der Ionenkanal CFTR eine bedeutende Rolle.

1.3.1 Der Ionenkanal CFTR und dessen Bedeutung bei respiratorischen Infektionen durch *P. aeruginosa*

CFTR ist ein epithelialer Chloridkanal, der abhängig von seinem Phosphorylierungszustand aktiv ist. CFTR ist Mitglied der ABC-Proteinfamilie (ATP-binding-cassette).⁴⁸ Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie die Energie der ATP-Hydrolyse zum aktiven Stofftransport durch Membranen verwenden. Seine Aktivität wird durch zelluläre Proteinkinasen und Proteinphosphatasen reguliert. In erster Linie ist er an der apikalen Membran lokalisiert, wo CFTR den Durchtritt von Chloridionen durch Epithelien ermöglicht und dessen Flussrate reguliert. In den Atemwegen, im Pankreas, im Darm und in den Schweißdrüsen ist CFTR maßgeblich an der Elektrolytsekretion und Absorption beteiligt. CFTR ist in der Lage, die Funktion und die Eigenschaften einiger epithelialer Chlorid-, Natrium- und Kaliumkanäle zu beeinflussen.⁵⁵

Während in gesundem respiratorischen Epithel CFTR regelmäßig an der apikalen Membran zu finden ist, führt die Interaktion der Zelle mit *P. aeruginosa* zum Einbau von CFTR an die basolaterale Membranseite durch Exozytose aus zytoplasmatischen Speichern.¹¹⁴ Durch das freigesetzte CFTR in die basolaterale Membran wird der Zelle erst ermöglicht, *P. aeruginosa* und sein LPS mittels Endozytose⁸⁸ zu internalisieren.^{30,71}

Bei der Endozytose des Keimes gilt CFTR als Rezeptor für das vollständige Oligosaccharid des äußeren Kerns des Lipopolysaccharids („smooth“ LPS) von *P. aeruginosa*. Dieser bakterielle Ligand ist unabdingbar für die Aufnahme des Bakteriums in die Zelle.⁸⁸ Für die LPS-Bindungsstelle von CFTR sorgen die Aminosäuren in Position 108-117 auf der ersten extrazellulären Schleife des Moleküls, die in spezifischer Weise mit *P. aeruginosa* LPS interagieren.⁸⁶ Die Menge an exprimiertem CFTR an der Zelloberfläche korreliert mit der Menge an internalisierten Bakterien.³⁶ CFTR hat damit die Eigenschaften eines „pattern recognition molecule“ (PRM), jedoch ist die Bandbreite der bakteriellen

Liganden, die es erkennt, geringer als vergleichbare Proteine dieser Gruppe.^{78,98} PRM der Säuger werden auch Toll-like Rezeptoren genannt. Die meisten anderen Rezeptoren dieser Gruppe erkennen ein weites Spektrum konservierter Muster, die vielen pathogenen Keimen gemeinsam sind. Genetische Defekte oder Polymorphismen der PRM-Gene scheinen in vielen Fällen die Anfälligkeit für Infektionen mit pathogenen Keimen zu bestimmen.⁶

Bei gesunden Individuen wird *P. aeruginosa* durch die Internalisierung in die respiratorische Epithelzelle aus dem Respirationstrakt entfernt. Die Internalisierung erfolgt durch die spezifische Bindung des Liganden *P. aeruginosa*-LPS an seinen Rezeptor CFTR. Es konnte in vivo gezeigt werden, dass die Möglichkeit der Internalisierung von *P. aeruginosa* durch die Expression von wild-typ CFTR in respiratorischem Epithel zu einer verbesserten Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt führte. Dabei konnten bei mikroskopischen Untersuchungen mit *P. aeruginosa* beladene Zellen nachgewiesen werden, die sich vom epithelialen Verband abgelöst hatten.⁹⁸

Die Schritte zwischen der Internalisierung von *P. aeruginosa* über CFTR an der Oberfläche von respiratorischen Epithelzellen und dessen nachfolgender Elimination aus dem Respirationstrakt sind erst unzureichend erforscht worden. Die Antwort der respiratorischen Epithelzelle auf die Internalisierung von *P. aeruginosa* ist bisher in vitro untersucht worden. Diese Experimente beziehen sich aber auf ein sehr kurzes Zeitfenster von 4 Stunden. In diesem kurzen, für eine Induktion von Apoptose nicht ausreichenden Zeitraum, verursachte die Interaktion zwischen LPS des Bakteriums und des CFTR-Kanals der Wirtszelle eine Aktivierung von NF κ B, einem Transkriptionsfaktor, der die Expression von Zytokinen und antimikrobiellen Peptiden veranlasst.⁹⁵ Von diesem Mechanismus wird angenommen, dass er maßgeblich an der angeborenen Immunität gegen *P. aeruginosa* beteiligt ist.

Nachfolgende Mechanismen, die dann letztlich zur Elimination von *P. aeruginosa* im gesunden Organismus führen, sind weithin unbekannt und sind Gegenstand aktueller Forschung.

1.3.2 Die Erkrankung zystische Fibrose als Modell zur Studie der CFTR-vermittelten Eliminationsmechanismen von *P. aeruginosa* im Respirationstrakt

Ein Modell zur Studie der Eliminationsmechanismen von *P. aeruginosa* ist die Erkrankung Zystische Fibrose (ZF). Diese Erkrankung ist die häufigste erbliche Stoffwechselerkrankung in der westlichen Welt, etwa eins von zweitausend Neugeborenen kaukasischer Abstammung ist betroffen.⁶⁹ Durch eine spezifische Mutation – am häufigsten ist die $\Delta F508$ Mutation⁶⁰ - des Proteins CFTR ist die Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt gestört. Der Mangel an funktionellem CFTR bei Mukoviszidosepatienten macht ZF-Patienten besonders anfällig für Infektionen mit *P. aeruginosa*. Ab einem Alter von 3 Jahren sind ZF-Patienten zu 97 % durch einen *P. aeruginosa* Stamm besiedelt¹³, letztlich kommt es dann zu chronisch – persistierenden Infektionen, die einen progredienten Lungenfunktionsverlust bedingen, der morbiditäts- und letalitätsbestimmend ist.¹⁰⁹

1.3.3 Keimelimination mittels Apoptose – ein hypothetisches Modell

Grundlage dieser Arbeit ist die Hypothese, dass es sich bei den bisher in vivo beobachteten, aus dem epithelialen Verband abgelösten Zellen, die mit *P. aeruginosa* beladen waren⁹⁸, um apoptotische Zellen handelt sowie dass die Apoptose respiratorischer Epithelzellen durch *P. aeruginosa* bei der Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt eine entscheidende Rolle spielt. Es wird postuliert, dass die Apoptose respiratorischer Epithelzellen durch *P. aeruginosa* in einer kausalen Beziehung zur Internalisierung von *P. aeruginosa* in die respiratorische Epithelzelle steht. Der spezifische Interaktionsmechanismus von *P. aeruginosa* - LPS und CFTR könnte an der Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* beteiligt sein. Im Verlauf des apoptotischen Vorgangs würde dann im immunkompetenten Wirt die mit pathogenen Keimen beladene Zelle und deren Zellbestandteile von Nachbarzellen und von zur Phagozytose befähigten Zellen aufgenommen und verdaut. Bisher ist die Rolle der Apoptose bei akuten oder chronischen *P. aeruginosa* - Infektionen des Respirationstraktes nicht bekannt.

1.4 Apoptose

Apoptose trägt in der Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod zur zellulären Homöostase bei.¹⁰ In mehrzelligen Organismen ist es von entscheidender Bedeutung, Zellwachstum und Differenzierung mit gleicher Effizienz wie den Zelltod zu regulieren. Der Zellumsatz findet in streng geordneten Bahnen statt.³² Apoptose ist wichtig, um mit pathogenen Keimen beladene Zellen zu vernichten. In vivo konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* im Respirationstrakt von Mäusen, die den Todesrezeptor CD95 und dem Liganden CD95L exprimieren, einen Überlebensvorteil gegenüber Mäusen haben, die eben diesen Rezeptor oder diesen Liganden nicht exprimieren. Die Apoptose durch *P. aeruginosa*, die über den Todesrezeptor CD95 und seinen Liganden CD95L vermittelt wird, scheint bei der Clearance von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt beteiligt zu sein.⁴² Im Folgenden soll in vereinfachter Form eine Übersicht über die zur Apoptoseinduktion notwendigen Prozesse gegeben werden.

Das respiratorische Epithel trennt den Organismus von seiner Umwelt und erschwert die Invasion von Mikroorganismen in das Lungengewebe. Respiratorische Epithelzellen sind über „tight junctions“ mit ihren Nachbarzellen verknüpft. Man unterscheidet den basolateralen Anteil der Zellmembran, der der Basalmembran zugewandt ist, von einem dem Lumen zugewandten Teil der Plasmamembran. Der gemessene transepitheliale Widerstand ist abhängig von der Dichte der „tight junctions“ zwischen benachbarten Zellen und ist umso höher, je dichter der epitheliale Verband abschließt. Die Aufnahme von *P. aeruginosa* durch respiratorische Epithelzellen ist abhängig von der Dichtigkeit, mit der die Epithelbarriere abschließt.³⁰ Weil die Endozytose von *P. aeruginosa* nicht am apikalen Membranabschnitt statt findet, muss *P. aeruginosa* zur Invasion in die Wirtszellen den basolateralen Membranabschnitt erreichen, was das Auflösen der Polarität des epithelialen Verbandes zur Bedingung hätte, da die basolateralen Abschnitte der Zellmembran nicht ohne Durchbruch der „tight junctions“ von luminal her zugänglich sind.¹¹⁴ Die bestmöglichen Bedingungen, um die LPS-CFTR-Interaktion hinsichtlich der Apoptoseinduktion zu untersuchen, sind daher dann gegeben, wenn man die Interaktionen an

unpolarisierten Epithelzellen durchführt.

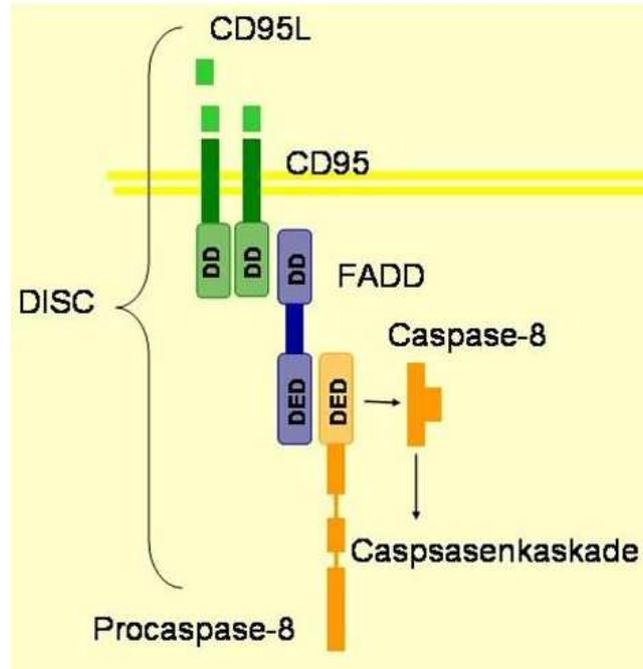
1.4.1 Induktionsmechanismen der Apoptose - Todesrezeptoren

Mehrzellige Organismen verfügen über vielfältige Systeme, Zellen rasch und selektiv durch Apoptose zu eliminieren. Voraussetzung dafür ist die Interaktion zwischen Oberflächenrezeptoren und ihren entsprechenden Liganden. Viele der Rezeptoren, die auf Differenzierung, Proliferation und Tod der Zelle Einfluss nehmen, gehören in die TNF-Rezeptorsuperfamilie.

CD95 ist ein wichtiger Rezeptor aus der TNF-Rezeptorsuperfamilie.⁸¹ CD95 ist ein 48 kD großes Glycoprotein mit einer einzigen transmembranären Domäne. Alle Rezeptormoleküle dieser Gruppe verfügen über eine Todesdomäne (death domain DD) an der Membranninnenseite, die die Transduktion des cytotoxischen Signals vermittelt.⁹⁹

Todesdomänen findet man sowohl als intrazelluläre Domäne von Todesrezeptoren als auch als Interaktionsdomäne von Adapterproteinen.¹⁷ Die Rezeptor-Ligand-Interaktion hat eine Oligomerisation mehrerer Rezeptormoleküle zur Folge, deren Todesdomänen mit intrazellulären Adaptermolekülen wechselwirken. Ein Adaptermolekül mit Todesdomäne (DD) ist zum Beispiel FADD.¹⁷ FADD weist an seinem N-Terminus eine DED (death effector domain) auf, die wiederum mit der N-terminalen DED von Procaspase-8 interagiert.⁷⁹ Zusammenfassend werden diese Vorgänge als DISC (death-inducing signaling complex) bezeichnet.

Abbildung 2 (umseitig): **Mechanismus der Signalübertragung über Todesrezeptoren.** Der Signalübertragungsweg über Todesrezeptoren wird durch Mitglieder der TNF Rezeptorensuperfamilie getriggert. Der CD95 Ligand bindet an CD95 und verursacht eine Ansammlung mehrerer CD95-Moleküle an der Zelloberfläche und die Initiation des DISC (death-inducing signaling complex). Dieser Komplex aktiviert mit Hilfe des Adaptermoleküls FADD Procaspase-8.



1.4.2 Mechanismen der Apoptoseinduktion – der intrinsische Weg

Apoptose kann einerseits über einen extrinsischen Weg mit an der Zelloberfläche situierten Rezeptoren und dessen Liganden initiiert werden, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde. Andererseits kann das Todessignal über einen endogenen Vorgang in der Zelle selbst vermittelt werden. Dieser intrinsische Weg wird nach Störung der intrazellulären Homöostase aktiv. Zellorganellen bleiben bei der Apoptose morphologisch intakt. Auf biochemischer Ebene finden jedoch Alterationen statt. Darunter findet man partielle Proteolyse und Permeabilisation von Membranen. Beeinträchtigungen unterschiedlicher Zellorganellen können nun eine koordinierte Abfolge von Signalen verursachen, die schließlich den apoptotischen Untergang der Zelle bedeuten.

Von dem Beginn der gemeinsamen Endstrecke sind morphologische und biochemische Eigenschaften apoptotischer Zellen identisch, unabhängig davon, ob der intrinsische oder extrinsische Weg am Beginn der Signalkaskade steht. Das bedeutet, dass eine „zentrale Vollstreckung“ des Todesprogramms erfolgt, woran die im nächsten Kapitel beschriebenen Caspasenkaskaden beteiligt sind. Das Mitochondrium ist das Zentrum der intrinsischen Apoptoseinduktion, wobei

die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran ein wichtiger Punkt in der Initiierung der intrinsischen Kaskade ist. Die Membranen des Mitochondriums werden proteindurchlässig und das mitochondrielle transmembranäre Potential ($\Delta\Psi_m$) bricht zusammen. Diverse mit dem Mitochondrium in Verbindung stehende Proteine sind am Schicksal der Zelle beteiligt. Antiapoptotische Mitglieder der bcl-2 Familie, wie bcl-2 und bcl-X_L, findet man in mitochondrialen Membranen wieder, wo sie lokal der Permeabilisierung entgegenwirken.⁶⁷

1.4.3 Mechanismen der Apoptoseinduktion - Die Caspasenkaskade

Die zentrale Ausführung der Apoptose wird durch Caspasen vermittelt, die sowohl am intrinsischen als auch am extrinsischen System entscheidend beteiligt sind. Sie gehören zur Enzymfamilie der Cysteinproteasen. Ein großer Teil der morphologischen Veränderungen, die apoptotische Zellen durchmachen, sind von Caspasen verursacht. Alle bisher bekannten Caspasen verfügen über einen Cysteinrest im aktiven Zentrum und zerlegen ihr Substrat nach einem Aspartatrest. Die unterschiedliche Substratspezifität von Caspasen wird von vier aminoterminalständigen Aminosäurebausteinen vor dem Aspartatrest determiniert.¹⁰² Alle Caspasen werden als Proenzyme (30-50 kD) exprimiert, die über drei Domänen verfügen, eine NH₂-terminale Domäne eine große Untereinheit p20 (~20 kD) und eine kleine Untereinheit p10 (~10 kD). Die Aktivierung von Caspasen erfordert die proteolytische Trennung der Untereinheiten, der dann die Anlagerung der kleinen und der großen Untereinheit zu einem Heterodimer folgt. Zwei Heterodimere vereinigen sich zu einem Tetramer mit zwei unabhängig von einander arbeitenden aktiven Zentren.²² Zur Aktivierung der Caspase wird das Zymogen zwischen der p20 und p10 Domäne von einer übergeordneten aktiven Caspase und üblicherweise auch zwischen der NH₂-terminalen Prodomäne und der p20-Untereinheit gespalten. Caspasen, die in der Zelle auf diese Weise aktiviert werden, sind die Caspasen mit kurzer Prodomäne, wie beispielsweise Caspase-3. Diese Caspasen sind in der Endstrecke der Caspasenkaskade angesiedelt und werden auch als Effektorcaspasen bezeichnet. Initiatorcaspasen werden auf anderem Weg aktiviert, beispielsweise wird Caspase-8, die Schlüsselcaspase für die Apoptosetriggung über Todesrezeptoren, dadurch aktiviert, dass nach

Rezeptor-Ligand-Interaktion mehrere Rezeptormoleküle an der Zelloberfläche oligomerisieren und schließlich mit Hilfe von Adaptermolekülen, wie beispielsweise FADD, mehrere Caspase-8 Zymogene sich einander nähern. Die hohe lokale Konzentration an Zymogenen erlaubt es den Procaspase-8 Molekülen, sich trotz der sehr geringen enzymatischen Aktivität des einzelnen Zymogens gegenseitig zu aktivieren.⁸⁰

Alle Procaspasen mit langer Prodomäne, wie z.B. Caspase-8, verfügen in ihrer Prodomäne über eine Protein-Protein-Interaktions-Einheit. Für Caspase-8 ist das eine DED (death-effector domain). Diese Module interagieren mit den entsprechenden Modulen anderer Proteine, beispielsweise kommt es zu einer Wechselbeziehung zwischen der DED von Procaspase-8 mit der DED von FADD (Abbildung 2).¹¹⁵

Ein komplexer Aktivierungsmechanismus ist für Caspase-9 beschrieben. Bei Caspase – 9 handelt es sich um die Initiatorcaspase des intrinsischen Apoptosemechanismus. Caspase-9 benötigt zwei Cofaktoren, um in ihren aktiven Zustand zu gelangen. Die Entstehung des Caspase-9-Holoenzym, auch Apoptosom genannt, erfordert das Vorhandensein von Cytochrom c und eine ATP-abhängige Oligomerisation von Apaf-1. Caspase-9 erreicht ihre volle enzymatische Aktivität weniger durch Proteolyse als viel mehr durch eine Konformationsänderung. Apaf-1 als regulatorische Untereinheit und Cytochrom c sind Teil des Holoenzym.^{7,14} Der Sinn einer solchen Kaskade liegt darin, das zytotoxische Signal zu amplifizieren, so dass die Aktivierung weniger Initiatorcaspasen ausreichen, um die Zelle an ihrem Vernichtungsprogramm zugrunde gehen zu lassen.¹⁰²

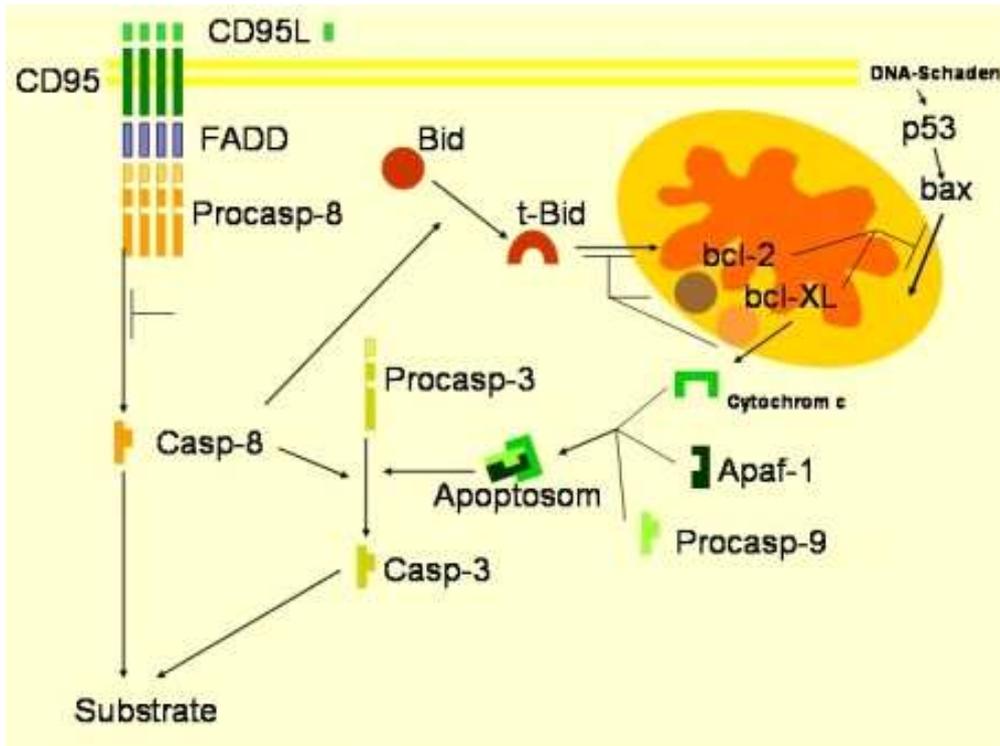


Abbildung 3: **Typische Apoptosekaskade.** Zusammenfassend sind hier zwei Signaltransduktionswege dargestellt, einerseits die intrinsische Apoptosetriggerung, illustriert am Beispiel einer DNS-Schädigung, und andererseits die extrinsische Apoptoseinduktion, ausgelöst durch CD95-Rezeptor-Ligand-Interaktion. Durch DNS-Schäden akkumuliert p53, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe von proapoptotischen bcl-2 Familienmitgliedern, wie z.B. bax, veranlasst. Bax gelangt über das Zytoplasma an die mitochondrielle Oberfläche, wo sie auf ihre, dort lokalisierten antiapoptotischen Familienmitglieder treffen, darunter bcl-2 und bcl-X_L, mit denen sie um die Vorherrschaft konkurrieren. Die Relation zwischen pro- und antiapoptotischen bcl-Proteinen bestimmt über das Schicksal der Zelle. Gewinnt die apoptotische Fraktion die Oberhand, kommt es zur Permeabilisierung der mitochondriellen Membran und zur Ausschüttung diverser Proteine ins Zytosol. Unter diesen Proteinen befindet sich Cytochrom c, das mit dem im Zytosol befindlichen Apaf-1 und Procaspase-9 wechselwirkt, um sich als Apoptosom zu vereinigen, das in der Sequenz Caspase-3 mobilisiert. Der extrinsische Weg führt zur Aktivierung von Caspase-8 durch enzymatische Spaltung. Beide Mechanismen der Apoptoseinduktion teilen sich die gemeinsame Endstrecke nach Aktivierung von Caspase-3. Zwischen intrinsischen und extrinsischen Todessignalen gibt es Wechselbeziehungen, eine davon ist das zytosolische bcl-2 Proteinfamilienmitglied Bid, das von Caspase-8 abhängig gespalten wird und als t-Bid (truncated Bid) ins Mitochondrium gelangt und dort die Freisetzung von Cytochrom c anregt. Trotzdem operieren beide Systeme in der Regel unabhängig von einander.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der Apoptose in der Pathogenese der respiratorischen Infektion durch *P. aeruginosa* untersucht. Folgenden Fragen wurden bearbeitet:

1. Löst *P. aeruginosa* LPS via Internalisierung durch CFTR in respiratorischen Epithelzellen Apoptose aus?
2. Intensiviert ein Fehlen zellulärer Polarität die Apoptoseantwort?
3. Moduliert die LPS – CFTR - Interaktion die Apoptoseantwort nach Infektion respiratorischer Epithelzellen mit *P. aeruginosa*?
4. Welcher Signaltransduktionsweg der Apoptoseinduktion wird durch *P. aeruginosa* aktiviert?

2 Material und Methoden

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und käuflich erworbene Lösungen

Tabelle 1: Chemikalien und käuflich erworbene Lösungen

	Accutase	L11-007	PAA Laboratories, Österreich
	Antibioticantimycotic solution	A-5955	Sigma, Steinheim Deutschland
	APS 10%	161-0700	Bio-Rad, München Deutschland
	Bromphenolblau	A5121	Roth, Deutschland
	Cell Death Detection Elisa	1544675	Roche, Mannheim Germany
	Choleratoxin	C-3012	Sigma, Steinheim Deutschland
	Cycloheximid	C-7698	Sigma, Steinheim Deutschland
	DAPI	D-9542	Sigma, Steinheim Deutschland
	DMSO	D-5879	Sigma, Steinheim Deutschland
	E. coli LPS O26:B6	L-2654	Sigma, Steinheim Deutschland
	ECGS	354006	BD Biosciences, Bedford USA
	EGF	354001	BD Biosciences, Bedford USA
	FCS	S-0115	Biochrom
	Geneticine	10131-0196	Gibco Invitrogen Corporation, Großbritannien
L-	Glucose	G-7526	Sigma, Steinheim Deutschland
L-	Glutamin	25030-024	Gibco Invitrogen Corporation, Großbritannien
	Glycerol	G-8773	Sigma, Steinheim Deutschland
	Glycerol 86%	G-8773	Sigma, Steinheim Deutschland
	Glycin	G-8898	Sigma, Steinheim Deutschland
	HAM' s F-12 nutrient mixture	2176-037	Gibco Invitrogen Corporation, Großbritannien
	HCl 32%	319	Merck, Deutschland
	Humanserum Typ AB	H-1513	Sigma, Steinheim Deutschland
	Hydrocortison	354203	BD Biosciences, Bedford USA
	Insulin	I-6634	Sigma, Steinheim Deutschland
	IPEGAL CA-630 (NP40)	I-17771	Sigma, Steinheim Deutschland
	Magermilchpulver instant		Naturaflor
	MEM non-essential amino acid solution	M-7145	Sigma, Steinheim Deutschland
2-	Mercaptoethanol	M-7522	Sigma, Steinheim Deutschland
	Methanol	106.018	Merck, Deutschland
	NaCl	S-5886	Sigma, Steinheim Deutschland
	Natriumcitrat	32320	Riedel-de Han AG, Deutschland

2. Material und Methoden

Natriumpyruvat	S-8636	Sigma, Steinheim Deutschland
Neomicin	N-1142	Sigma, Steinheim Deutschland
Paraformaldehyd	P-6148	Sigma, Steinheim Deutschland
PBS+	14040-091	Gibco Invitrogen Corporation, Großbritannien
Polyacrylamid mix 30%	161-0158	Bio-Rad, München Deutschland
Propidiumjodid	P-4170	Sigma, Steinheim Deutschland
Proteose Peptone	L85	Oxoid, Großbritannien
RPMI 1640	42401-018	Gibco Invitrogen Corporation, Großbritannien
SDS		Fluka
Staurosporin	S-4400	Sigma, Steinheim Deutschland
TEMED	161-0800	Bio-Rad, München Deutschland
Tetracyclin	T-3383	Sigma, Steinheim Deutschland
Transferrin	T-8158	Sigma, Steinheim Deutschland
Triiodthyronin	T-6397	Sigma, Steinheim Deutschland
Tris	A2264,1000	AppliChem, Deutschland
Tris/Glycin	161-0734	Bio-Rad, München Deutschland
Tris/Glycin/SDS	161-0732	Bio-Rad, München Deutschland
Triton X-100	X-100	Sigma, Steinheim Deutschland
Trypanblau	T-8154	Sigma, Steinheim Deutschland
TSA	4211043	Becton Dickinson, USA
TSB	211768	Becton Dickinson, USA
Tween 20	822184	Merck, Deutschland
Protein Assay	500-0006	Bio-Rad, München Deutschland
TNF alpha	T-0107	Sigma, Steinheim Deutschland

2. Material und Methoden

2.1.2 Bakterien

2.1.2.1 Materialien und Technische Geräte

Tabelle 2: Materialien und technische Geräte

Brutschrank	Heraeus Instruments, Deutschland
Schüttler	Infors AG, Schweiz
Vortex	Bender & Hobein AG, Schweiz
Glasröhrchen	Roth, Deutschland
McConkey Agar	126e heipha Dr. Müller GMBH, Deutschland
Tryptic Soy Agar	307e heipha Dr. Müller GMBH, Deutschland
Cetrimid Agar	110e heipha Dr. Müller GMBH, Deutschland
Wattestäbchen, steril	MSP Schmeiser GMBH, Deutschland

2.1.2.2 *P. aeruginosa* Stämme

Tabelle 3: Bakterienstämme und deren Eigenschaften

PAO 1v	Laborstamm Chloramphenicol sensitiv
Pak R1 algc::tet	algC-Mutation mit „rough“ LPS
NICU T10	Isolat eines Ausbruchs auf einer pädiatrischen Intensivstation
PA 149	klinisches Isolat aus einem ZF-Patienten im frühen Stadium der chronischen Infektion
PA 324	klinisches Isolat aus einem ZF-Patienten im frühen Stadium der chronischen Infektion

2.1.3 *P. aeruginosa* LPS

LPS T1	Komplettes LPS
LPS algc	LPS mit fehlenden O-spezifischen Seitenketten

2. Material und Methoden

2.1.4 Zellkultur

2.1.4.1 Materialien und technische Geräte

Tabelle 4: Für die Zellkultur benötigte technische Geräte und Materialien

sterile Werkbank Lamin Air HB 2472	Heraeus Instruments, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Deutschland
Brutschrank cytoperm 2	Heraeus Instruments, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Deutschland
Zellkulturflaschen 75 cm ²	TPP, Schweiz
Zellkulturflaschen 25, 12,5 cm ²	Becton Dickinson, USA
Zellschaber 1,8 cm	Costar Corning Incorporated, USA
6-Lochplatten	Cellstar Greiner, Deutschland
12-Lochplatten	Costar Corning Incorporated, USA
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nalge Nunc International, USA
Falcontubes 50 ml	Becton Dickinson, USA
Falcontubes 10 ml	Cellstar Greiner, Deutschland
Einmalpipetten 5, 10, 25, 50 ml	Becton Dickinson, USA
Lab Tecs mit 2 Kammern	Nalge Nunc International, USA
Neubauerzählkammer	Assistent, Deutschland

2.1.4.2 Zellkulturmedien

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mediums zur Anzucht der CFT1-Zelllinien

	Volumina	Stockkonzentration	Endkonzentration
HAM' s F-12	1000 ml		
Insulin	2 ml	5 mg/ml	10 µg/ml
Transferrin	2 ml	2,5 mg/ml	5 µg/ml
Hydrocortison	1 ml	1x10 ⁻³ M	1x10 ⁻⁶ M
EGF	1 ml	25 µg/ml	25 ng/ml
ECGS	1 ml	3,75 mg/ml	3,75 µg/ml
Triiodothyronin	200 µl	15x10 ⁻⁵	3x10 ⁻⁸ M
Choleratoxin	100 µl	100µg/ml	10 ng/ml

Das Zellkulturmedium für die CFT1-Sublinien CFT1-LCFSN, CFT1-LC3 und CFT1-ΔF508 enthält zusätzlich:

Neomicin	15ml	10 mg/ml	150µg/ml
----------	------	----------	----------

2. Material und Methoden

Tabelle 6: Zusammensetzung des Mediums zur Anzucht der C127-Zelllinien

	Volumina
RPMI 1640	1000ml
FCS hitzeinaktiviert 60min bei 57°C	100ml
Natriumpyruvat	10ml
nicht essentielle Aminosäuren	10ml
L-Glutamin	10ml
antibiotic-antimycotic solution	10ml
2-ME	20µl
L-Glucose	2,5g

Das Zellkulturmedium für die C127-Sublinien C127-w/t und C127-ΔF508 enthält zusätzlich zu einer Endkonzentration von:

Geneticine	500µg/ml
------------	----------

Tabelle 7: Zellkulturmedium für A-549 - Zelllinien

F-12 HAMs Zellkulturmedium	500 ml
FCS hitzeinaktiviert 60min bei 57°C	50 ml
antibiotic antimycotic solution	5 ml

Tabelle 8: Zellkulturmedium für Jurkat J16 und R-APO – Zelllinien

RPMI 1640 Zellkulturmedium	500 ml
FCS hitzeinaktiviert 60min bei 57°C	50 ml

Tabelle 9: Zellkulturmedium für Jurkat JA3 Zelllinien

RPMI 1640 Zellkulturmedium	500 ml
L-Glutamin	2mM
Natriumbikarbonat	1,5g/l
Natriumpyruvat	1mM
L-Glukose	4,5g/l
FCS hitzeinaktiviert 60min bei 57°C	50 ml

2.1.4.3 Gefriermedium

Tabelle 10: Das verwendete Gefriermedium

FCS hitzeinaktiviert 60 min bei 57°C	10 ml
DMSO	1 ml

2.1.4.4 CFT1-Zelllinien

CFT1-Zellen sind humane respiratorische Epithelzellen. Die Mutterzelllinie stammt ursprünglich von einem für die $\Delta F508$ -Mutation des CFTR-Genlocus homozygoten Mukoviszidosepatienten. Diese ursprüngliche Zelllinie ist durch ein humanes Papillomavirus (HPV 18E6/E7) immortalisiert worden. Die entstandene Mutterzelllinie CFT1-parental ist anschließend mit verschiedenen retroviralen Vektoren transfiziert worden. Bei der Vektorkontrollzelllinie CFT1-LC3⁸⁷ kodiert der Vector für eine β -Galaktosidase. CFT1-LCFSN⁷³ ist ein Derivat der Ursprungszelllinie CFT1-parental, bei der das Genprodukt der retroviral eingebrachten copy-DNA das funktionierende CFTR-Protein ist. Bei CFT1- $\Delta F508$ ⁸⁷ wurde in die Mutterzelle CFT1-parental eine weitere Kopie des $\Delta F508$ mutierten CFTR-Genortes eingebracht. CFT1- $\Delta F508$ überexprimiert somit den mutierten CFTR-Kanal. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 20% O₂, 5% CO₂). Alle CFT1 Zelllinien wurden in supplementiertem HAM's F12-Zellkulturmedium gehalten. Bei den Abkömmlingen der Ursprungszelllinie CFT1-parental, die eine retrovirale Alterierung erfahren haben (CFT1-LC3, CFT1-LCFSN und CFT1- $\Delta F508$), wurde das supplementierte Medium zusätzlich mit Neomycin in einer Konzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ versetzt. Sowohl Passage als auch Versuche erfolgten im subkonfluenten Zustand (ca. 70-90% Konfluenz). Für Passagen oder Versuche wurden die Zellen mit Accutase ausgelöst.

2.1.4.5 A549 Zelllinie

Die Zelllinie A549 ist ursprünglich aus Bronchialkarzinomgewebe eines 58-jährigen Mannes kaukasischer Abstammung isoliert worden. Sie besitzt typische epitheliale Eigenschaften und synthetisiert, den Alveolarzellen Typ II ähnelnd, Lecithin. ^{37,74} A549 Zellen wurden in serumhaltigem F12-Zellkulturmedium unter Standardbedingungen (37°C, 20% O₂, 5% CO₂) kultiviert.

2.1.4.6 Jurkat Zelllinien

Jurkat-Zellen sind humane leukämische T-Zellen, deren Subklon JA3 besonders sensibel auf CD95-abhängige Apoptoseinduktion reagiert. JA3 I2.1 und JA3 I9.2 sind Abkömmlinge der Mutterzelllinie JA3, die spezifische Mutationen im rezeptorvermittelten Apoptosesignaltransduktionsweg aufweisen. Die abgeleitete Zelllinie JA3 I2.1 verfehlt es, das Adapterprotein FADD zu exprimieren. JA3 I9.2 weist eine inaktivierende Mutation der Aktivatorcaspase 8 auf. Alle JA3-Jurkat-Zellen wurden in supplementiertem RPMI 1640 Zellkulturmedium unter Standardbedingungen kultiviert. ^{57,58} Die CD95-negative Jurkat Zelllinie R-APO und deren mütterliche Kontrollzelllinie J16 wurden ebenfalls unter Standardbedingungen kultiviert. ²⁰ Die Jurkat Zelllinie bcl w/t ist durch die Überexpression von bcl-2 im Gegensatz zur Vectorzelllinie bcl-2 vector gekennzeichnet. Die Überexpression von bcl-xL w/t kennzeichnet die Jurkat-Zelllinie bcl-xL w/t im Vergleich zu ihrer vector Zelllinie bcl-xL vector. Alle bcl-2 und bcl-xL Zellen wurden in supplementiertem RPMI 1640 unter Standardbedingungen kultiviert.

2. Material und Methoden

Tabelle 11: Kurzüberblick über die verschiedenen Zelllinien.

CFT1-parental	Mutterzelllinie homozygot DF508 Bronchialepithel
CFT1-DF508	homozygot DF508 + CFTR Allel
CFT1-LC3	homozygot DF508 + β -Galaktosidase Allel
CFT1-DF508	homozygot DF508 + DF508 Allel
A549	Bronchialkarzinomgewebe
J16	Mutterzelllinie Jurkat
R-APO	CD95 negativ
JA3	Mutterzelllinie Jurkat
JA3 I2.1	FADD negativ
JA3 I9.2	Caspase-8 inaktiviert
bcl-2 vector	Vektorzelllinie Jurkat
bcl-2 w/t	Überexpression bcl-2
bcl-xL vector	Vektorzelllinie Jurkat
bcl-xL w/t	Überexpression bcl-xL

2.1.5 DAPI-Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 12: Technische Geräte für die Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskop Leitz DM IRB	Leica, Deutschland
Fotoautomat Wild MP 552	Leica, Deutschland

Tabelle 13: Zusammensetzung der DAPI-Arbeitslösung

	Stockkonzentration	Endkonzentration	Volumen
DAPI	1 mg/ml	1 μ g/ml	10 μ l
Methanol (-20°C)			10 ml

2. Material und Methoden

2.1.6 Flußzytometrie

Tabelle 14: Technische Geräte und Materialien

Facsröhrchen	Becton Dickinson, USA
FACSSafe	Becton Dickinson, USA
FACSRinse	Becton Dickinson, USA
FACSflow	Becton Dickinson, USA
FACSSort	Becton Dickinson, USA

Tabelle 15: Fluoreszenzkonjugierte Marker und Antikörper

CaspACE fitc-VAD-FMK	G746A	Promega, Madison USA
M30 IgG2b	2 156 857	Roche

Tabelle 16: Zusammensetzung der zur Zellmarkierung nötigen Puffer

Inkubationspuffer für Zellzyklusanalyse

	Volumen oder Masse	Konzentration
PBS	500 ml	
Triton X-100	500 µl	0,1%
Natriumcitrat	500 mg	0,1%
Propidiumjodid	25 mg	50µg/ml

M30 CytoDEATH Inkubationspuffer

	Volumen	Konzentration
PBS	50 ml	
Tween20	50 µl	0,1%
BSA	100 µl	1%

M30 CytoDEATH Waschpuffer

	Volumen	Konzentration
PBS	500 ml	
Tween20	500 µl	0,1%

2. Material und Methoden

2.1.7 Western-Blotting

2.1.7.1 Technische Geräte und Materialien

Tabelle 17: Zur Durchführung eines Western-Blots benötigte technische Geräte und Materialien

Filterpapier	920-1987	Bio-Rad, München Deutschland
PVDF Membran 0,45µ	1722026	Boehringer Mannheim
Elektrophoresekammer	SE600	Hofer
Transferkammer	Trans-B	Bio-Rad, München Deutschland
Stromquelle	NPAC1000	Bio-Rad, München Deutschland
Photometer	3000pro	Ultraspec

2.1.7.2 Antikörper und Molekulargewichtsmarker

Tabelle 18: Antikörper und Molekulargewichtsmarker

Caspase-3/ CPP32	610323	BD Biosciences, USA
anti-Casp-8 (mouse mAb)		Labor S. Wesselborg
anti-mouse AP	AM14405	Biosource
anti-PARP (mouse mAb)	804-210-R050	Alexis
Rainbow-Marker	RPN800	Amersham Life Science, UK

2. Material und Methoden

2.1.7.3 Probenvorbereitung

Tabelle 19: Ingredienzien für den RIPA-Lysepuffer.

	Volumen oder Masse	Stockkonzentration	Endkonzentration
Destilliertes Wasser	75 ml		
NaCl	900 mg		
Tris Base	790 mg		
Die Lösung aus Tris und NaCl wird mit HCl auf den pH-Wert 7,4 eingestellt			
EDTA	1 ml	100 mM	
NP-40	10 ml	10%	
Mit destilliertem Wasser wird das Volumen auf 100 ml berichtigt			
Na ₃ VO ₄	18,39 mg		
NaF	4,199 mg		
Dieser Puffer ist bei 2-8°C haltbar. Kurz vor Gebrauch wird die benötigte Menge Lysepuffer (hier Angaben für 1 ml) durch folgende Reagenzien vervollständigt.			
Aprotinin	1 µl	1 mg/ml	1 µg/ml
Benzamidin	1 µl	1 mg/ml	1 µg/ml
Leupeptin	1 µl	1 mg/ml	1 µg/ml
Pepstatin	1 µl	1 mg/ml	1 µg/ml
PMSF	5 µl	200 mM	1 mM

Tabelle 20: Zusammensetzung für den 4x-SDS-sample-buffer.

	Volumen oder Masse
2-ME	300 µl
Bromphenolblau	2 mg
destilliertes Wasser	4,8 ml
Glycerol	1,5 ml
lower buffer	1,25 ml
SDS	0,615 g

2. Material und Methoden

2.1.7.4 SDS-PAGE

Tabelle 21: Polyacrylamidgelzusammensetzung.

lower buffer (pH 8,8):

	Volumen oder Masse	Endkonzentration
destilliertes Wasser	500 ml	
SDS	2 g	0,4%
Tris Base	90,85 g	1,5 M

upper buffer (pH 6,8):

destilliertes Wasser	500 ml	
SDS	2 g	0,4%
Tris Base	30,3 g	0,5 M

Tris/Glycin SDS-Polyacrylamidgel mit einem Gesamtvolumen von 20 ml:

	Volumina für 6%iges Gel	Volumina für 15%iges Gel
Acrylamid mix 30%	4 ml	10 ml
APS 10%	84 μ l	67 μ l
destilliertes Wasser	10,6 ml	4,6 ml
lower buffer	5,2 ml	5,2 ml
TEMED	8 μ l	7 μ l

	Volumina für 10ml Stacking Gel
Acrylamid mix 30%	1,7 ml
APS 10%	100 μ l
destilliertes Wasser	6,8 ml
upper buffer	1,35 ml
TEMED	10 μ l

Tabelle 22: Elektrodenlösung.

	Volumen oder Masse
destilliertes Wasser	1,8 l
Tris/Glycin/SDS buffer (10x)	200 ml

2. Material und Methoden

2.1.7.5 Western-Blot

Tabelle 23: Transferpuffer.

	Volumen oder Masse
destilliertes Wasser	2880 ml
Tris/Glycin buffer (10x)	320 ml
Methanol	800 ml

Tabelle 24: Waschpuffer TBS-T.

TBS (10x):

	Masse oder Volumen	Endkonzentration
Tris	24,2 g	200 mM
NaCl	80 g	1310 mM
destilliertes Wasser	1 l	
Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 mit HCl		

TBS-T (1x):

TBS-T (10x)	200 ml	20 mM
Triton X-100	1 ml	0,05%
destilliertes Wasser	1800 ml	131 mM

Tabelle 25: Blockierlösung.

blocking-buffer:

	Masse oder Volumen	Endkonzentration
TBS-T (1x)	50 ml	
Magermilchpulver	2,5 g	5%

2. Material und Methoden

Tabelle 26: Bestandteile der zur Detektion benötigten Puffer.

Tris HCl (pH 7,4):	Tris 1M mit HCl auf pH 7,4 eingestellt	
Detektionspuffer:		
	Volumen	Stockkonzentration
Destilliertes Wasser	44 ml	
NaCl-Lösung	1 ml	5 M
Tris HCl (pH 7,4)	5 ml	1 M
Färbelösung:		
	Volumen	
BCIP	76 μ l	
Detektionspuffer	20 ml	
NBT	100 μ l	

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Medienwechsel und Zellpassage der adhärennten Zelllinien CFT1 und A549

Im Folgenden beziehen sich die Mengenangaben der Gebrauchslösungen auf Zellkulturflaschen mit einer Anzuchtfläche von 75 cm². Entsprechende Volumina für Gefäße zur Zellanzucht anderer Größen sind der Tabelle 27 zu entnehmen.

Tabelle 27: Volumina für Zellpassage in Abhängigkeit der Flaschengröße

Behältnis	Volumen Zellkulturmedium	Volumen Accutase
75 cm ²	20 ml	10 ml
25 cm ²	10 ml	5 ml
10 cm ²	5 ml	2,5 ml
6-Loch-Platte je Loch	2,5 ml	1 ml
Lab-Tec	1 ml	Kein Ablösen

Die Frequenz, mit der ein Austausch des Zellkulturmediums notwendig wurde, ist von der jeweiligen Zellart und deren Wachstumseigenschaften abhängig und betrug zwischen 2 und 3 Medienwechseln pro Woche. Zum Mediumsaustausch

2. Material und Methoden

wurde das Altmedium verworfen, der Zellrasen mit 20 ml PBS⁺ durch vorsichtiges Schwenken gespült und anschließend der Zellrasen mit 20 ml Zellkulturmedium bedeckt. Sobald sich der adhärenzte Zellrasen einen subkonfluenten Zustand erreichte (70-80% Konfluenz), konnte die Zellmenge einer Flasche auf weitere 3 Flaschen verteilt werden. Für eine so genannte Zellpassage wurden die Zellen nach Ausschwenken des Zellrasens mit PBS⁺ von ihrer Unterlage gelöst. Dazu wurde der Zellrasen mit 10 ml Accutase versehen und bei 37°C für 10 min inkubiert, anschließend mit Hilfe eines Zellschabers von ihrem Untergrund gelöst und die so gewonnene Zellsuspension in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben (Falcontube), dessen Überstand nach 5 Minuten Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 20°C) dekantiert wurde. Das auf diese Art gewonnene Zellpellet konnte in Zellkulturmedium resuspendiert werden und je ein Drittel der Suspension pro Zellkulturflasche weiterkultiviert werden.

Zum Einfrieren wurde das Pellet einer 75 cm² Zellkulturflasche in 3-4 ml Gefriermedium resuspendiert. Je 1 ml wurde in ein 1,8 ml Kryoröhrchen gefüllt. Anschließend wurden die Einfrierproben über Nacht bei -20°C gelagert, am nächsten Tag auf -80°C umgesetzt und am darauf in flüssigem Stickstoff als Zellreserve eingefroren. Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen aus dem Stickstoff im Wasserbad (37°C) rasch erwärmt. Sobald der Inhalt flüssig war, wurde er in ein vorbereitetes, mit 30 ml un-supplementiertes Zellkulturmedium befülltes Falcontube überführt, das daraufhin zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 20°C) wurde. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Vollmedium resuspendiert, in eine 25 cm² Zellkulturflasche pipettiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurde das Pellet einer 75 cm² Zellkulturflasche in 1 ml supplementierten Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 20 µl entnommen, die 1:1 mit der Trypanblaulösung vermischt wurden. Mit dieser Zellsuspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer die Zellkonzentration ermittelt. Durch angemessene Verdünnung der Stammzelllösung erreicht man es, die Konzentration dieser Lösung auf 1x10⁶ Zellen/ml zu justieren. Diese Zelllösung mit definierter Konzentration erlaubt es, zu Versuchszwecken festgelegte Zellzahlen

auszusäen. Beim alleinigen Umsetzen der Zellen wurden die Zellzahlen nicht bestimmt. Das Pellet einer 75 cm² Zellkulturflasche wurde nach Resuspension in Medium, das alle Zusätze enthält, auf drei 75 cm² Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.2 Herstellung einer geeichten Bakteriensuspension

Für den Versuchstag benötigte *P. aeruginosa* Stämme wurden am vorhergehenden Tag aus der bei -80°C eingefrorenen Kryoröhrchenreserve aufgetaut. Mit einem langstieligen Wattestäbchen wurde über die gefrorene Oberfläche der *P. aeruginosa*-Suspension in TSB-Einfriermedium, bestehend aus TSB, das mit 10% Glycerol versetzt war, gefahren. Die am Wattestäbchen haftenden Bakterien wurden auf TSA ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank (37°C) bebrütet. Am Versuchstag wurden die über Nacht gewachsenen Bakterien mit Hilfe des Wattestäbchens in einen mit 50 ml TSB gefüllten Erlenmeyerkolben überführt. Die Bakterien wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (mid-log Phase) auf dem Schüttler bei 37°C und 220 rpm 3 Stunden lang bebrütet. Zur Infektion der Zellen wurde anschließend ein Infektionsmedium mit einer determinierten Bakterienkonzentration, die in etwa 2×10^8 kolonieformende Einheiten/ml beträgt, hergestellt. Dazu wurden die 50 ml Bakteriensuspension in TSB zentrifugiert (6000 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in Leermedium resuspendiert (RPMI 1640 für Jurkats, HAM' s F12 für CFT1- und A549-Zelllinien). Mittels Photometer wurde die optische Dichte der Suspension bei einer Wellenlänge $\lambda = 650$ nm des Infektionsmediums auf eine optische Dichte von 0,4 eingestellt, wobei das Leermedium zum Nullabgleich diente. Entsprechend der Zellzahl und der angestrebten Infektionsdosis wurde das Infektionsmedium verdünnt und nach Entnahme des Zellkulturmediums das Infektionsmedium auf den Zellrasen aufgetragen. Die infizierten Zellen wurden anschließend für 6 Stunden mit dem Infektionsmedium zur Initiierung von Apoptose inkubiert. Handelte es sich um Zellen in Suspension, so wurde vor der Infektion die Zellsuspension pelletiert und anschließend das Zellpellet in Infektionsmedium resuspendiert. Zur Bestätigung der Bakterienkonzentration im Infektionsmedium mit einer optischen Dichte von 0,4 wurde eine Verdünnungsreihe mit dem Verhältnis 1:10 hergestellt. Dadurch konnte die

2. Material und Methoden

exakte Bakterienkonzentration in CFU/ml (colony forming units/ml) ermittelt werden.

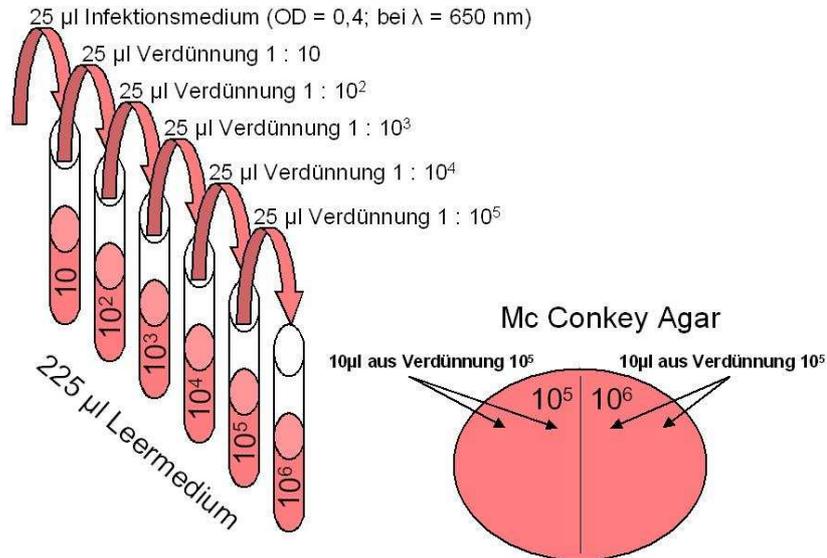


Abbildung 4: Herstellung einer Verdünnungsreihe zur Bakterienzahlbestimmung. Zur Überprüfung der Bakterienkonzentration wurde nach Herstellen einer Verdünnungsreihe mit 1 : 10 Verdünnungsschritten je zwei mal 10 µl aus der 10⁵ fachen und der 10⁶ fachen Verdünnung auf McConkey Agar ausplattiert, über Nacht bei 37°C inkubiert und am darauf folgenden Tag ausgezählt. Die Konzentration koloniebildender Einheiten in der Einheit CFU/ml ergab sich aus der Menge der ausgezählten Kolonien multipliziert mit der Verdünnung dividiert durch das ausplattierte Volumen, in diesem Fall 10 µl.

2.2.3 Infektionsversuche bei Zellen in Suspension

Bei allen Versuchen mit A549- und CFT1-Zelllinien mit aufgehobener Zellverbandsintegrität und Polarität und mit den nicht adhärenen Jurkat-Zelllinien wurde der Versuchszellenpool in Zellsuspension mittels Zellzählung mit Trypanblau auf eine Zellkonzentration von 1 x 10⁶/ml geeicht und zu je 2 x 10⁵ Zellen pro Versuchsröhrchen aufgeteilt. Die Versuchsröhrchen wurden pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in Infektionsmedium entsprechender Infektionsdosis resuspendiert und für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Infektionsdosis wurde in MOI (multiplicity of infection) angegeben.

2.2.4 Infektionsversuche bei adhärenenten A549- oder CFT1-Zellen

Für den Versuchsansatz wurde nach Ausschwenken des Zellrasens mit PBS⁺ das Infektionsmedium aufgetragen. Die Zellen wurden anschließend zwischen 2 und 12h inkubiert (37°C, 20% O₂, 5% CO₂). Daraufhin wurde das Infektionsmedium abgenommen und in supplementierten Medium unter Zusatz eines Aminoglykosidantibiotikums weitere 12 bis 48 Stunden nachinkubiert. Für die CFT1-Zelllinien wurde Neomycin zu einer Endkonzentration von 150 µg/ml zugefügt. Nach Ablauf der Nachinkubationszeit wurden sowohl die sich im Überstand befindlichen als auch die adhärenenten Zellen weiterverarbeitet. Zum Auslösen der Zellen kam Accutase zum Einsatz.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an einen zellulären Liganden oder einen monoklonalen Antikörper erlauben es, die Dichte und Verteilung des entsprechenden Rezeptors sowohl für Determinanten an der Zelloberfläche als auch für zytoplasmatische Parameter zu bestimmen. Mit Hilfe einer Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen können einzelne zelluläre Eigenschaften wie der Gehalt an DNS oder das mitochondrielle Membranpotential direkt bestimmt werden. Um die Bedeutung und Genauigkeit flusszytometrischer Ergebnisse besser erfassen zu können, sollen an dieser Stelle die Grundprinzipien der Funktionsweise eines Flusszytometers erläutert werden.

2.2.5.1 Das Flusssystem

Das Flusssystem eines Flusszytometers hat den Zweck, die suspendierten Partikel einer Probe einzeln an einen spezifischen Raumpunkt zu befördern. Dort werden sie durch den Strahl der Lichtquelle (LASER) vermessen.

Die vorgegebene Zellsuspension wird über eine Strahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Beim Eintritt in die Messkammer geraten die suspendierten Partikel in einen laminaren Strom, wo sie durch hydrodynamische Fokussierung im Zentrum der Messküvette angeordnet werden und auf diese Weise vermessen werden können.

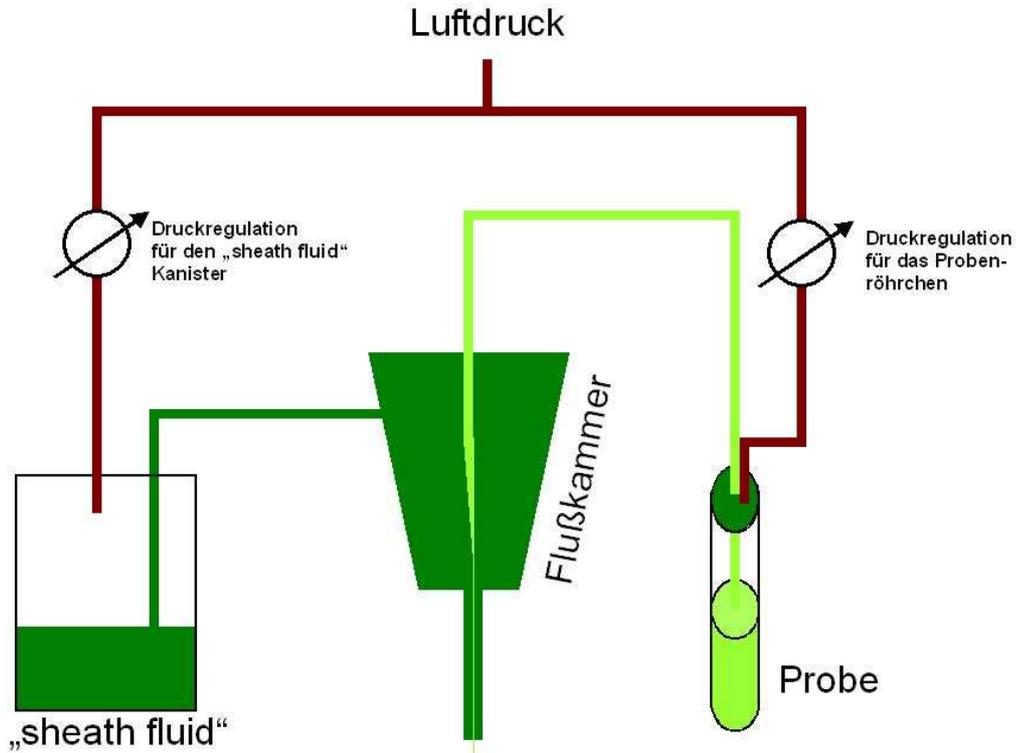


Abbildung 5: **Schema des Flusssystems eines Flusszytometers.** Die Flusskammer wird über zwei unterschiedliche Flüssigkeitszuleitungen versorgt. Während das „sheath fluid“ kontinuierlich durch die Flusskammer fließt, angetrieben durch den am „sheath fluid“ Kanister angelegten Luftdruck, kann die Flussrate (High: $\sim 60 \mu\text{l} / \text{min}$, Medium: $\sim 35 \mu\text{l} / \text{min}$, Low: $12 \mu\text{l} / \text{min}$) der Probenzuleitung individuell verstellt werden, um optimale Flusseigenschaften zu gewähren.

2.2.5.2 Das Meßsystem

Ein Flusszytometer misst Lichtintensitäten. Einerseits misst es gestreutes oder gebrochenes Licht einer Lichtquelle, andererseits misst es nach Anregung von Elektronen eines fluoreszierenden Moleküls emittiertes Licht. Herzstück aller Messungen sind somit Photodetektoren, die die Energie eines Lichtquants in ein elektrisches Signal wandeln. Die Prozessierung dieser elektrischen Signale erlaubt schließlich eine graphische Darstellung und statistische Auswertung der gemessenen Parameter. Als Lichtquelle dient ein LASER, der einen sehr

2. Material und Methoden

schmalen, polarisierten Lichtstrahl einer spezifischen Wellenlänge (488nm) erzeugt. Durch die Sammellinse, die in der Laserachse angeordnet ist, wird gestreutes Licht - bevor es auf den Photomultiplier für das FSC (forward scatter) fällt - gebündelt. Rechtwinklig dazu ist eine weitere Sammellinse angeordnet, die der Bündelung von gebrochenen Laserlichtstrahlen und von dem von angeregten Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Lichts dient. Um eine hohe Sensitivität für die Messung der Fluoreszenz zu gewährleisten, ist diese Sammellinse mit einer hohen numerischen Apertur versehen. Durch die Anordnung der optischen Filter wird erreicht, dass die Mischung aus gestreutem Licht und Emissionsspektrum verschiedener Farbstoffe mit unterschiedlichen Wellenlängen aufgetrennt werden. Gewährleistet wird dieser Effekt durch Interferenzfilter, die Lichtstrahlen unterhalb einer bestimmten Wellenlänge absorbieren, während Licht mit größerer Wellenlänge hindurchtritt.

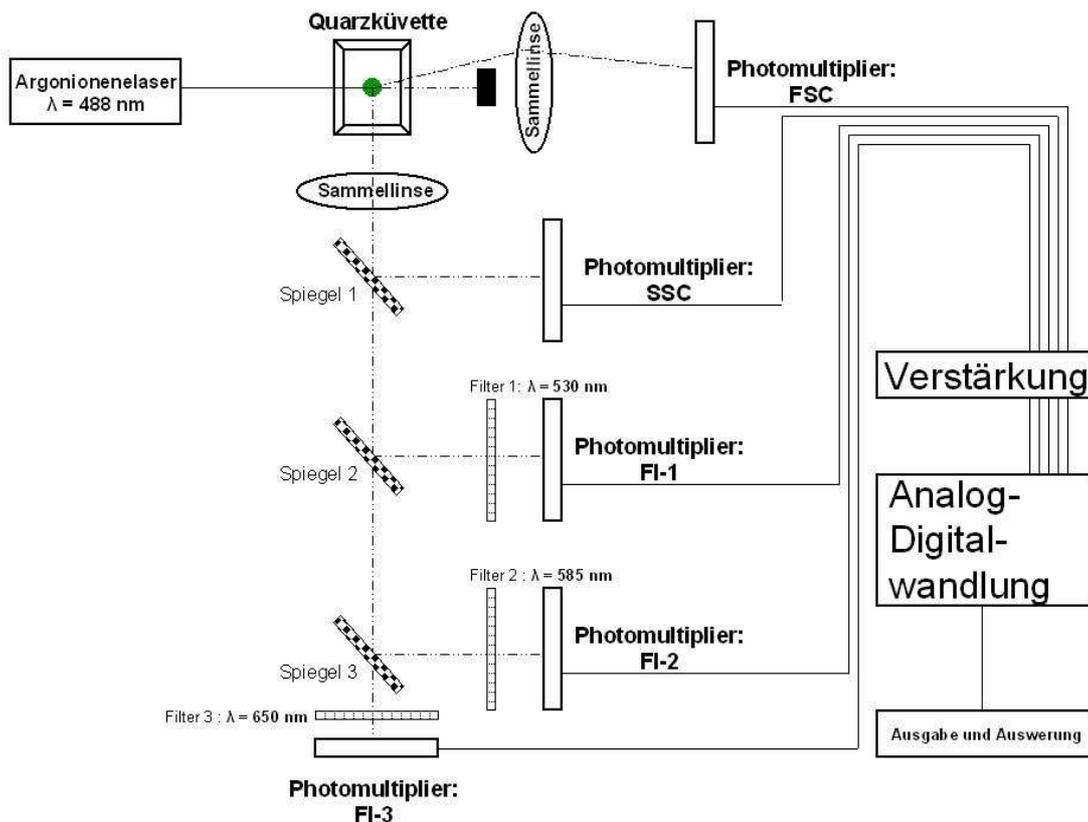


Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des Meßsystems. Nähere Erläuterung siehe Text.

2.2.5.3 Prozessierung des Signals

Das Licht, das auf einen Photomultiplier fällt, generiert einen Strom, der einem Verstärker zugeführt wird. Als Ergebnis bekommt man einen geglätteten Spannungsimpuls zwischen null und zehn Volt. Die Amplitude des Impulses ist proportional zur Anzahl der Photonen, die auf den Photomultiplier getroffen sind. An dieser Stelle kann eine Spannungsschwelle („threshold“) angegeben werden, die ein Impuls erreichen muss, um weiterverarbeitet zu werden, damit ist es dem Nutzer möglich, unnötiges Rauschen zu unterdrücken. Diese Schwelle wird für einen einzelnen Messparameter gesetzt. Bei den vorliegenden Versuchen wurde die relative Größe des Partikels als Selektionskriterium festgelegt (FSC: forward scatter). Dieses einzelne Signal triggert alle übrigen Messkreise, so dass die Vermessung eines Partikels nur dann erfolgt, wenn der Spannungsimpuls für das FSC eine bestimmte Schwelle überschreitet. Zur Weiterverarbeitung des Signals muss dieses auf einem analogen Speicher festgehalten werden, dem „sample and hold“ Schaltkreis. Solange dieser aktiviert ist, ist das Flusszytometer „blind“ für die durch die Messküvette fließenden Partikel. Schließlich wird das Signal nochmals verstärkt, wahlweise linear oder logarithmisch. Eine logarithmische Verstärkung des Signals wird in der Regel für die Verarbeitung der Fluoreszenzintensitäten gewählt, was den Vorteil hat, dass schwächere Signale verstärkt werden, während hohe Signale komprimiert werden. Zur Ausgabe und Analyse der Messwerte auf Rechnersystemen werden die analogen Signale schließlich digitalisiert. Der Analog-Digitalwandler überführt die analoge, kontinuierliche Spannungsreihe in eine diskrete Skala, die durch binäre Zahlen dargestellt werden kann. Das Skalenintervall bei der Konversion bestimmt die Auflösung der Messungen. Eine 10-bit Auflösung entspricht einer Skala mit 1024 Elementen. Mit linearer Verstärkung können auf dieser Skala maximal Lichtintensitätsunterschiede in 1000facher Höhe sichtbar gemacht werden, hingegen können in dieser Skala dargestellte Ereignisse durch logarithmische Verstärkung sich um das 10000fache unterscheiden.

2.2.5.4 Analyse und Darstellung

Die erworbenen Daten wurden mit Hilfe der CellQUEST-Software in Schaubildern dargestellt. Bei den so genannten dot-plots werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen. Das einzelne Ereignis erscheint dabei als Punkt, die vermessene Zellpopulation der Probe als Punktwolke (Abbildung 7).

In Histogrammen (Abbildung 8) werden auf der Ordinate die Anzahl der Ereignisse und auf der Abszisse der gemessene Parameter aufgelistet. Das Softwareprogramm macht es möglich, Subpopulationen zu markieren, farblich voneinander abzusetzen und einer statistischen Auswertung zu unterziehen.

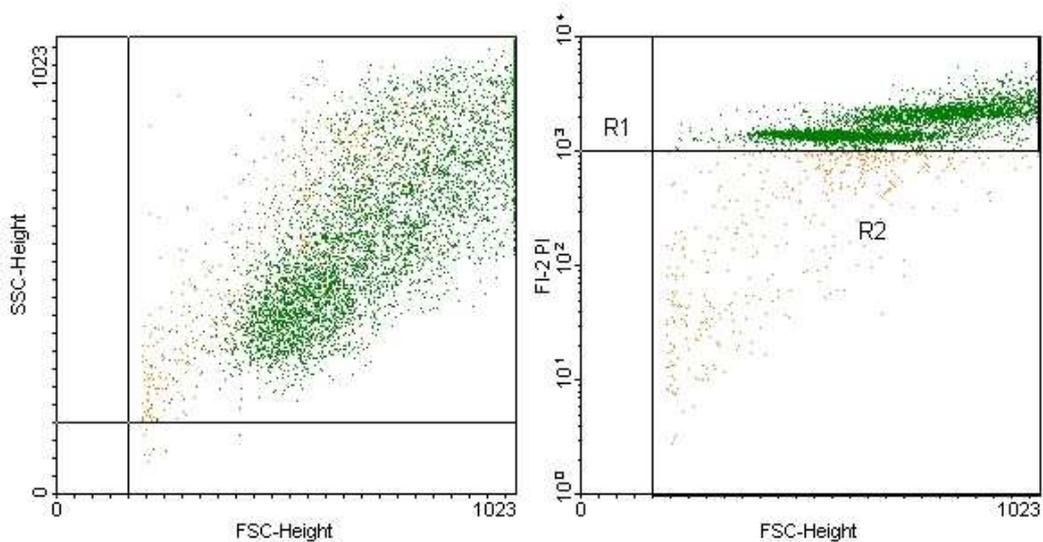


Abbildung 7: Darstellung einer Zellzyklusmessung in Dot-Plot-Schaubildern.

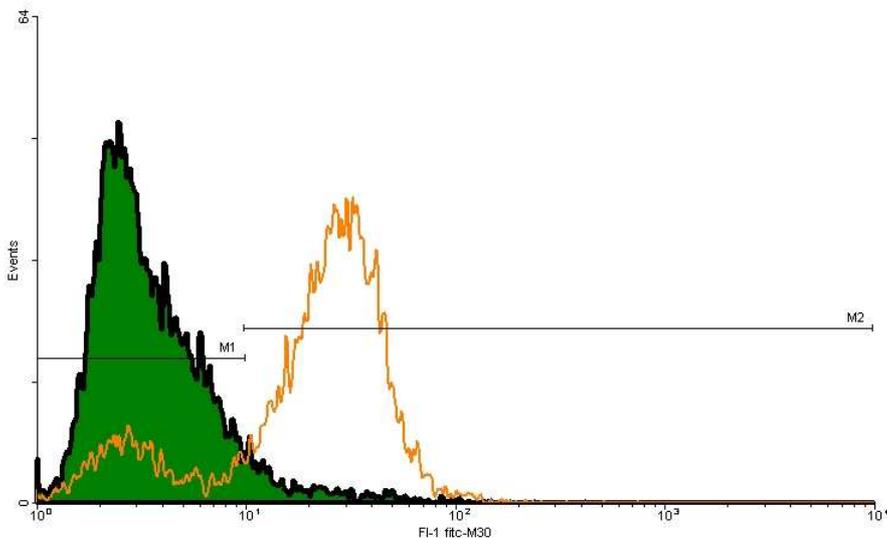


Abbildung 8: **Darstellung der Messdaten in Histogrammform.** Im vorliegenden Schaubild wurden die Daten zweier mit M30 gefärbter Proben übereinander projiziert.

2.2.5.5 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenz entsteht, wenn ein Molekül, nachdem es durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt worden ist, in seinen Grundzustand zurückkehrt. Da sich die Wellenlängen des anregenden Lichts von der des emittierten Licht unterscheiden, können sie durch optische Filter voneinander getrennt werden.

Tabelle 28: Für die Fluoreszenzmikroskopie und Flußzytometrie genutzte Fluorochrome mit deren Exzitations- bzw. Emissionsmaxima.

	Exzitation	Emission
Fluoreszeinisocyanat (FITC)	495 nm	520 nm
Propidiumjodid	342 nm	639 nm
4,6-Diamidino-2-phenylindol DAPI	372 nm	465 nm

2.2.5.6 Probenvorbereitung

Anschließend an einen Infektionsversuch (in Abschnitt 2.2.4 detailliert aufgeführt) wurden für jeden Ansatz drei unterschiedliche Färbungen parallel durchgeführt. Der Überstand jeder Vertiefung einer Zellkulturplatte wurde zu

gleichen Teilen auf drei FACS-Röhrchen verteilt. Die adhärennten Zellen wurden mit Accutase ausgelöst und jeweils ein Drittel der Zellen zum entsprechenden Überstand in das FACS-Röhrchen pipettiert. Die mit der Zellsuspension befüllten Röhrchen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die pelletierten Zellen in 3 ml PBS⁺ resuspendiert, kräftig durchmischt und anschließend erneut zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 20°C). Nach diesem Waschschrift hat man die Röhrchen der unterschiedlichen Färbereihen nach divergierenden Schemata weiterverarbeitet.

2.2.5.7 CytoDEATH M30 Färbung

Fitc-M30 ist ein fluoreszeinkonjugierter monoklonaler Antikörper, der spezifisch an das von Caspasen gespaltene, intrazellulär lokalisierte Zytokeratin 18 bindet. Es ist bekannt, dass nach Aktivierung der Caspasenkaskade, ein frühes Ereignis während des Apoptoseprozesses, zur Reorganisation von Intermediärfilamenten kommt, unter anderem zur Caspase-vermittelten Spaltung von Zytokeratin 18. Fitc-M30 detektiert dabei ein Ende des gespaltenen Zytokeratin 18, das in lebenden Zellen nicht zugänglich ist. Somit ist fitc-M30 ein Marker für die Frühphase des Apoptosevorgangs. Die Zellpellets der für M30-FACS-Röhrchenreihe wurden in 300 µl eisgekühltem, reinen Methanol (-20°C) resuspendiert gut durchmischt und im Gefrierfach bei -20°C für 30 Minuten inkubiert. Daran schlossen sich zwei Waschriffe mit M30-Waschpuffer an. Nach dem letzten Waschrift wurden die Zellpellets in 100 µl Antikörper-Arbeitslösung, die man kurz vor Gebrauch durch Verdünnung der Antikörperstammlösung in einem Verhältnis von 1:250 mit M30-Inkubationspuffer herstellte, resuspendiert. Nachdem man die Röhrchen ausreichend geschüttelt hatte, wurden sie 60 Minuten lang bei Raumtemperatur belassen, um nach Ablauf der Inkubationszeit und nach Verdünnung mit 500 µl PBS⁺ pro Röhrchen die flusszytometrische Messung durchzuführen.

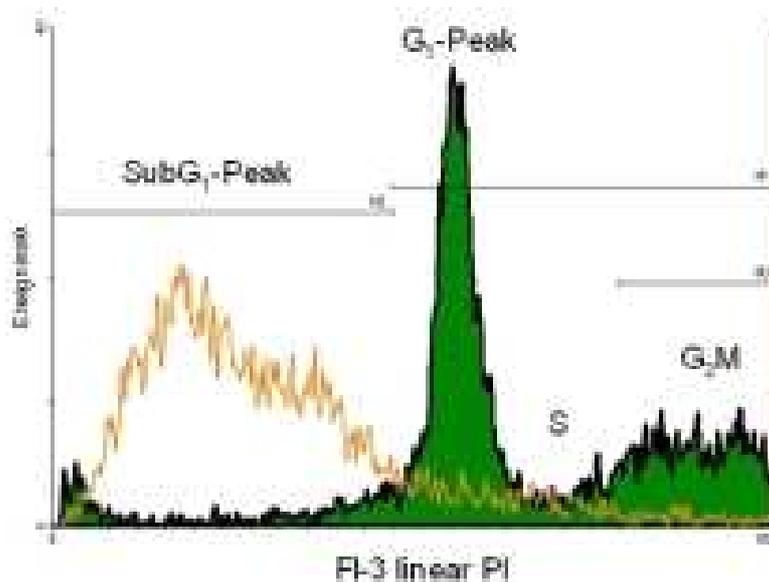
2.2.5.8 Fitc-Vad-FMK-Färbung

Fitc-Vad-FMK ist ein mit Fluoreszeinisocyanat (fitc) konjugierter Caspaseinhibitor (Vad-FMK). Fitc-Vad-FMK ist membrangängig und bindet intrazellulär an aktivierte Caspasen, daher ist Fitc-Vad-FMK ebenfalls ein

Marker für frühe Apoptose. Die Pellets für diese Testreihe wurden in 100 μl der Fitc-Vad-FMK-Arbeitslösung resuspendiert. Die Arbeitslösung wurde kurz vor Gebrauch aus Aliquots der Stammlösung hergestellt, indem die Stammlösung mit PBS⁺ zu einer Endkonzentration 10 μM verdünnt worden ist. Anschließend wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, darauf mit PBS⁺ gewaschen und in der Zellfixierungslösung (1% Paraformaldehyd in PBS⁺) resuspendiert.

2.2.5.9 Färbung für die Zellzyklusanalyse

Diese Methode basiert auf dem Nachweis der während des Apoptosevorgangs auftretenden DNS-Degradierung. Durch Permeabilisierung der Zellmembran penetrieren kleinere DNS-Bruchstücke nach extrazellulär und vermindern damit den DNS-Gehalt der Zelle, wodurch apoptotische Zellen als SubG₁-Peak im DNS-Histogramm detektierbar werden, nachdem die DNS mit Propidiumjodid markiert worden ist. Dieses Fluorochrom erlaubt eine quantitative Bestimmung des DNS-Gehalts einer Zelle.



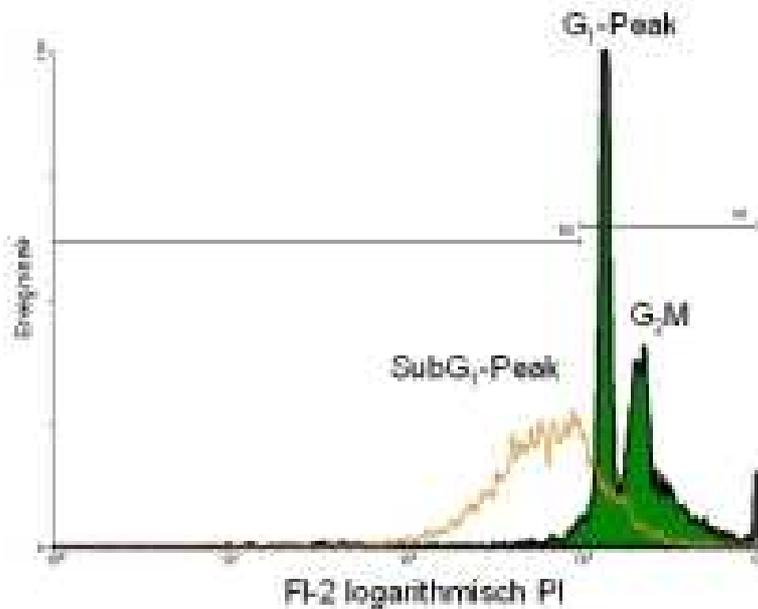


Abbildung 9 (auch umseitig): **Beispiel für ein DNS-Histogramm.**

Die Zellen der entsprechenden Röhrcchen wurden im Anschluss an die Probenvorbereitung (Abschnitt 2.2.5.6) mit dem dafür vorgesehenen Inkubationspuffer versehen und nach einer zweistündigen Inkubationszeit vermessen.

2.2.6 DAPI-Fluoreszenzmikroskopie

Bei 4,6-Diamidino-2-phenylindol handelt es sich um einen Farbstoff, der selektiv Desoxyribonukleinsäure (DNS) anfärbt. Färbt man eine Zellpopulation mit diesem Kernfarbstoff, so kann man fluoreszenzmikroskopisch leicht apoptotische von Kernen gesunder Zellen unterscheiden. Die Kriterien für die Morphologie apoptotischer Kerne sind eine starke Kondensation des Chromatins und der Zerfall des Kerns in Kernkörperchen, im angloamerikanischen Sprachgebrauch auch „nuclear budding“ genannt. Somit weisen die Kerne apoptotischer Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität auf. In eine Lab-Tec-Kammer wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und bis zur Subkonfluenz kultiviert, d. h., dass sich in einer Lab-Tec-Kammer etwa 5×10^5 Zellen befanden. Die Zellen wurden wie im Abschnitt 2.2.4 beschrieben infiziert, jedoch nach der Nachinkubation nicht ausgelöst, sondern als adhärenente Zellen

weiterverarbeitet. Dazu wird das überstehende Nachinkubationsmedium abgenommen, der Zellrasen mit 1 ml eisgekühlter DAPI-Arbeitslösung aus dem Gefrierschrank (-20°C) bedeckt und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und durch mit PBS⁺ 1:10 verdünntes Glycerol ersetzt. Die Präparate konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert werden.

2.2.7 Apoptosenachweis auf Proteinebene

2.2.7.1 Probenvorbereitung

Für jede Spur wurden 2×10^6 Zellen herangezüchtet, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben infiziert und zur Weiterverarbeitung mit Accutase von ihrer Unterlage gelöst. Die adhärennten Zellen wurden zusammen mit dem aufbewahrten Überstand in 10 ml Falcontubes zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 20°C). Daran schloss sich ein Waschschritt mit 1 ml PBS⁺ an, wobei die Zellen nach dem Resuspendieren in 2 ml Eppendorfgefäße überführt wurden. Nach Absaugen des Überstandes konnten die Pellets bei -80°C gelagert werden. Zur Elektrophorese wurden die Pellets aufgetaut, die Zellen in 50 µl RIPA-Puffer (4°C) resuspendiert und zwischen 15 und 20 Minuten bei 4°C lysiert. Daraufhin wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der gewonnene Überstand, in dem das zytoplasmatische Gesamtprotein enthalten war, wurde in ein frisches 1 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Aus diesem Ansatz wurden in frische Eppendorfgefäße, die mit 25 µl SDS-sample-buffer befüllt sind, 50 µl der Probe übertragen und daraufhin für 5 min gekocht. Auf eine Proteinbestimmung wurde verzichtet, da die gebräuchlichen Ansätze im kleinmolekularen Bereich sehr ungenau messen.

2.2.7.2 SDS-PAGE

Die Elektrophorese trennt Proteine nach ihrer Ladung. Hierzu bringt man das Proteingemisch auf ein Trägermaterial und lässt es im elektrischen Feld wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins hängt dabei einerseits von seiner elektrischen Ladung und andererseits von seiner Größe und Gestalt ab. Die Proteine des Proteingemisches wandern daher unterschiedlich weit. In der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) lässt sich

die Porengröße variieren, wodurch ein Molekularsiebeffekt erzielt wird. Führt man die Elektrophorese nun in Gegenwart des Detergens Natriumduodecylsulfat (SDS) durch, so werden die Proteine allein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, da das Anlagern von SDS an die Proteine ihre Ladungsunterschiede aufhebt. Für die Versuche wurde die PAGE mit einem diskontinuierlichen Gel durchgeführt, bei dem zur Probenkonzentrierung ein kleines weitporiges Gel mit abweichendem pH vorgeschaltet wurde (stacking gel, Sammelgel). Zur besseren Auflösung der gesuchten Proteine kam ein 6-15%iges Gradientengel, dessen Porengröße zum positiven Pol hin zunahm, als Trenngel zum Einsatz. Bei der Herstellung des Gels wurden zunächst zwei Ansätze mit unterschiedlicher Polyacrylamidmixkonzentration vorbereitet (nach der Rezeptur in Abschnitt 2.1.7). Um die Polymerisation zu starten, wurden sowohl TEMED als auch APS hinzu gegeben, kurz bevor das Gradientengel mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen wurde. Nach ungefähr einer Stunde wurde das Sammelgel angesetzt, ebenfalls erst kurz vor Gebrauch wurden TEMED und APS 10% beigemischt, um die Polymerisation zu starten. Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde eingesetzt, um Geltaschen zu Proteinbeladung auszusparen. Nachdem das Gel polymerisiert war, wurden die Taschen mit den vorbereiteten Proben beladen. Nach Befüllen der Tanks der Elektrophoresekammer mit der Elektrodenlösung, wurde eine konstante Spannung (200 V bis die Proteinfront das Trenngel erreicht, dann 44 V für 18 h) angelegt.

2.2.7.3 Western-Blot

Zur Auswertung wurden die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran, an die sie fest binden, elektrophoretisch übertragen und mit Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Die PVDF-Membran wurde in Methanol 3 Minuten lang permeabilisiert, anschließend zusammen mit 4 Lagen Filterpapier (Whatman-paper) und den Schaumplatten in Transferpuffer im Kühlschrank (4°C) äquilibriert. Gel und PVDF-Membran werden übereinander geschichtet und auf Gel- und Membranseite zunächst mit 2 Lagen Filterpapier und einer Schaumstoffschicht von der Kassettenwand abgeschirmt. Zwischen jeder Schicht wurden Luftblasen sorgfältig entfernt. Die Kassette und ihr Inhalt

wurden in den Transfertank eingesetzt, so dass die Lage der PVDF-Membran in Wanderungsrichtung der durch SDS-Anlagerung negativ geladenen Proteine lag. Die Transferkammer wurde für 90 Minuten an die Stromquelle angeschlossen, dabei wurde die Stromstärke 0,5 A konstant gehalten und darauf geachtet, dass die Spannung über 50 V lag. Nach dem Transfer wurde die Blotmembran in destilliertem Wasser gewaschen, mit 50 ml TBS-T, das zu 5% Trockenmilchpulver enthält, geblockt, danach 3 Mal mit reinem TBS-T gewaschen. Über Nacht wurde dann mit dem Erstantikörper (anti-Casp 3, 8, anti-PARP) bei 4°C inkubiert, am nächsten Morgen wurde der Antikörper 3 Mal mit TBS-T für jeweils 3 Minuten gewaschen und die Membran anschließend mit dem Zweitantikörper für 1 Stunde zusammengebracht. Der Zweitantikörper wurde zweimal während jeweils 5 Minuten mit TBS-T, weiterhin zwei Mal während jeweils 10 Minuten und schließlich zweimal während jeweils 15 Minuten mit TBS-T von der Membran herunter gewaschen. In einem weiteren Schritt wurde die Membran für 10 Minuten in Detektionspuffer äquilibriert. Der Puffer wurde dekantiert und die Membran in der kurz vor Gebrauch hergestellten Färbelösung gebadet. Nach ungefähr 5 bis 10 Minuten konnte nach Entfernen des Färbepuffers die Reaktion mit destilliertem Wasser arretiert werden. Die Membran wurde über Nacht zwischen zwei Filterpapieren getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 Flusszytometrische Untersuchungen an polaritätslosen Zellen

3.1.1 Apoptose durch A549-Zelllinie nach *P. aeruginosa* Infektion

In einem ersten Schritt sollte der Effekt einer *P. aeruginosa* Infektion der Bronchialepithelzelllinie A549 untersucht werden. Die Zellverbandsintegrität wurde durch Ablösen der adhärennten Zellen vom Untergrund und Infektion der Zellen in Suspension aufgehoben, um sicherzustellen, dass sowohl basolaterale als auch apikale Partien der Zellen den Bakterien exponiert sind. Durch Aufheben der Zellpolarität lässt sich die Internalisierungsrate von *P. aeruginosa* durch Bronchialepithelzellen erhöhen. Anschließend wurde mit einer Propidiumjodidfärbung die Apoptoserate flusszytometrisch gemessen. Zur Infektion wurde der typische Laborstamm Pao1v, einige klinische *P. aeruginosa*-Isolate (PA6294, PA149) und eine *P. aeruginosa* Mutante Pak R1 *algC::tet*, die LPS mit fehlenden O-spezifischen Seitenketten an der Oberfläche trägt. Alle Bakterienstämme wurden in einer Infektionsdosis von MOI 1 verwendet. Gemessen wurde nach einer Inkubationsdauer von 24h. A549-Zellen gingen nach Infektion mit *P. aeruginosa* apoptotisch zugrunde. Mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *algC::tet* infizierte A549-Zellen zeigten die niedrigste apoptotische Zelluntergangsrate, während die *P. aeruginosa* Stämme mit intaktem LPS-Molekül die höchsten Raten erreichten.

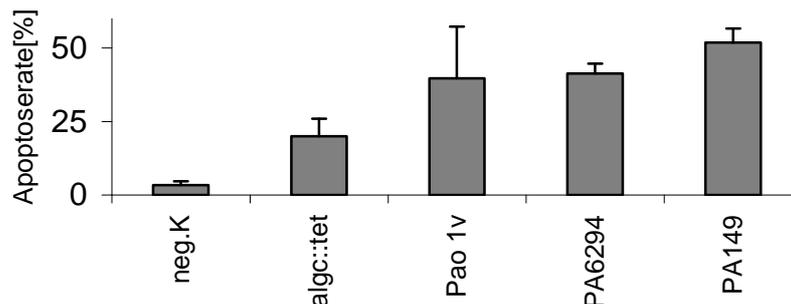


Abbildung 10: **Apoptose polaritätsloser A549-Zellen nach 24h Infektion mit unterschiedlichen *P. aeruginosa* – Stämmen.** Pak R1 *algC::tet* infizierte A549-Zellen zeigten die niedrigste apoptotische Zelluntergangsrate. Stämme mit intaktem LPS-Molekül zeigten höhere Raten. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1. Inkubationsdauer 24h.

3. Ergebnisse

3.1.2 Isoliertes LPS vermittelt keine Apoptose in A549-Zellen

In einem zweiten Schritt wurde versucht, durch Inkubation mit isoliertem wildtyp LPS in ansteigender Konzentration (0,1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng) einen apoptotischen Zelluntergang hervorzurufen. Es wurden aus dem Zellverband gelöste Zellen verwendet, die in Suspension unterschiedlichen Konzentrationen LPS ausgesetzt wurden. Dabei wurden die Zellen mit Humanserum AB koinkubiert, um das Vorhandensein von soluble CD14 zu garantieren. Im Falle, dass nicht CFTR Mittler des apoptotischen Signals ist sondern eine andere LPS-medierte Interaktion ein apoptotisches Signal ins Zellinnere fortleitet, sollte diese Fortleitung mittels sCD14 möglich sein. Schließlich wurde versucht, durch Proteinsynthesen inhibition mit Cycloheximid in einer Konzentration von 50 µg/ml eventuelle antiapoptotische Genexpression auszuschalten. Nach einer Inkubationszeit von 24h konnte mittels Zellzyklusanalyse die Apoptoserate ermittelt werden. Die Inkubation mit dem isolierten Lipopolysaccharid von *P. aeruginosa* hatte keine Auswirkungen auf die Überlebensrate von A549-Zellen. Hier nicht aufgeführt ist die fehlende Apoptose nach LPS-Exposition ohne im Medium vorhandene Zusatzstoffe. In Vorversuche konnte gezeigt werden, dass auch die Inkubation in reinem LPS-Inkubationsmedium nicht für eine Apoptoseinduktion ausreichte. Weder die Anwesenheit von sCD14 in Form von Humanserum AB noch die Anwesenheit eines Proteinsyntheseinhibitors alterieren das Apoptoseverhalten der A549-Zellen.

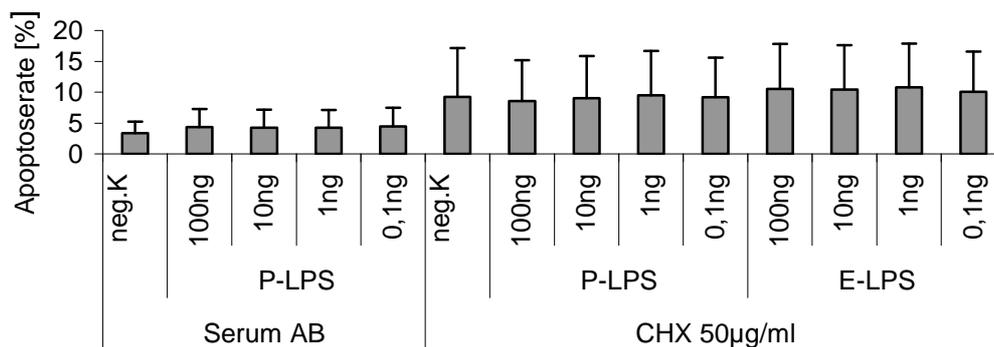


Abbildung 11: **Apoptoserate polaritätsloser A549-Zellen nach 24h Inkubation mit wildtyp LPS von *P. aeruginosa* und *E. coli*.** Die Inkubation mit dem isolierten Lipopolysaccharid von *P. aeruginosa* in Anwesenheit von Humanserum AB oder Cycloheximid hat keine Auswirkungen auf die Überlebensrate von A549-Zellen. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung.

3. Ergebnisse

3.1.3 Isoliertes LPS moduliert die apoptotische Antwort nicht

Durch Blockieren der CFTR-Bindungsstelle für LPS mittels Prä- und Koinkubation während der Infektionszeit mit isoliertem *P. aeruginosa* LPS sollten die Auswirkungen auf die Apoptoserate durch *P. aeruginosa* ermittelt werden. Dazu wurde das Zellkulturmedium 12h vor Versuchsbeginn mit der geeigneten *P. aeruginosa* LPS-Konzentration supplementiert. Diese LPS-Konzentration wurde während der Infektion erhalten. Mit wildtyp-LPS behandelte Zellen zeigen in ihrem Überlebensverhalten keine Unterschiede zu unbehandelten Zellen. Sowohl bei Infektion mit dem Laborstamm als auch mit dem klinischen Stamm PA324 waren keine Unterschiede zur Kontrolle feststellbar.

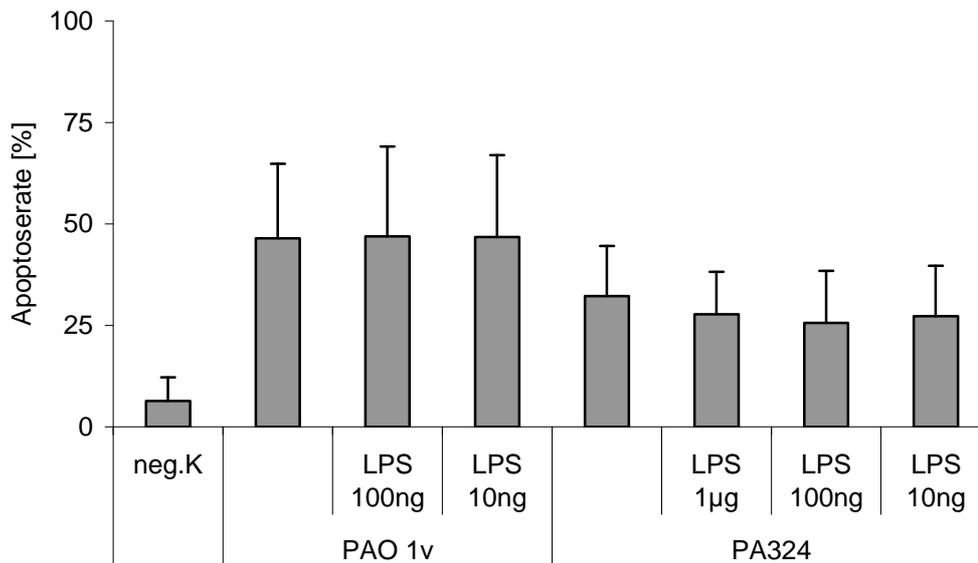


Abbildung 12: Moi 1 24h Apoptoserate polaritätsloser A549-Zellen nach 24h Infektion mit *P. aeruginosa* unter Prä- und Koinkubation mit isoliertem *P. aeruginosa* LPS. Die Inkubation mit dem isolierten Lipopolysaccharid von *P. aeruginosa* hat keine Auswirkungen auf die Apoptoserate von A549-Zellen. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung.

3.1.4 Apoptose polaritätsloser CFT1-Zelllinien

Anschließend sollte anhand von Lungenepithelzelllinien die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden. Auch die Bronchialepithelzelllinien CFT1 begingen in Suspension keine Apoptose durch isoliertes LPS. Weder unter

3. Ergebnisse

Behandlung mit isoliertem LPS noch unter Exposition von Cycloheximid zusätzlich zu isoliertem LPS konnte eine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden. In einer solchen Versuchsanordnung wäre die Möglichkeit gegeben, durch Proteinsyntheseinhibition mögliche antiapoptotischen Signalwege durch LPS auszuschalten. Eine 12h Inkubation mit *P. aeruginosa* LPS verursachte jedoch keine Alteration in der Apoptoserate. Die CFT-1 Zelllinien waren in Suspension wesentlich weniger stabil als die A549-Zelllinie, die selbst nach 24h Suspension weniger als 10% Spontanapoptose zeigten. Dagegen gingen bei den CFT1-Zelllinien schon nach 12h mehr als 50% der Zellen spontan zugrunde.

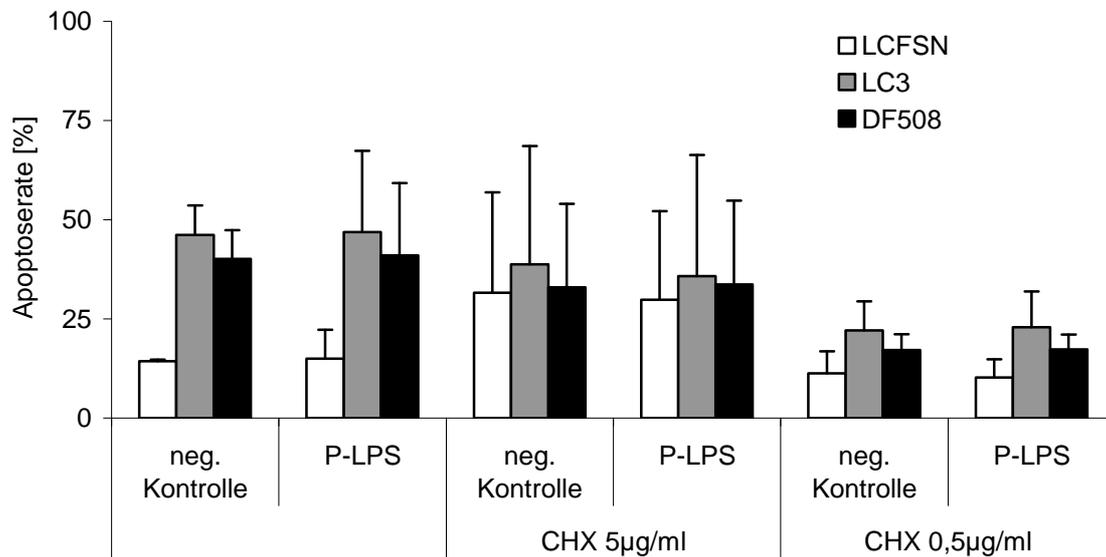


Abbildung 13: **Apoptoserate polaritätsloser CFT1-Zellen nach 12h Inkubation mit *P. aeruginosa* LPS.** Die Inkubation mit dem isolierten Lipopolysaccharid von *P. aeruginosa* hatte keine Auswirkungen auf die Apoptoserate von CFT1-Zellen. *P. aeruginosa*-LPS 1 µg/ml. n=3 mit Darstellung der Standardabweichung.

3.2 Untersuchungen an adhärenen CFT1-Zelllinien

3.2.1 Morphologischer Apoptosenachweis

Im Folgenden wurden die an CFT1-Zellen in nicht polarisiertem, desintegrierten Zustand durchgeführten Versuche in eine Versuchsanordnung überführt, die sich stabilisierend auf die hohe Spontanapoptoserate von nicht adhärenen Zellen auswirken sollte. Dazu wurden adhärenente CFT1-Zellen nach achtstündiger Infektion mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pao 1v und Pak R1 Δ algC::tet und einer anschließende Nachinkubationszeit von 12h, 24h, 36h und 48h flusszytometrisch untersucht. Zur Sicherstellung, dass es sich beim flusszytometrisch gemessenen Effekt tatsächlich um Apoptose handelt, wurde anhand der DAPI-Kernfärbung das apoptosespezifische „nuclear budding“ verfolgt, das fluoreszenzmikroskopisch anhand der typischen Kernmorphologie leicht differenziert werden konnte. Nach Identifikation und Quantifizierung der apoptotischen Kerne konnte das morphologische Ergebnis mit den flusszytometrisch gemessenen apoptotischen Ereignissen korreliert werden. Aufgrund der verlässlichen Korrelation konnte davon ausgegangen werden, dass die flusszytometrische Quantifizierung apoptotischer Ereignisse glaubwürdig ist.

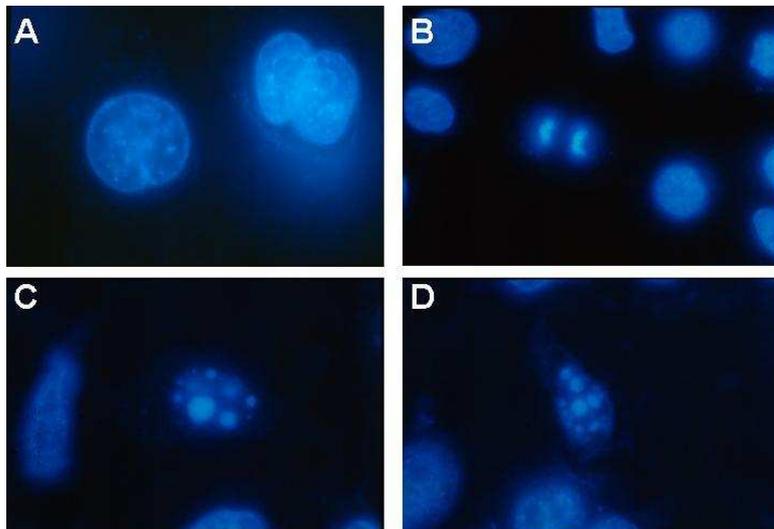


Abbildung 14: **Beispiel für die CFT1-Zellkernmorphologie in verschiedenen Zellzyklusphasen** A - morphologisch intakter Zellkern B - mitotischer Zellkern C -und D - nuclear budding bei Apoptose

3. Ergebnisse

Auf morphologischer Ebene sind von den vier CFT1-Zelllinien exemplarisch zwei untersucht worden: 1.) Die für das $\Delta F508$ -CFTR-Gen homozygote Stammzelllinie CFT1-parental und 2.) die natives CFTR exprimierende von der Stammzelllinie abgeleitete Zelllinie CFT1-LCFSN. Die Infektion mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pao 1v induzierte in beiden Zelllinien gleichermaßen Apoptose, während der *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 algc::tet, bei dessen LPS es sich um rough-LPS handelt, nur die Stammzelllinie CFT1-parental apoptotisch werden ließ, während die Zelllinie CFT1-LCFSN mit intaktem CFTR an der Oberfläche sich gegen eine Apoptoseinduktion durch Pak R1 algc::tet resistent zeigte.

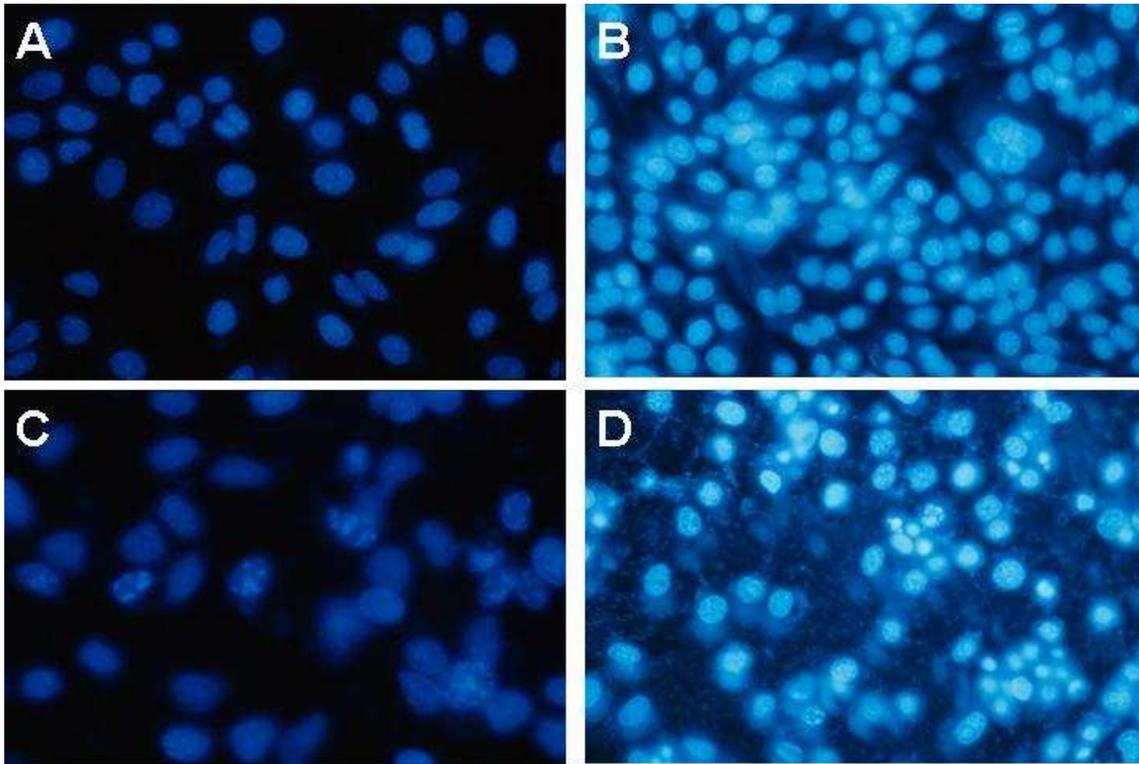


Abbildung 15: CFT1-parental und CFT1-LCFSN nach Infektion 8h mit Pao 1v und Nachinkubation 24h A - negativ Kontrolle CFT1-parental; B - negativ Kontrolle CFT1-LCFSN; C - Pao1v 24h CFT1-parental; D - Pao1v 24h CFT1-LCFSN

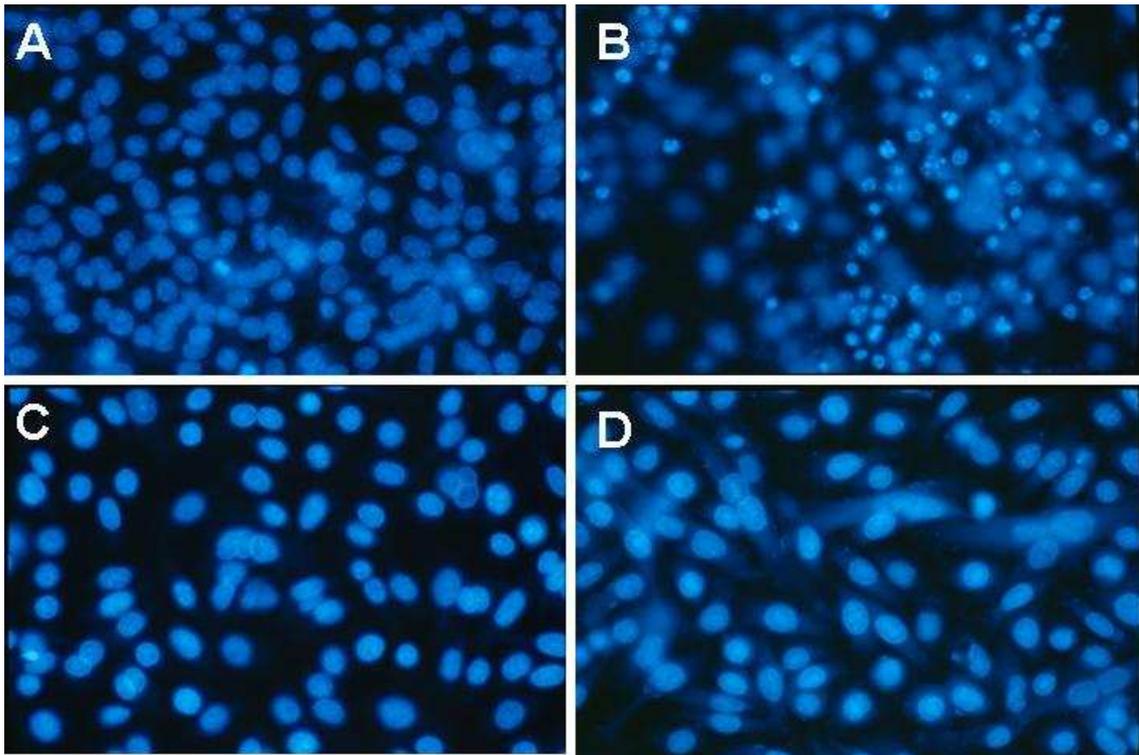


Abbildung 16: CFT1-parental und CFT1-LCFSN nach Infektion 8h mit Pak R1 *algc::tet* und Nachinkubation 24h **A** - neg. Kontrolle CFT1-parental; **B** - *algc::tet* 24h CFT1-parental **C** - neg. Kontrolle CFT1-LCFSN; **D** - *algc::tet* 24h CFT1-LCFSN

3.2.2 Apoptose durch Pao1v und Pak R1 algc::tet

Wie detailliert im Kapitel 2.2.5 beschrieben, wurden die flusszytometrischen Apoptosenachweise parallel mittels drei an unterschiedlichen Punkten ansetzenden Zellfärbungen durchgeführt. Mit der Kernfärbung durch Propidiumjodid konnte die apoptosevermittelte DNS-Fragmentierung quantitativ sichtbar gemacht werden. Dem einzelnen gemessenen Zellereignis konnte eine Zellzyklusphase zugeordnet werden. Der unspezifische Caspaseinhibitor fitc-Vad-FMK diente der relativen Quantifizierung der intrazellulären Caspasenaktivität, während der fitc-konjugierte Antikörper cytochrome c M30 einen Anhalt für den caspasecharakteristischen intrazellulären Zellschaden gibt. Jedes Experiment wurde mindestens zwei Mal in gleicher Form wiederholt. Die Ergebnisse sind in Balkendiagrammen dargestellt, die eine statistische Auswertung der durchflusszytometrisch erhaltenen Daten illustrieren. Zur Verdeutlichung der Methodik siehe auch Kapitel 2.2.5.4.

Die erste Aufgabe bestand darin, die Apoptoserate der verschiedenen CFT1-Zelllinien, die durch verschiedene *P. aeruginosa* Stämme infiziert worden sind, zeit- und dosisabhängig zu erfassen. Nachdem in Vorversuchen die optimale Infektionszeit und Infektionsdosis ermittelt worden war, wurde in einem ersten Schritt nach einer Infektionszeit von acht Stunden mit einer Infektionsdosis von MOI 1 über einen variablen Zeitraum in Nachinkubationsmedium das apoptotische Absterben abgewartet. Flusszytometrische Messungen wurden nach 12h und 36h Nachinkubation durchgeführt. Bei den untersuchten *P. aeruginosa* Stämmen handelte es sich um Pao 1v und Pak R1 algc::tet. Abbildung 17 (Seite 59) veranschaulicht die Ergebnisse dieses Ansatzes. Die Infektion der CFT1-Zelllinien mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pao 1v führte zu einem zeitabhängigen Anstieg der Apoptoseraten in der zellzyklusanalytischen Messung mit Propidiumjodid, der fitc-Vad-FMK-Messung und in der Cytochrome c M30-Messung, wobei sich die Apoptoseraten zwischen den einzelnen Zelllinien CFT1-parental, CFT1-LCFSN, CFT1-LC3 und CFT1-ΔF508 keine signifikanten Unterschiede einstellten. Der *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 algc::tet verfehlte eine Apoptoseinduktion bei den Zelllinien CFT1-LCFSN, CFT1-LC3 und CFT1-ΔF508. Bei der Apoptoserate der mit Pak R1 algc::tet infizierten Zelllinie CFT1-

3. Ergebnisse

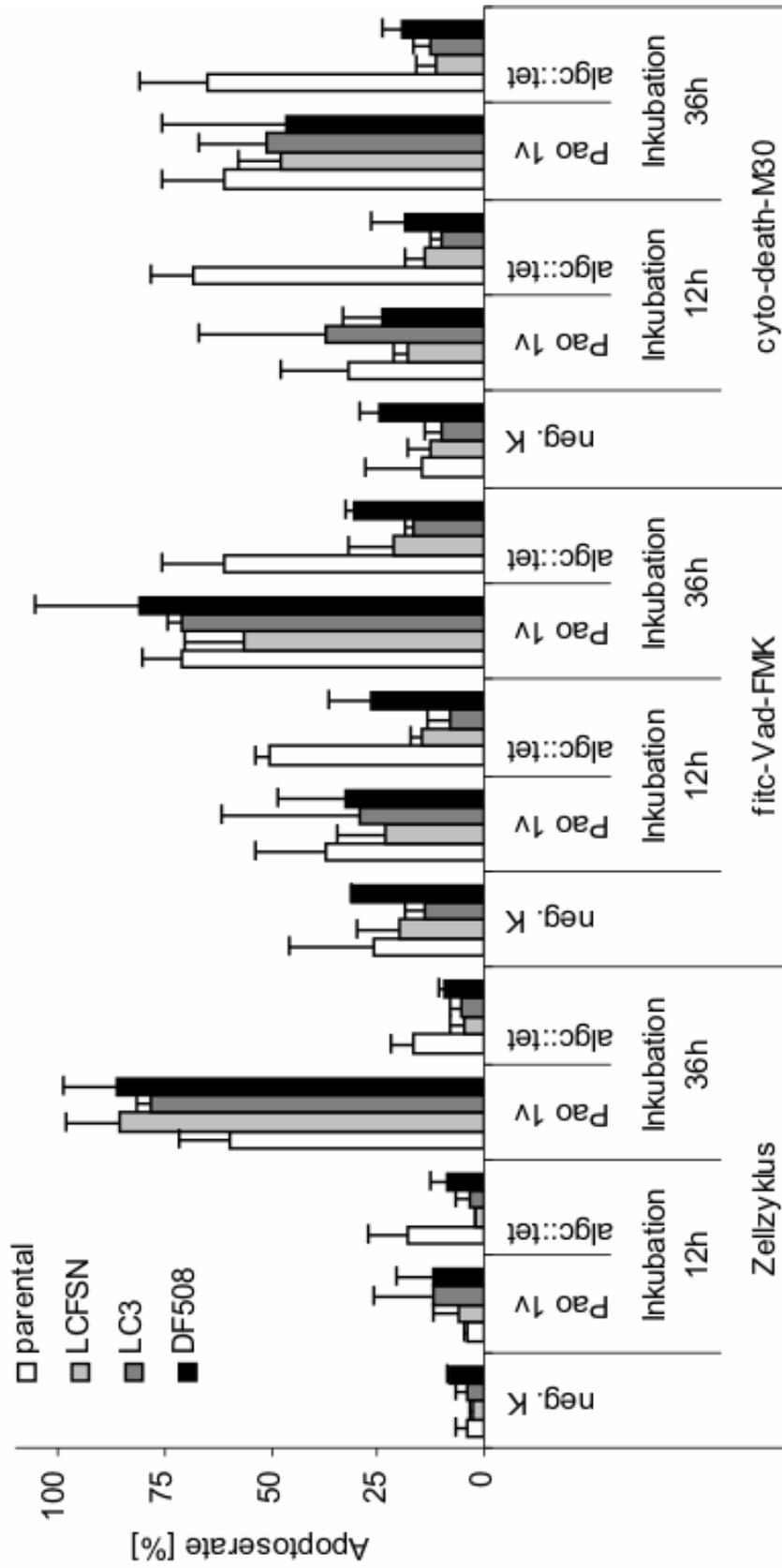
parental stellte sich bei allen durchgeführten Messungen ein Unterschied heraus.

In einem zweiten Schritt wurden die gefundenen Unterschiede in der Apoptoserate der mit Pak R1 *alg::tet* infizierten Zellen exemplarisch anhand der beiden Zelllinien CFT1-parental und CFT1-LCFSN mit Hilfe einer engmaschigeren Zeitkinetik herausgearbeitet. Hierzu wurden die oben genannten Zelllinien mit den Stämmen Pao 1v und Pak R1 *alg::tet* über 8h infiziert, und es wurde während 12h, 24h und 36h der apoptotische Reifung entgegengesehen, um anschließend die oben beschriebenen Flusszytometrische Messungen durchzuführen. Abbildung 18 (Seite 60) erläutert die gewonnenen Ergebnisse.

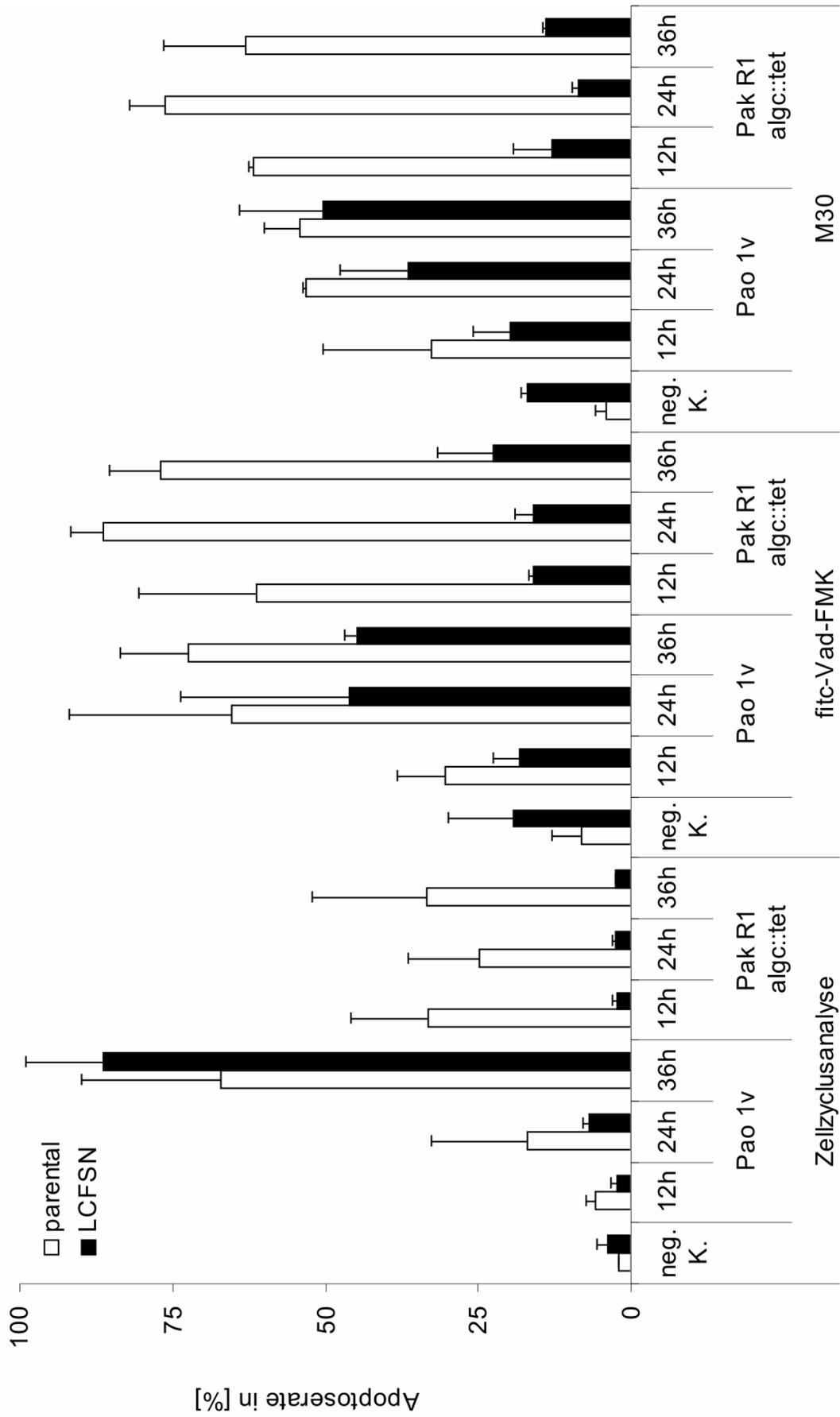
Abbildung 17 (Seite 59): **Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch die *P. aeruginosa* Stämme Pao 1v und Pak R1 *alg::tet* in CFT1-Zelllinien.** Mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *alg::tet* infizierte CFT1-parental-Zellen zeigten apoptotischen Zelluntergang, während die Zelllinien CFT1-LCFSN, CFT1-LC3 und CFT1- Δ F508 resistent gegen die Pak R1 *alg::tet* induzierte Apoptose waren. Die Apoptoserate nach Pao 1v-Infektion der CFT1-Zelllinien zeigt interzellulär keine signifikanten Unterschiede. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1.

Abbildung 18 (Seite 60): **Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch die *P. aeruginosa* Stämme Pao 1v und Pak R1 *alg::tet* in den CFT1-Zelllinien parental und LCFSN (Zusammenschau).** Mit dem *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *alg::tet* infizierte CFT1-parental-Zellen zeigten apoptotischen Zelluntergang, während die Zelllinien CFT1-LCFSN resistent gegen die Pak R1 *alg::tet* induzierte Apoptose waren. Die Apoptoserate nach Pao 1v-Infektion zeigte bei CFT1-parental einen signifikanten Unterschied zur Apoptosefrequenz von Pak R1 *alg::tet*. Pak R1 *alg::tet* schien schneller und heftiger Apoptose zu verursachen. Anders verhielt es sich bei Pao 1v induzierter Apoptose. In diesem Fall sah man keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoseinduktion. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1.

3. Ergebnisse



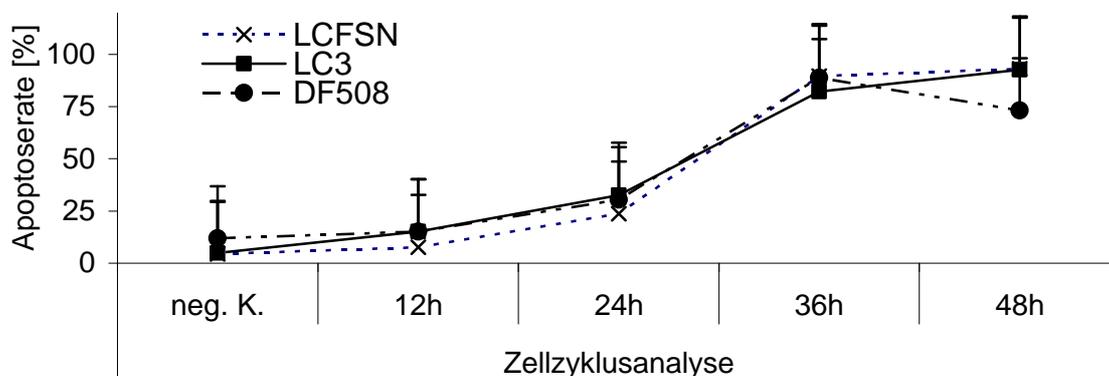
3. Ergebnisse



3. Ergebnisse

Die drei genutzten Messverfahren zur Apoptosequantifizierung ergaben ein zeitabhängiges apoptotisches Absterben der beiden untersuchten CFT1-Zelllinien parental und LCFSN nach Pao 1v-Infektion in einer Infektionsdosis von MOI 1. Die Apoptoseraten, die die Zelllinien parental und LCFSN betrafen, unterschieden sich bei Infektion mit Pao 1v nicht signifikant. Dahingegen führte eine Infektion mit dem Bakterienstamm Pak R1 *algC::tet* in parental-Zellen im Vergleich zu LCFSN-Zellen in allen Messverfahren zu signifikanten Unterschieden. Die Zelllinie CFT1-parental wurde nach Pak R1 *algC::tet*-Infektion apoptotisch, während sich die Apoptoserate der LCFSN-Zellen - trotz Pak R1 *algC::tet*-Infektion - nicht über das Niveau der negativ Kontrolle erhob. Damit die Unterschiede im Apoptoseverhalten der Zelllinien CFT1-parental und CFT1-LCFSN besser erfasst werden können, sind die Ergebnisse in zwei verschiedenen Schaubildformen (Abbildung 17 und Abbildung 18) dargestellt.

Zwischen den Apoptoseraten von CFT1-LC3, CFT1-LCFSN und CFT1- Δ F508 konnte nach Infektion mit Pao1v in einer engmaschigen Zeitkinetik kein wesentlicher Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien ausgemacht werden. In der Abbildung 19 wird die Kinetik der unterschiedlich durchgeführten Apoptosetests ersichtlich. Die frühen Apoptosetests (M30 und fitc-Vad-FMK) erreichten nach 36 Stunden Nachinkubation ihr Maximum, während der Zellzyklusanalysetest erst bei 48 Stunden sein Maximum erreichte. Die frühen Tests fielen nach Erreichen des Maximums wieder ab, wobei sie nach Erreichen des Maximums kaum mehr aussagekräftig waren.



3. Ergebnisse

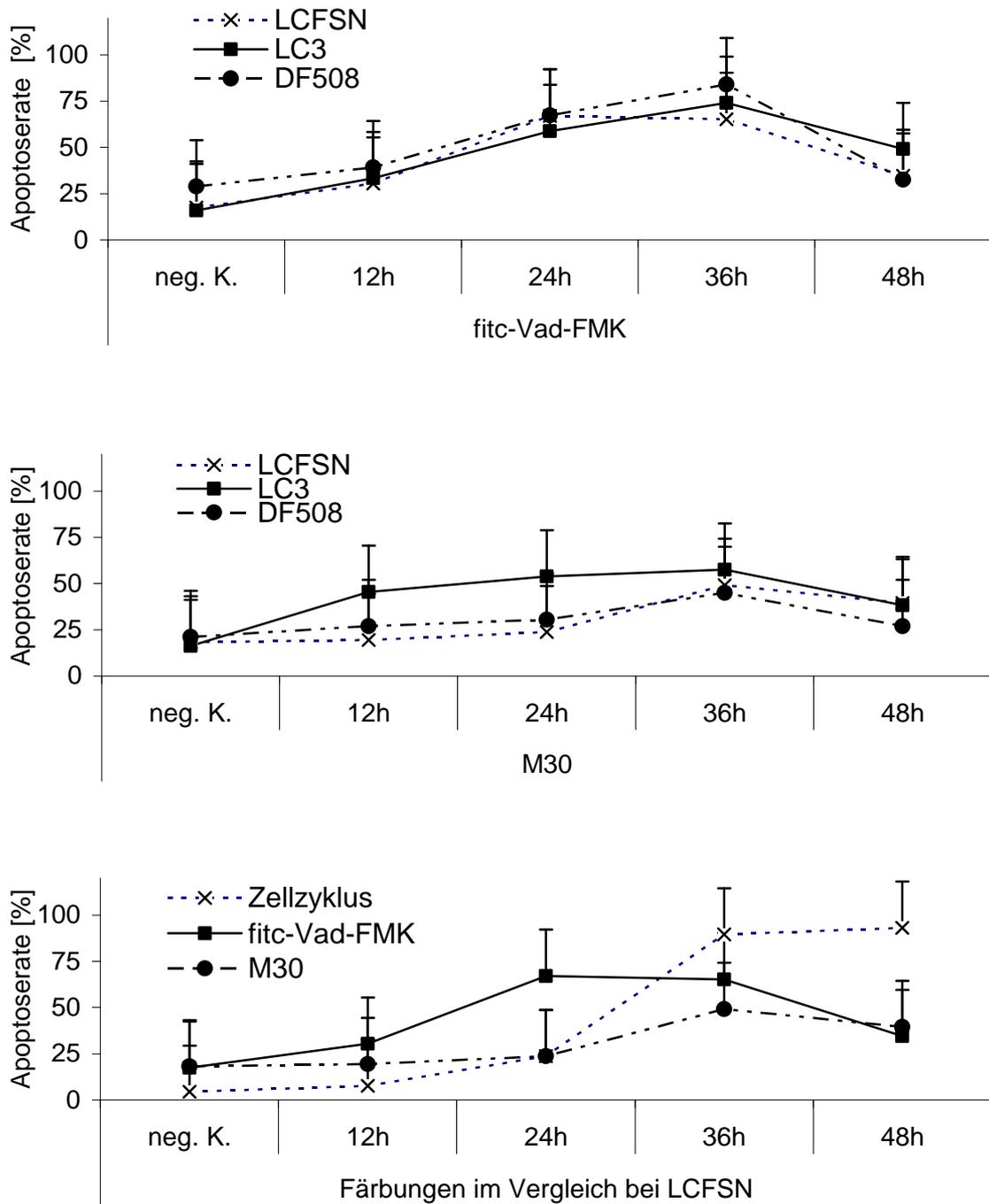
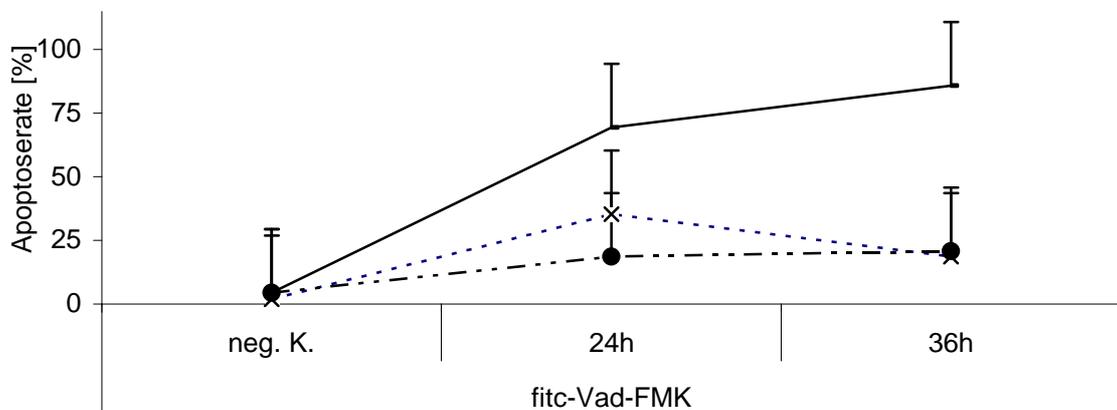
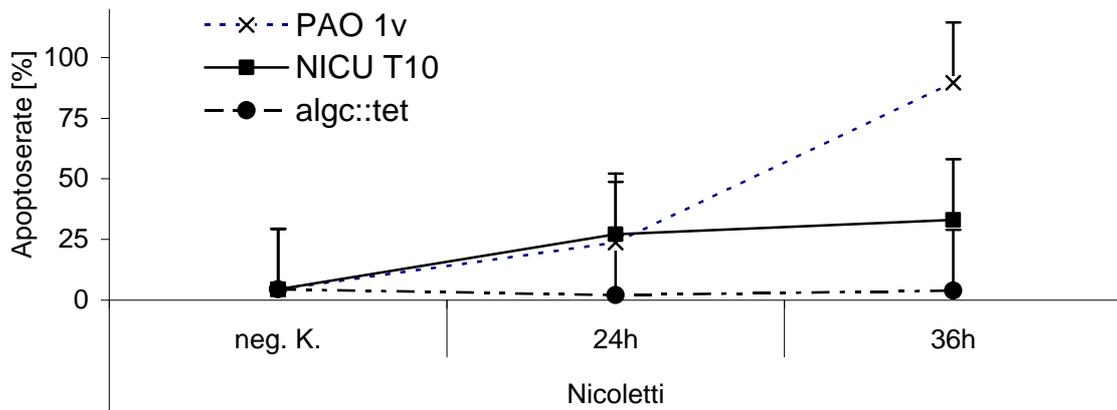


Abbildung 19 (auch umseitig): **Zeitabhängige Induktion von Apoptose durch den *P. aeruginosa* Stämme Pao 1v in CFT1-Zelllinien LCFSN, LC3 und Δ F508.** Zwischen den Zelllinien CFT1-LCFSN, LC3 und Δ F508 konnte kein Unterschied der Zeitkinetik des apoptotischen Zelluntergangs festgestellt werden. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1.

3.2.3 Apoptose durch klinische Stämme

Um zu untersuchen, ob klinische *P. aeruginosa* Isolate sich ähnlich verhalten, wurden mit gleicher Methodik wie in den vorhergehenden Versuchen in einem weiteren Versuchsansatz die klinische *P. aeruginosa* Stamm NICU T10 und PA324 im Vergleich zu den bereits vorher geprüften Stämmen Pao1v und Pak R1 *alg::tet* untersucht. Die mit den verschiedenen Stämmen infizierten Proben wurden nach einer Nachinkubation von 36 Stunden mit einer Infektionsdosis von MOI 1 nach durchgeführtem Färbeverfahren gemessen. Sowohl der Laborstamm Pao1v als auch die klinischen Stämme NICU T10 und PA 324 induzierten Apoptose. Die Zeitkinetik des apoptotischen Untergangs der klinischen Stämme divergierte jedoch deutlich, wie aus Abbildung 20 und Abbildung 21 ersichtlich ist.



3. Ergebnisse

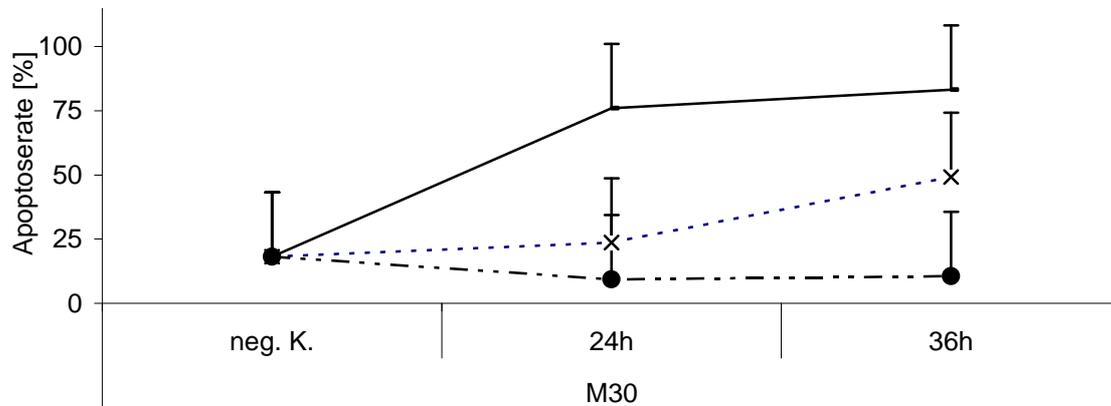
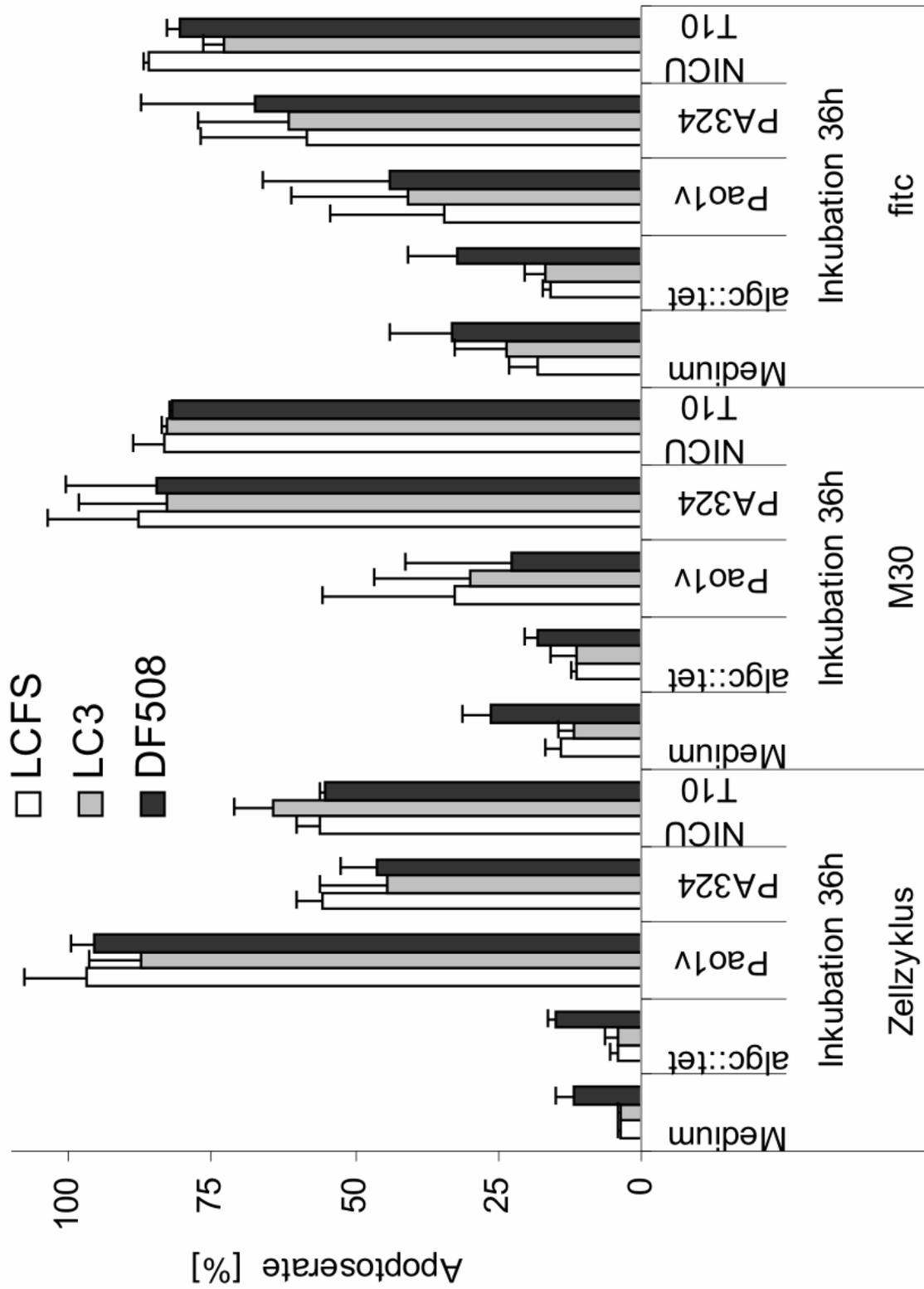


Abbildung 20 (auch umseitig): **Induktion von Apoptose durch den klinischen *P. aeruginosa* Stamm NICU t10.** Unterschiedliche Zeitkinetik der Apoptoseinduktion durch den klinischen *P. aeruginosa* Stamm NICU T10. Der *P. aeruginosa* Stamm Pao1v erreichte das Apoptosemaximum zu einem früheren Zeitpunkt als NICU T10. Die verzögerte Apoptoseinduktion durch den klinischen Stamm NICU T10 ersieht man aus der Kinetik der verschiedenen Tests. Nach 36h sind die frühen Apoptosetests für NICU T10 maximal, hingegen für Pao1v schon postmaximal, da der Test zum spätesten Apoptosezeitpunkt (Zellzyklusanalyse) für Pao1v bei über 75% apoptotischer Zellen liegt. NICU T10 erreicht im Test, der die späteren apoptotischen Veränderungen darstellt, ungefähr 25% apoptotischer Zellen. Im Vergleich dazu war bei Pao1v nach derselben Zeit beim Maximum der Zellzyklusanalyse angelangt. Die frühen Tests waren postmaximal niedrig. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1.

Abbildung 21 (Seite 65): **Induktion von Apoptose durch den klinischen *P. aeruginosa* Stamm NICU t10 und PA 324 in CFT1-Zelllinien.** Es zeigte sich kein Unterschied in der Apoptoseinduktion durch klinische *P. aeruginosa* Stämme, außer dass die klinischen Stämme verzögert Apoptose auslösten. Je nach dem wie sich die Ergebnisse der frühen Apoptosetest zu den späten verhielten, konnte man auf den zeitlichen Verlauf der Apoptoseinduktion Rückschlüsse ziehen. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1.

3. Ergebnisse



3.2.4 Keine Apoptose durch *P. aeruginosa*-LPS

Ob die *P. aeruginosa* induzierte Apoptose von der Interaktion zwischen dem *P. aeruginosa* LPS und seiner spezifischen Bindungsstelle am CFTR-Protein abhängt, wurde durch LPS-Exposition der CFT1-Zelllinien nachgeprüft. Dazu wurde im ersten Versuchsansatz isoliertes *P. aeruginosa* LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml dem Zellkulturmedium zugesetzt und das Zeitfenster bis 24 h mit der wildtyp CFTR exprimierenden Zelllinie CFT1-LCFSN untersucht. Isoliertes *P. aeruginosa* LPS t1 war nicht in der Lage, Apoptose zu induzieren.

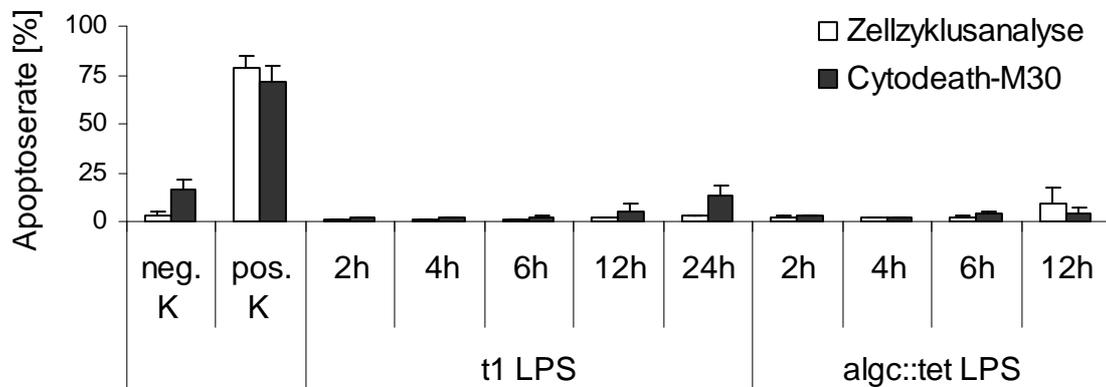


Abbildung 22: Ausschluss der direkt CFTR-vermittelten Apoptoseinduktion in CFT1-LCFSN Zellen durch *P. aeruginosa*-LPS der Stämme Pao1v (t1-LPS) und Pak R1 algc::tet (algc::tet-LPS). Keines der untersuchten *P. aeruginosa* LPS-Sorten induzierte Apoptose in CFT1-LCFSN-Zellen. Durchflusszytometrische Messungen nach Propidiumjodid- und cytochrome c-Antikörper-Färbung. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. LPS-Dosis 1µg/ ml.

Um sicherzustellen, dass sich auch die übrigen CFT1-Zelllinien resistent gegenüber *P. aeruginosa*-LPS verhalten, wurde der Versuchsansatz mit allen CFT1-Zelllinien zu einem anderen Zeitpunkt (24h) wiederholt. Sowohl in der Zellzyklusanalyse als auch im Apoptosetest cytochrome c-Antikörper M30 konnte keine Apoptoseaktivität gemessen werden.

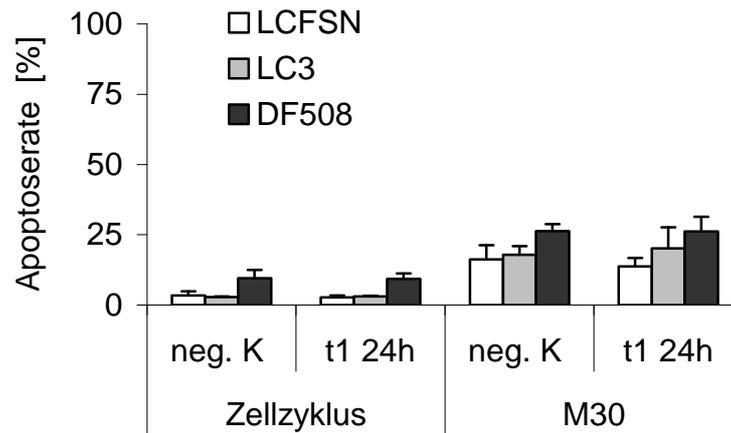


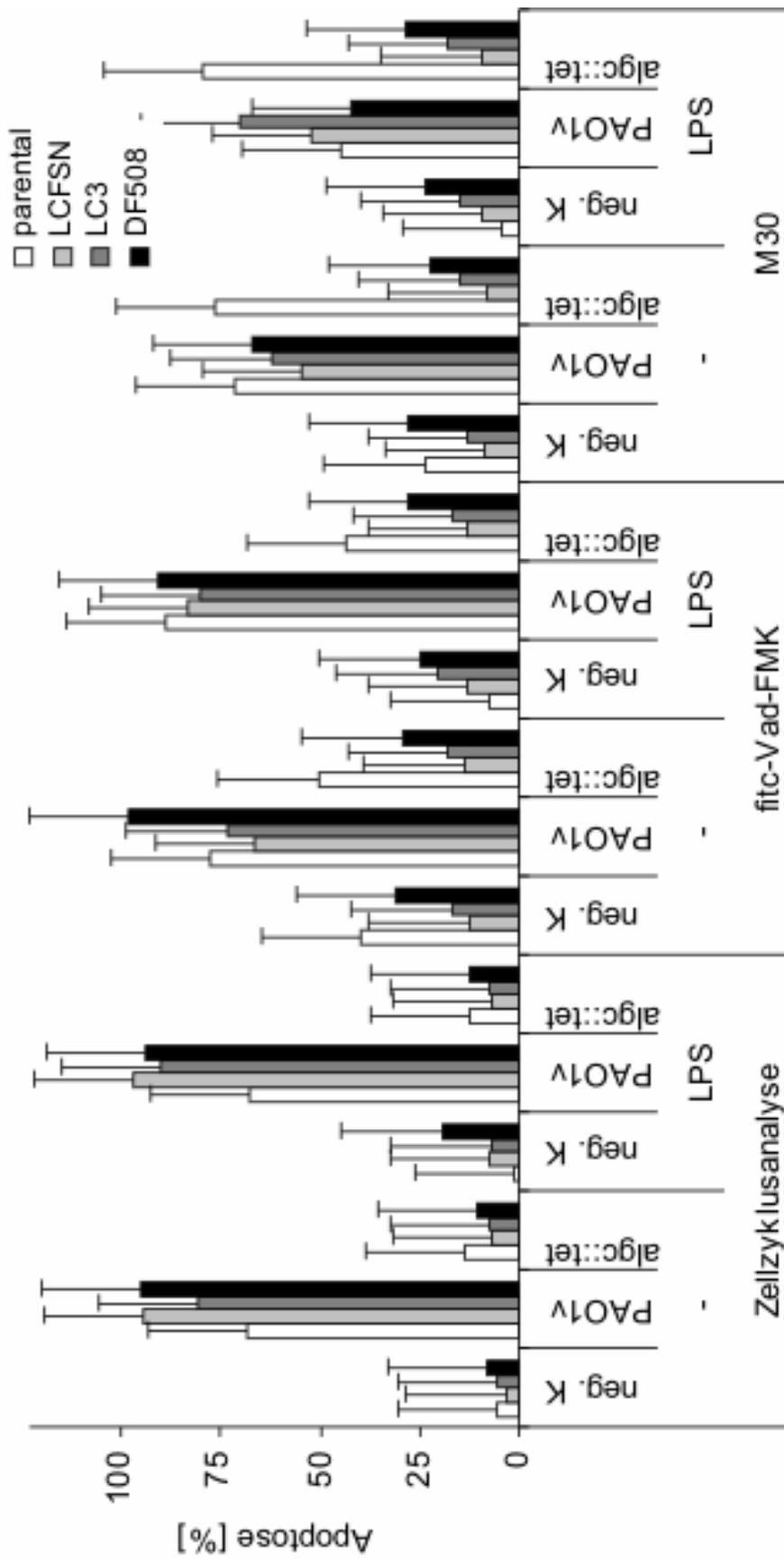
Abbildung 23: **Ausschluss der direkt CFTR-vermittelten Apoptoseinduktion in CFT1-Zellen durch *P. aeruginosa*-LPS der Stämme Pao1v (t1-LPS).** Es konnte kein apoptotischer Zelluntergang nach 24h Inkubation mit *P. aeruginosa* wild-typ LPS nachgewiesen werden. Durchflusszytometrische Messungen nach Propidiumjodid- und cytodeath-M30-Färbung. n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. LPS-Dosis 1µg/ml.

3.2.5 LPS beeinflusst die *P. aeruginosa*-induzierte Apoptose nicht

Eine modulierende Wirkung des *P. aeruginosa* LPS auf die *P. aeruginosa* induzierte Apoptose durch Blockade beziehungsweise Aktivierung der CFTR-Bindungsstelle wurde durch Prä- und Koinkubation mit *P. aeruginosa* LPS untersucht. Dazu wurde sowohl während der Infektionszeit als auch während der Nachinkubationszeit dem jeweiligen Medium das entsprechende LPS zugegeben. Zusätzlich wurden die später mit LPS supplementierten Ansätze über 12h mit *P. aeruginosa* LPS vorinkubiert. In diesem Versuchsansatz konnte kein Einfluss auf die Apoptoserate festgestellt werden. Im Folgenden sind die für diesen Versuchsansatz typischen Diagramme dargestellt worden. Auf der linken Seite ist jeweils die Negativkontrolle und auf der rechten Seite die CFTR-Bindungsstelleninteraktion mit *P. aeruginosa* LPS dargestellt.

Abbildung 24 (umseitig): **Ausschluss einer modulierenden Wirkung von t1-LPS auf die Apoptoserate von *P. aeruginosa*** Die Koinkubation mit *P. aeruginosa* LPS bewirkte keine Änderung im Apoptoseverhalten der mit den Stämmen Pao1v oder Pak R1 algc::tet infizierten Zelllinien. Infektionsdosis MOI 1. Infektionszeit 8h. Nachinkubationszeit 36h. Caspasenaktivierung durch *P. aeruginosa*-Infektion

3. Ergebnisse



3.2.6 Caspasenaktivierung durch *P. aeruginosa*-Infektion

In den vorangegangenen Versuchen wurde die Apoptoseinduktion durch den *P. aeruginosa* Stamm Pao 1v durch indirekte Messung der zellulären Veränderungen, die sich während des apoptotischen Vorgangs vollziehen, untersucht. Durch Nachweis von Caspase-3, Caspase-8 und PARP-1 Spaltung im Westernblot sollten in den folgenden Versuchen die bisherigen Messungen biochemisch bestätigt werden. CFT1-Bronchialepithelzelllinien wurden mit einer Infektionsdosis MOI1 8h infiziert und anschließend in antibiotikahaltigem Medium für variable Zeiten weiterinkubiert. Als Zeitfenster wurde das Maximum der fitc-Vad-FMK-Messungen gewählt. Führt man sich vor Augen, dass es erst nach Erreichen der Effektorcaspasen in der Caspasenkaskade zu zellulären Veränderungen kommt, die indirekt flusszytometrisch messbar werden, so muss man davon ausgehen, dass sich die Caspasenspaltung zu einem früheren Zeitpunkt abspielt und am ehesten mit der Zeitspanne bis zur maximalen Bindung von fitc-Vad-FMK korreliert. Daher wurde das Zeitfenster zwischen 24 und 32 Stunden betrachtet. Die relevanten Abschnitte der Westernblots sind in Abbildung 25, Abbildung 26 und Abbildung 27 dargestellt. Es sind jeweils die inaktiven, ungespaltenen Untereinheiten dargestellt, die durch Spaltung durch übergeordnete Caspasen in die aktive Form übergeführt werden. In Form einer Abnahme der inaktiven Pro-Form im Vergleich zu Kontrollen ließ sich die Caspasenaktivität nachweisen.

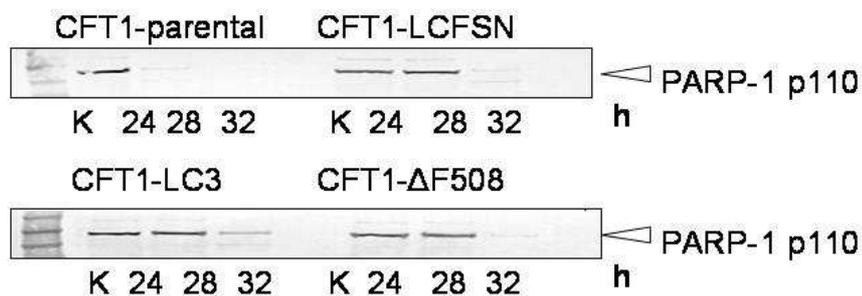


Abbildung 25: **Westernblot zum Nachweis der Parp-1 Spaltung in den CFT1-Zelllinien nach Pao1v-Infektion:** Mittels Caspase-3 wird Parp in allen vier Zelllinien gespalten. MOI 1

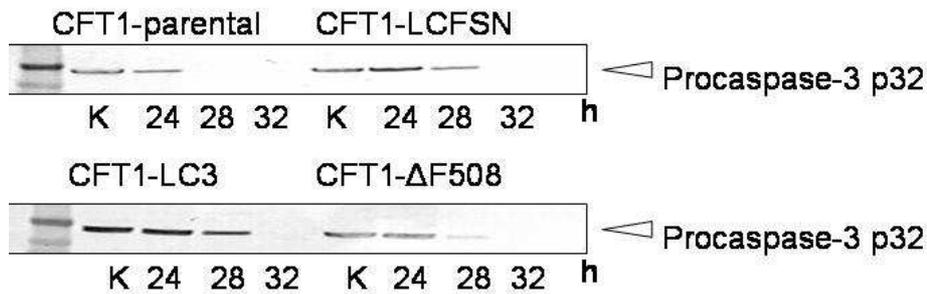


Abbildung 26: **Westernblot zum Nachweis der Caspase-3 Aktivierung in den CFT1-Zelllinien nach Pao1v-Infektion:** Es besteht nach Pao1v Infektion in allen vier Zelllinien Caspase-3 Aktivität. MOI 1

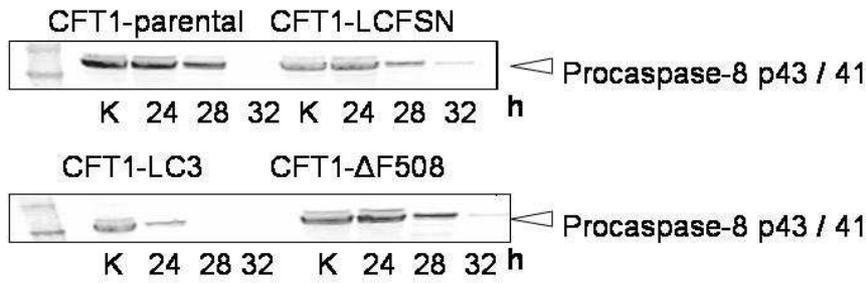


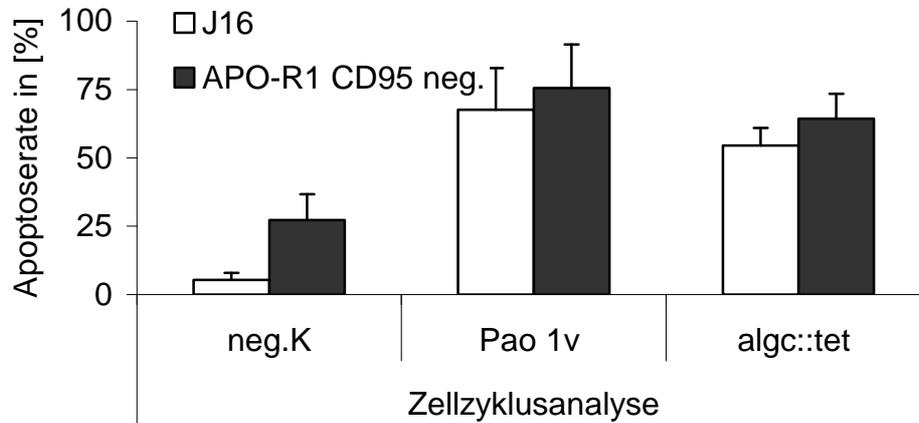
Abbildung 27: **Westernblot zum Nachweis der Caspase-8 Aktivität in den CFT1-Zelllinien nach Pao1v-Infektion:** Es besteht nach Pao1v Infektion in allen vier Zelllinien Caspase-8 Aktivität. MOI 1

3.3 Die Signaltransduktion über Todesrezeptoren

3.3.1 Zur Apoptoseinduktion ist CD95 in Jurkat-Zellen entbehrlich

Zur Klärung des Signaltransduktionswegs, auf dem *P. aeruginosa* vermittelte Apoptose stattfindet, wurden Infektionsversuche an Jurkat-Zelllinien, die verschiedene Defizite des Rezeptorvermittelten Apoptosewegs aufweisen, durchgeführt. Die Abbildung 28 stellt die Ergebnisse dar, die nach 24-stündiger Infektion von den CD95-defizienten Jurkat-Zellen APO-R1 und deren Kontrollzellen J16 durch verschiedene *P. aeruginosa* Stämme mit Hilfe der Propidiumjodidfärbung ermittelt wurden. Trotz der Unfähigkeit dieser Zellen an CD95-abhängiger Apoptose unterzugehen, induzierten alle untersuchten *P.*

aeruginosa-Stämme Apoptose ohne signifikanten Unterschied zwischen der Mutterzelllinie J16 und der alterierten Zelllinie APO-R1.



Abbildungung 28: **Induktion von Apoptose durch verschiedene *P. aeruginosa* Stämme in den Jurkat-Zelllinien J16 und APO-R1 mit Propidiumjodidfärbung gemessen.** n=2 mit Darstellung der Standardabweichung. Infektionsdosis MOI 1. 24h

3.3.2 Caspase-8 und FADD sind keine Bedingung für Apoptose

Nachdem gezeigt wurde, dass an oben genannten Jurkat Zelllinien die *P. aeruginosa* induzierte Apoptose nicht abhängig von CD95 erfolgt, wurde zur weiteren Klärung des Signaltransduktionswegs Infektionsversuche an den Jurkat-Zelllinien JA3, die verschiedene Defizite des rezeptorvermittelten Apoptosewegs aufweisen, durchgeführt. Die Abbildung 28 stellt die Ergebnisse dar, die nach 24-stündiger Infektion von den Caspase-8-defizienten Jurkat-Zellen Casp8, von den FADD-defizienten Jurkat-Zellen FADD und deren Kontrollzellen JA3 ermittelt wurden. Diese Zellen waren durch verschiedene *P. aeruginosa* Stämme infiziert und mit Hilfe der Propidiumjodidfärbung und der fitc-Vad-FMK-Färbung untersucht worden. Trotz der Unfähigkeit dieser Zellen an rezeptorvermittelter Apoptose unterzugehen, induzierten alle untersuchten *P. aeruginosa*-Stämme Apoptose ohne signifikanten Unterschied zwischen der Mutterzelllinie JA3 und den alterierten Zelllinien Casp8 und FADD.

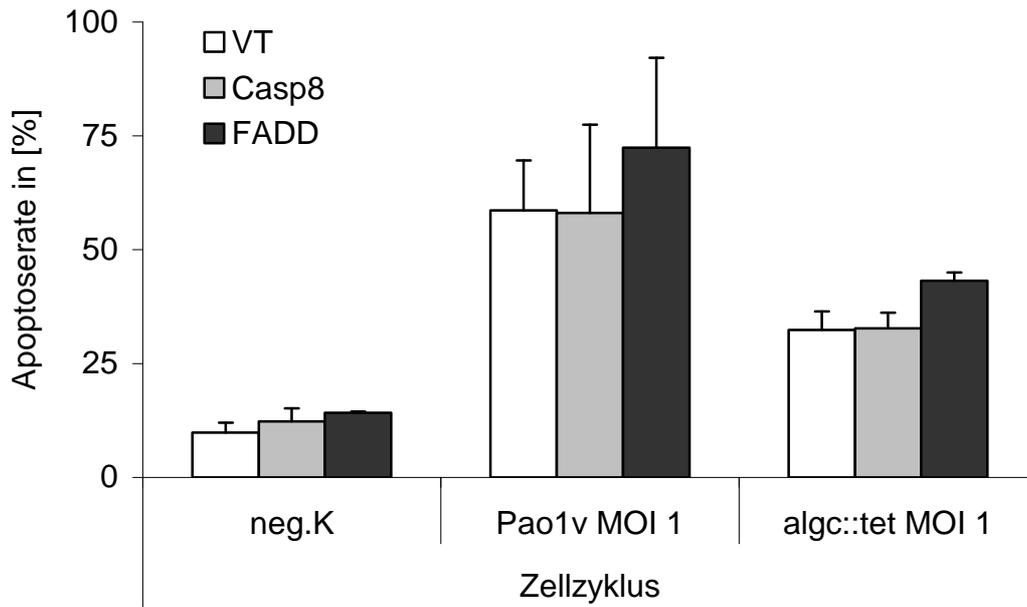


Abbildung 29: **Induktion von Apoptose durch verschiedene *P. aeruginosa* Stämme in den Jurkat-Zelllinien JA3-VT, JA3-Casp-8 und JA3-FADD mit fitc-Vad-FMK-Färbung gemessen.** n=1 Infektionsdosis MOI 1

3.3.3 *P. aeruginosa* vermittelte Apoptose erfolgt über Mitochondrien

Anschließend wurde die Rolle des mitochondrialen Signalwegs bei *P. aeruginosa* induzierter Apoptose überprüft. Die Zelllinien wurden über 24h mit den *P. aeruginosa* Stämmen Pao1v und Pak R1 algc::tet infiziert und anschließend mittels Zellzyklusanalyse gemessen. Aus Abbildung 30 sind die gewonnenen Ergebnisse zu entnehmen. Die Apoptoseraten unterscheiden sich bei der Pao1v Infektion signifikant. Die w/t Zellen der bcl-xL und bcl-2 Zellen verhalten sich resistenter gegen mitochondrielle Apoptose als ihre Vector Zelllinien, da die Überexpression von antiapoptotischen Proteinen des Mitochondriums die Resistenz bedingen. Somit konnte gezeigt werden, dass für Pao1v der mitochondrielle Weg von besonderer Bedeutung für die Apoptoseinduktion ist. Ein unterschiedliches Muster ergibt sich für Pak R1 algc::tet. Diese Unterschiede könnten auf eine verzögerte Kinetik zurückzuführen sein.

3. Ergebnisse

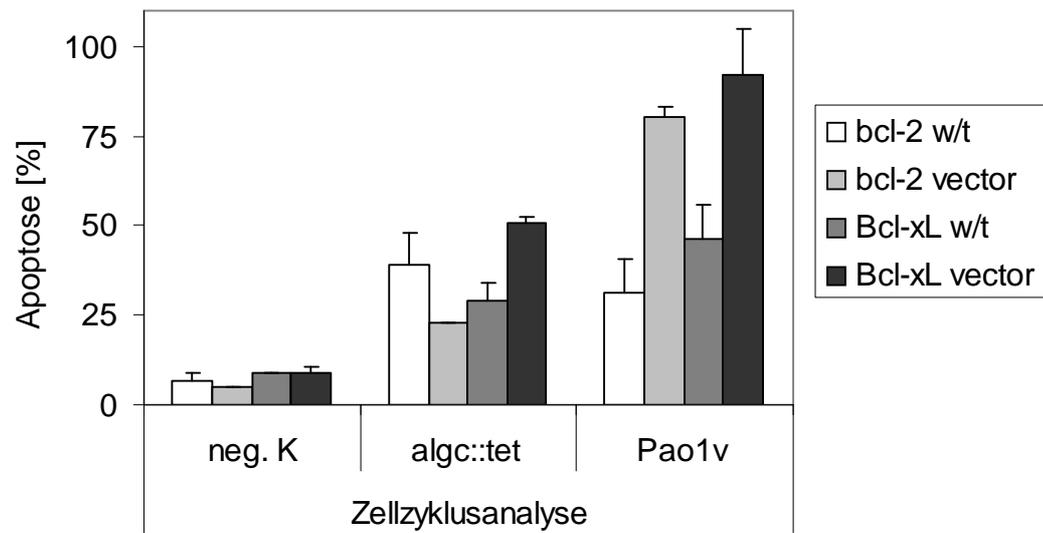


Abbildung 30: **Induktion von Apoptose in den bcl überexprimierenden Zellen bcl-2 und bcl-xL.** Pao1v verursacht Apoptose über den mitochondriellen Weg. Apoptose durch Pak R1 algc::tet fällt bei den Vectorzellen geringer aus als durch Pao1v.

4 Diskussion

P. aeruginosa verursacht respiratorische Infektionen bei immunkompromitierten Patienten. Besonders auf Intensivstationen ist *P. aeruginosa* als Verursacher von nosokomialen Pneumonien gefürchtet. Nosokomiale Pneumonien, die von *P. aeruginosa* verursacht werden, sind mit einer Letalität von bis zu 50 % behaftet. Die Mechanismen, die auf molekularer Ebene eine erhöhte Anfälligkeit für *P. aeruginosa* bei Patienten auf Intensivstationen bedingen, sind weitestgehend unbekannt. Bei Patienten auf Intensivstationen könnte die Abwehr von *P. aeruginosa* im Vergleich zu gesunden Individuen gestört sein. Eine gestörte Abwehr würde einen Überlebensvorteil für das Bakterium *P. aeruginosa* ergeben und dann eine Erklärung für die erhöhte Anfälligkeit von Intensivpatienten für eine nosokomiale Pneumonie durch *P. aeruginosa* sein. Das Krankheitsmodell der zystischen Fibrose dient der Betrachtung von einer auf spezifischer Art und Weise gestörten Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt. Die Mutation des Proteins CFTR führt zu einem Eliminationsdefizit von *P. aeruginosa* aus der Lunge. Die spezifisch beeinträchtigte Elimination verursacht bei Patienten, die an zystischer Fibrose leiden, chronisch persistierende Infektionen mit *P. aeruginosa*. Der Zusammenhang zwischen der Expression eines veränderten CFTR - Proteins und der gestörten Elimination von *P. aeruginosa* im Respirationstrakt ist nicht vollständig aufgeklärt. CFTR ist ein Rezeptor für das LPS von *P. aeruginosa* und vermittelt die Internalisierung von *P. aeruginosa* via Endozytose in respiratorische Epithelzellen.^{97,96} Dieser Vorgang stellt in der Abwehr von *P. aeruginosa* einen zentralen Mechanismus dar. Welche weiteren Schritte der Aufnahme in die respiratorischen Wirtszellen folgen, ist nicht bekannt. Die Entschlüsselung des Mechanismus, der zur erhöhten Anfälligkeit für *P. aeruginosa* Lungeninfektionen bei Patienten mit zystischer Fibrose führt, könnte unter Umständen zur Klärung der erhöhten Prädisposition von Intensivpatienten für die nosokomiale Pneumonie durch *P. aeruginosa* beitragen. Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Keimelimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt durch Internalisierung in die respiratorische Epithelzelle und anschließender Apoptoseinduktion. Der apoptotische Untergang von respiratorischen Epithelzellen, die mit

internalisierten *P. aeruginosa* – Bakterien beladen sind, dient dem Ablösen aus dem epithelialen Verband und dann der Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt. Möglicherweise werden die apoptotischen Zellen von Nachbarzellen endozytiert und verdaut oder sie werden mit Hilfe der mukoziliären Clearance aus dem Respirationstrakt entfernt.

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichend Zelllinien eingesetzt, die entweder über ein mutiertes CFTR ($\Delta F508$) oder über ein wildtyp CFTR verfügten. Diese Zelllinien wurden auf die Frage hin getestet, ob die Interaktion zwischen *P. aeruginosa* LPS und wildtyp CFTR zum apoptotischen Untergang respiratorischer Epithelzellen führt. Schroeder et al.⁹⁶ haben in einer Studie untersucht, welche Konsequenzen die Interaktion von *P. aeruginosa* LPS mit respiratorischen Epithelzellen hat. In dieser Veröffentlichung ist nur ein kurzes Zeitfenster nach Stimulation von respiratorischen Epithelzellen mit *P. aeruginosa* LPS untersucht worden, das sich auf ein Intervall zwischen der ersten und vierten Stunde nach Gabe der LPS – Dosis bezog. Die Erweiterung des Beobachtungsintervalls auf Zeiten, die für die Induktion und Messung von Apoptose realistisch sind, wurde in der vorliegende Arbeit vorgenommen, um zu untersuchen, ob das LPS von *P. aeruginosa* nach der Bindung an wildtyp CFTR eine Kette von Signalen auslöst, an deren Anfang die Aktivierung von NF κ B und an deren Ende die Induktion von Apoptose in der betroffenen Zelle steht.

4.1 Apoptose durch das LPS von *P. aeruginosa*

Um die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* LPS zu untersuchen, diente ein Zellmodell respiratorischer Epithelzellen (CFT1). Dieses Zellmodell unterscheidet Zellen, die die häufigste CFTR Mutation bei zystischer Fibrose ($\Delta F508$) exprimieren, von Zellen, die das wildtyp CFTR exprimieren. Die CFT1 Zelllinien stammen ursprünglich von einem Patienten, der an zystischer Fibrose erkrankt war. CFT1 – Zelllinien, die wildtyp CFTR exprimieren, sind mit einem retroviralen Vektor transfiziert worden. Der Vorteil dieses Zellmodells ist es, die mögliche Rolle der Apoptose als Eliminationsmechanismus von *P. aeruginosa* aus der Lunge zu untersuchen und Rückschlüsse auf das Krankheitsmodell der zystischen Fibrose zu ziehen. Außerdem wurde eine respiratorische

Epithelzelllinie (A549) als Kontrollzelllinie betrachtet, die nicht nachträglich gentechnisch mittels retroviralem Vektor transfiziert worden ist, um die Expression von wildtyp CFTR zu erreichen. Diese Zelllinie exprimiert an sich wildtyp an ihrer Oberfläche.

Wildtyp CFTR vermittelt die Endozytose von ganzen *P. aeruginosa* – Bakterien in die respiratorische Epithelzelle, was über die spezifische Bindung von CFTR an *P. aeruginosa* LPS geschieht. Wenn die Elimination von *P. aeruginosa* über Apoptose erfolgt, dann müsste man beim Betrachten des Krankheitsmodells der zystischen Fibrose fordern, dass die mit der Elimination von *P. aeruginosa* vergesellschaftete Apoptose in kausalem Zusammenhang mit der Aktivierung von CFTR steht. Gesunde Individuen unterscheiden sich von Patienten mit zystischer Fibrose allein durch eine Mutation im CFTR – Gen. Diese Mutation geht mit einer verminderten Internalisierung von *P. aeruginosa* in respiratorische Epithelzellen einher. Sollte die Funktion von CFTR als Rezeptor für *P. aeruginosa* an der Oberfläche von respiratorischen Epithelzellen für das Eliminationsdefizit von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt verantwortlich sein, dann ist das Eliminationsdefizit mit einer Fehlfunktion von respiratorischen Epithelzellen assoziiert. Ob die entscheidende Fehlfunktion respiratorischer Epithelzellen ein gestörter Ablauf der Apoptose in Zellen mit $\Delta F508$ an ihrer Oberfläche ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Ein besonderer Fokus war die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* in Abhängigkeit der spezifischen Interaktion zwischen dem smooth LPS von *P. aeruginosa* und seinem Rezeptor dem CFTR Protein. Daher wurde in einem ersten Schritt die Induktion von Apoptose durch das isolierte *P. aeruginosa* LPS untersucht.

Das LPS – Molekül von *P. aeruginosa* ist als wichtigstes Oberflächenantigen an der Interaktion zwischen eukaryoter und prokaryoter Zelle wesentlich beteiligt. Das LPS-Molekül ist über den hydrophoben Lipid A Anteil in der äußeren Membran von *P. aeruginosa* verankert und über die Core-Region mit den oberflächlichen O-spezifischen Seitenketten verbunden. Es nimmt durch seine Lokalisation mit der benachbarten Umwelt des Keims Kontakt auf.

Die Bezeichnungen „smooth“ und „rough“ beziehen sich auf den Phänotyp von

P. aeruginosa LPS. Das Vorhandensein von Lipid A, Core und O-spezifischen Seitenketten gilt als smooth LPS Phänotyp, während das Fehlen der O-spezifischen Seitenketten als rough Phänotyp bezeichnet wird. Der rough Phänotyp zeichnet sich durch eine geringere Immunogenität und eine geringere Virulenz aus.¹⁹ Der isolierte LPS - rough Phänotyp ist nicht zur Interaktion zwischen CFTR und Zelle befähigt. Dieser LPS – Phänotyp verursacht keine Zellaktivierung und ist nicht durch Endozytose internalisierbar. Auch ganze Bakterien, die diesen *P. aeruginosa* LPS Phänotyp an der Oberfläche tragen, können nicht in respiratorische Epithelzellen internalisiert werden.

Die intakte epitheliale Barriere der Bronchialzellen stellt ein Hindernis für die Invasion eines Keims in das Gewebe dar. Bronchiale Epithelzellen sind polar angeordnet und gehen interzelluläre Verbindungen mit Nachbarzellen ein. Diese Verbindungen werden als „tight junctions“ bezeichnet und kompartimentieren die Zellmembran in einen apikalen Bereich (luminal) und einen basolateralen Bereich (auf Seiten der Basalmembran). Wie aus Untersuchungen von Fleiszig et al. bekannt ist, findet die endozytische Internalisierung von LPS via CFTR an der basolateralen Membran statt.^{30,70}

Um dem möglichen Fehler, dass das gelöste LPS nur die apikale Membran der adhärenen respiratorischen Epithelzellen erreicht, zu entgehen, wurden die adhärenen Epithelzellen vor einer LPS – Exposition von der Unterlage abgelöst und als Zellsuspension mit dem *P. aeruginosa* LPS in Kontakt gebracht.

Die Kontrollzelllinie A549 konnte in Suspension mit *P. aeruginosa* LPS in Kontakt gebracht werden. Die zu erwartende Internalisierung von wildtyp LPS via intaktem CFTR an der Zelloberfläche von A549 – Zellen konnte im Zeitraum bis 24 Stunden keine Apoptose induzieren. Die LPS – Exposition von den CFT1 – Zelllinien in Suspension ergab eine unspezifische Induktion von Apoptose, die auf die Versuchsbedingungen in Suspension zurückzuführen war. Dieselbe Betrachtung bei CFT1 – Zelllinien in einem Versuchsansatz mit adhärenen Zellen ergab eine fehlende Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* smooth LPS. Eine Apoptoseinduktion durch rough LPS konnte im beschriebenen Versuchsdesign nicht nachgewiesen werden.

Der fehlende Nachweis einer Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* LPS in respiratorischen Epithelzellen spricht dafür, dass die Interaktion von CFTR mit dem smooth LPS von *P. aeruginosa* nicht kausal an der Induktion von Apoptose durch den Keim *P. aeruginosa* beteiligt ist. Als alleiniges Stimulans reicht die Inkubation mit dem gelösten smooth LPS von *P. aeruginosa* nicht aus, um Apoptose in respiratorischen Epithelzellen zu induzieren.

Eine mögliche Fehlerquelle bei den vorliegenden Untersuchungen könnte auf einem erhaltenen Zellverband beruhen, bei dem die basolateralen Membrananteile, die im normal polarisierten respiratorischen Epithel die Internalisierung von smooth *P. aeruginosa* LPS via CFTR vermitteln, nicht zugänglich sind für das LPS von *P. aeruginosa*. Die bei den vorliegenden Versuchen untersuchten subkonfluenten Epithelverbände respiratorischer Epithelzellen bilden Zell zu Zell – Kontakte aus, die jedoch keine Kompartimentierung in eine apikale und basolaterale Membran ermöglichen. Das Auftragen von smooth LPS auf diesen epithelialen Zellverband ermöglicht, dass das LPS mit allen Membrananteilen der respiratorischen Epithelzellen in Berührung kommen. Um eine Autoaggregation der einzelnen LPS – Moleküle unwahrscheinlich werden zu lassen sind die LPS – haltigen Lösung vor der Anwendung auf respiratorischen Epithelzellen für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt worden. Es konnte in der Arbeit von Schroeder et al. gezeigt werden, dass dieses Vorgehen die Internalisierung von fluoreszenzmarkiertem smooth LPS von *P. aeruginosa* in respiratorischen Epithelzellen ermöglicht. Die Internalisierung dieses smooth LPS wurde durch CFTR vermittelt.⁹⁵

Das methodisch identische Vorgehen bei der Exposition der selben respiratorischen Epithelzellen mit smooth LPS von *P. aeruginosa*, lässt den Schluss zu, dass bei den Untersuchungen in dieser Arbeit das smooth LPS von *P. aeruginosa* eine Interaktion mit CFTR eingegangen ist, die dazu führte, dass smooth LPS via Endozytose in die respiratorische Epithelzelle aufgenommen wurde. Die smooth LPS CFTR Interaktion reichte als Signaltransduktion für Apoptose der respiratorischen Epithelzelle möglicherweise nicht aus. Die Unterschiede zwischen den Untersuchungen von Schröder et al. und den vorliegenden Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf das gewählte

Zeitfenster. Daher bleibt ungeklärt, ob die Inkubation mit *P. aeruginosa* LPS über den langen Zeitraum von 24 Stunden ständig aufrechterhalten werden kann, oder ob nach einigen Stunden eine Reaggregation der LPS – Moleküle eintritt, die dann als Signal für die Induktion von Apoptose nicht ausreicht.

Die vorliegende Arbeit konnte keinen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von CFTR durch das smooth LPS von *P. aeruginosa* und der Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* erbringen. Vorausgesetzt, die erhaltenen Ergebnisse unterliegen keinem systematischen Fehler, könnte man darauf schließen, dass CFTR nach Aktivierung durch das smooth LPS von *P. aeruginosa* zur Aktivierung von NF κ B führt, aber diese Aktivierung auf lange Sicht hin gesehen keine Induktion von Apoptose zur Folge hat. Daher könnte man diesen Ergebnissen ablesen, dass das LPS von *P. aeruginosa* in respiratorischen Epithelzellen keine Apoptose auslöst. Die fehlende Induktion von Apoptose konnte durch Variation der CFTR – Expression nicht beeinflusst werden. Weder das Vorhandensein von wildtyp CFTR an der Oberfläche der Zelle noch die Expression von Δ F508 CFTR an der Zelloberfläche konnte nach Stimulation durch das smooth LPS oder nach Stimulation durch das rough LPS Apoptose induzieren.

4.2 Der Einfluss eines polaren epithelialen Zellverbands in der *P. aeruginosa* – induzierten Apoptose

Die epitheliale Schutzbarriere trennt den Organismus von seiner Umwelt und erschwert die Invasion von Mikroorganismen in das Gewebe. Die epitheliale Zelle ist über „tight junctions“ mit ihren benachbarten Zellen verknüpft. Man unterscheidet einen basolateralen Teil, der der Basalmembran zugewandt ist, von einem dem Lumen zugewandten Teil der Plasmamembran. Der gemessene transepitheliale Widerstand ist abhängig von der Dichte der „tight junctions“ zwischen benachbarten Zellen. Er ist umso höher, je dichter der epitheliale Verband abschließt. Die Aufnahme von *P. aeruginosa* durch respiratorische Epithelzellen ist abhängig von der Dichtigkeit, mit der die Epithelbarriere abschließt.³⁰ Die Endozytose von *P. aeruginosa* findet nicht am apikalen Membranabschnitt statt. *P. aeruginosa* muss zur Invasion in die Wirtszellen den basolateralen Membranabschnitt erreichen, was das Auflösen

der Polarität des epithelialen Verbandes zur Bedingung hätte, da die basolateralen Abschnitte der Zellmembran nicht ohne Durchbruch der „tight junctions“ von luminal her zugänglich ist.¹¹⁴ Die bestmöglichen Bedingungen, um die LPS-CFTR-Interaktion hinsichtlich der Apoptoseinduktion zu untersuchen, sind daher dann gegeben, wenn man die Interaktionen an unpolarisierten Epithelzellen durchführt.

In der vorliegenden Arbeit hatte die Erleichterung der endozytotischen Aufnahme des *P. aeruginosa* LPS in die untersuchten Epithelzellen keinen Einfluss auf die Apoptoseantwort. Die Interaktionen zwischen *P. aeruginosa* LPS und den Lungenepithelzellen führten nicht zur Apoptoseinduktion. Diese Antwort auf das LPS-Stimulans ging sowohl aus den Untersuchungen an polaritätslosen Zellen als auch aus Experimenten, bei denen die Zellen im Verband adhärent belassen worden sind, hervor.

Der sich ergebende Vorteil, Zellen in adhärenter Form zu untersuchen, bestand darin, dass bei Betrachtung langer Zeiträume die Zellen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz spontan apoptotisch wurden. Durch das Belassen im Zellverband war es möglich, die Kinetik nach Inkubation mit verschiedenen Stimulantien zu charakterisieren. Der polarisierte Zellverband gewinnt für die Interaktionen durch *P. aeruginosa* und CFTR Bedeutung, wenn die Dichte der „tight junctions“ so hoch ist, dass sich transepitheliale Widerstände ergeben, die sich im Bereich von $1000 \Omega/\text{cm}^2$ und mehr bewegen.⁷¹

Die untersuchten Zellen (CFT1 und A549) gehören zu den respiratorischen Epithelzellen mit eher niedrigem transepithelialen Widerstand.⁷¹ Daraus kann abgeleitet werden, dass bei den respiratorischen Epithelzellen trotz Belassen in adhärenten Zellverbänden keine Trennung in apikale und basolaterale Membrankompartimente erfolgt.

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Stimulans hätte daher trotz Adhärenz der Zelle aufgenommen werden können, falls es die Voraussetzungen für die Internalisierung mitbrächte. Daher kann in der vorliegenden Studie davon ausgegangen werden, dass die untersuchten respiratorischen Epithelzelllinien ohne Einschränkungen auf eine Stimulation durch *P.*

aeruginosa LPS oder eine Infektion mit *P. aeruginosa* Bakterien reagieren. Die Fehlerquelle, dass bei adhärenzte Epithelzellen eine Interaktion zwischen CFTR und dem smooth LPS von *P. aeruginosa* wegen der Polarität dieser Zellen unterbleibt, kann als vernachlässigt werden.

4.3 Die modulierende Wirkung von CFTR auf die Apoptose durch den Keim *P. aeruginosa*

P. aeruginosa induziert Apoptose in respiratorischen Epithelzellen.^{90,44} Die jetzige Arbeit untersuchte, ob die Apoptose durch *P. aeruginosa* in respiratorischen Epithelzellen bei der Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt beteiligt ist. In dem vereinfachten Eliminationsmodell, das sich an das Krankheitsmodell der zystischen Fibrose anlehnt, wird davon ausgegangen, dass die Expression eines mutierten CFTR, das seiner Funktion als Vermittler der Endozytose von *P. aeruginosa* in die respiratorische Epithelzelle nicht nachkommen kann, die Elimination von *P. aeruginosa* verzögert oder gar unmöglich macht. Auf welchem Weg die gestörte Endozytose die Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt hindert, ist bisher ungeklärt. Eine Fragestellung dieser Arbeit war, ob die spezifische Interaktion zwischen CFTR und dem smooth LPS von *P. aeruginosa* zu einem verstärkten apoptotischen Absterben der untersuchten respiratorischen Epithelzellen führt. Wenn die Apoptosehäufigkeit bei respiratorischen Epithelzellen mit Expression von wildtyp CFTR nach Infektion mit dem Keim *P. aeruginosa*, der smooth LPS an der Oberfläche trägt, erhöht wäre, dann könnte man anhand dieses vereinfachten Eliminationsmodells argumentieren, dass die Expression von wildtyp CFTR an der Zelloberfläche zu einer besseren Clearance des Bakteriums *P. aeruginosa* aus der Lunge beiträgt, indem die respiratorischen Epithelzellen, die *P. aeruginosa* internalisieren, apoptotisch werden. Die Apoptose könnte bei Betrachtung des vereinfachten Eliminationsmodells zur spezifischen Clearance von *P. aeruginosa* beitragen.

4.3.1 Die Beteiligung des Chloridkanals CFTR an der Apoptosemaschinerie der Zelle

Der Vergleich der Apoptosefrequenz zwischen respiratorischen Epithelzellen, die über einen komplett funktionsfähigen CFTR-Kanal verfügen und Zellen, deren CFTR-Kanal durch Mutation seine Funktion als Chloridkanal, Regulator verschiedener anderer Kanäle und als Rezeptor von *P. aeruginosa* verloren hat, birgt Gefahren. Mögliche Unterschiede in der Apoptosefrequenz zwischen den Zelllinien könnten natürlich auf die Funktion von CFTR als Rezeptor von *P. aeruginosa* zurück zu führen sein. Jedoch müsste dann ausgeschlossen werden, dass der CFTR-Kanal nicht durch andere Funktionen – zum Beispiel als Regulator anderer Proteine - in den Ablauf der Apoptose in der Zelle eingreift. Daher wird im folgenden Kapitel die Bedeutung von verschiedenen CFTR - Funktionen bei der Induktion von Apoptose anhand der gegenwärtigen Literatur diskutiert. Es soll gezeigt werden, dass die anderen Funktionen von CFTR keinen Einfluss auf die Apoptoseregulation der Zelle ausüben. Mit Ausschluss dieser Fehlerquelle können alle gemessenen Unterschiede zwischen Zellen, die wildtyp CFTR exprimieren, und Zellen, die $\Delta F508$ CFTR exprimieren, auf die Funktion von CFTR als Rezeptor des smooth LPS von *P. aeruginosa* zurückgeführt werden.

In der aktuellen Literatur findet man kontroverse Aussagen bezüglich der Rolle von CFTR bei der Apoptose.

Zunächst werden nun die Argumentationsketten der Autoren dargestellt, die eine proapoptotische Funktion von CFTR befürworten. Falls CFTR eine proapoptotische Funktion hätte, würden Zellen, die $\Delta F508$ CFTR an der Oberfläche exprimieren per se resistenter gegen apoptotische Stimuli reagieren.

Es wird argumentiert, dass CFTR notwendig ist, um eine regelrechte zytoplasmatische Ansäuerung zu garantieren.⁴⁹ Möglicherweise funktioniert CFTR selbst als HCO_3^- - Transporter oder aber CFTR vermittelt über Interaktion mit anderen Kanälen die intrazelluläre Ansäuerung.⁴⁹ Eine zytoplasmatische Ansäuerung wird als ein frühzeitiges Ereignis in der Apoptosekaskade aufgefasst, das erforderlich ist, um die saure Endonuklease, die für die DNA-

Fragmentierung vonnöten ist, zu aktivieren.³⁹

Für einige Autoren ist dieser Mechanismus die entscheidende Ursache für die Beteiligung von CFTR an der Apoptoseregulation.^{5,38}

Für einige Arbeitsgruppen liegt die proapoptotische Bedeutung von CFTR in der Fähigkeit, neben dem Chloridtransport auch den Glutathiontransport in die Zellen zu vermitteln.³⁴ Diese Entdeckung stellt eine Verbindung zwischen CFTR und der Oxidantienabwehr der Lunge her. Die Glutathionkonzentration von Lungenepithelzellen ist von der CFTR-Expression abhängig. Ein zytoplasmatischer Verlust von Glutathion vermittelt eine Cytochrom c Ausschüttung aus dem Mitochondrium mittels Aktivierung von BAX, ein proapoptotisches Protein der bcl-2 Proteinfamilie. In Zellen, die wildtyp CFTR exprimieren, wird BAX nach oxidativem Stress eher aktiviert als in Zellen mit mutiertem CFTR.⁵⁶ Auch zytoplasmatische pH-Alterationen führen zu einer BAX-Aktivierung.^{61,84,9} Zusammengetragen könnten also sowohl der verzögerte Glutathionverlust aus dem Zytoplasma als auch die verzögerte zytoplasmatische Ansäuerung eine verminderte Aktivierung von BAX bedingen, die die beobachtete Resistenz von Zellen mit verändertem oder fehlendem CFTR erklärt.

Im Gegensatz zu den obigen Studien werden nachfolgend Untersuchungen beschrieben, die befürworten, dass CFTR mit seiner Funktion antiapoptotisch wirkt. Damit würden Zellen, die über mutiertes CFTR verfügen, eher an Apoptose zugrunde gehen als Zellen, die über das wildtyp CFTR verfügen.

Die Inhibition des Chloridstroms von CFTR durch Glibenclamid induziert Apoptose in Hepatoblastomzellen.^{62,63} Untersuchungen an Darm- und Bronchialepithelien, die aus Biopsiematerial von CF-Patienten gewonnen worden sind, zeigten eine erhöhte basale Apoptoserate im Vergleich zum Kontrollepithel.⁷⁶ Die Arbeitsgruppe postulierte, dass in CF-Zellen der Apoptoseprozess zunächst vermehrt initiiert wird und es zu einer vermehrten DNS-Fragmentierung in den Epithelien kommt. Die Zellen verfehlen es jedoch dann, den Prozess zu komplettieren.

Befürwortet wird diese Ansichtswiese dadurch, dass die Architektur der

Darmzotten in den Untersuchungen bis auf eine vermehrte DNS-Fragmentierung intakt ist. Da in dieser Studie Lungenepithelien von potentiell chronisch mit *P. aeruginosa* infizierten Patienten mit gesunden Kontrollen verglichen worden ist, sind die gewonnenen Ergebnisse jedoch eher wenig aussagekräftig, da eine prolongierte *P. aeruginosa*-Exposition ebenfalls Apoptose vermittelt.¹⁶ Ebenfalls könnten die Ergebnisse der Autoren auf eine verzögerte Elimination der apoptotischen Zellen zurückgeführt werden.¹⁰⁵

Im Gegensatz zu bisher dargelegtem sind einige Autoren zum Schluss gekommen, dass CFTR gar keinen Einfluss auf die Apoptosesensitivität der Zelle hat:

Die Apoptoserate nach UV-Bestrahlung, Doxorubicin-, Puromycin- und Staurosporin-Exposition von CFT1-Zelllinien ändert sich nicht signifikant abhängig von der CFTR-Expression.^{33,15} Die Autoren schlussfolgern, dass die CFTR-Funktion die Empfindlichkeit der Zelle für Apoptose nicht beeinflusst. Diese Voruntersuchungen in der Studie von Cannon et al.¹⁶ bedeuten für die Experimente der vorliegenden Arbeit, dass man die Unterschiede in der Apoptosefrequenz mit der Funktion von CFTR als Rezeptor für das smooth LPS von *P. aeruginosa* in Verbindung bringen kann. Cannon et al. konnten zeigen, dass nach der Induktion von Apoptose durch eine Reihe von Apoptosestimulantien, die als Positivkontrollen dienten, keine Unterschiede zwischen den verschiedenen CFT1 – Zelllinien messbar waren. Die Testung dieser verschiedenen Positivkontrollen, die auf unterschiedliche Mechanismen zur Apoptoseinduktion zurückgriffen, an CFT1 – Zellen konnte für diese Zellmodell festlegen, dass die anderen CFTR – Funktionen außer der Funktion als Rezeptor für das LPS von *P. aeruginosa* keine Unterschiede in der Apoptosesensitivität der Zellen verursachten. Diese Voruntersuchungen zum Ausschluss von interferierenden CFTR – Funktionen im Apoptosegeschehen ergaben, dass es trotz Unterschied der CFTR – Expression an der Oberfläche zu keinen Unterschieden in der Apoptosehäufigkeit von CFT1 – Zellen kam. Der Einsatz von einem identischen Zellmodell für diese Untersuchungen erlaubt es, parallel zu der Studie von Cannon et al. davon auszugehen, dass alle messbaren Effekte zwischen wildtyp und $\Delta F508$ Expression auf die CFTR –

Funktion des Rezeptors für das smooth LPS von *P. aeruginosa* zurückzuführen sind.

Für das in dieser Arbeit untersuchte Zellmodell konnte gezeigt werden, dass sich Ungleichheiten in der Expression von wildtyp CFTR zur Expression von $\Delta F508$ CFTR nicht in den gemessenen Apoptoseparametern nach Induktion von Apoptose mit verschiedenen Stimulantien ergeben.¹⁵ Auf dieser Ebene konnte Cannon et al. zeigen, dass das CFT1 – Zellmodell geeignet ist, die Hypothese zu testen, dass CFTR modulierend auf die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* einwirkt, und dass diese Modulation auf die Bindung von smooth LPS von *P. aeruginosa* zurückzuführen ist.

Dass ein fehlender Einfluss der wildtyp CFTR - Expression und der $\Delta F508$ CFTR Expression auf die Induktion von Apoptose durch verschiedene Stimuli besteht, konnte bisher nur für das CFT1 - Zellmodell erbracht werden. Ob ein CFTR-Defekt Einfluss auf die Apoptosemaschinerie der Zelle nimmt, kann also anhand der Datenlage derzeit nicht mit letztendlicher Sicherheit beurteilt werden. Die bisherigen Aussagen zur Rolle von CFTR während der Apoptose verhalten sich widersprüchlich.^{33,15,34,56,84}

4.3.2 CFTR beeinflusst via spezifischer *P. aeruginosa* - LPS – Interaktion die Apoptoseantwort

Nachdem anhand der ersten Ergebnisse ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Interaktion von *P. aeruginosa* LPS mit seiner Bindungsstelle am CFTR – Molekül in der *P. aeruginosa* induzierten Apoptose nicht nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob die von *P. aeruginosa* induzierte Apoptose durch CFTR – Expression quantitativ beeinflusst wird. Damit käme dem CFTR – Protein eine modulierende Wirkung bei der *P. aeruginosa* induzierten Apoptose zu.

Hinsichtlich dieser Fragestellung konnten in Untersuchungen an CFT1 – Zelllinien keine Unterschiede zwischen solchen Zellen, die wildtyp CFTR exprimieren und solchen, die $\Delta F508$ - CFTR exprimieren, gemessen werden. Die CFTR – Expression hatte somit keinen Einfluss auf die Apoptosekinetik der

Zellen. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Abhängigkeit zwischen Apoptoserate und der Expression von wildtyp CFTR an der Oberfläche hergestellt werden. Die Beeinflussung der Apoptosequantität durch die Internalisierung von *P. aeruginosa* via *P. aeruginosa* smooth LPS – CFTR – Interaktion erscheint wenig wahrscheinlich. Besonders dann, wenn der *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *algC::tet* mit dem rough Phänotyp, dessen Internalisierung mittels CFTR nicht möglich ist, Apoptose induziert.

Das LPS von *P. aeruginosa* und dessen Interaktion mit CFTR ist laut den Ergebnissen dieser Arbeit also weder Trigger noch Modulator der Apoptose durch *P. aeruginosa*.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass die Fähigkeit zur Internalisierung bei wildtyp CFTR exprimierenden Zellen nicht mit einer verstärkten Apoptoseinduktion einhergeht. Die unterschiedliche Internalisierung durch die verschiedenen CFT1 – Zelllinien führte nicht zu einer quantitativen Änderung der Apoptoserate. Dabei waren auch *P. aeruginosa* Stämme in der Lage Apoptose zu induzieren, die aufgrund des rough LPS nicht durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen werden konnten. Es konnte daher keine Korrelation zwischen der Zytotoxizität von *P. aeruginosa* und dessen Internalisierung hergestellt werden. Diese Aussage steht im Einklang mit der Arbeit von Evans et al.²⁴ Diese Arbeit konnte zeigen, dass *P. aeruginosa* Stämme, die nicht zur Invasion in die Zelle befähigt waren, trotzdem über eine unveränderte Zytotoxizität verfügten.

In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vereitelung der Internalisierung von *P. aeruginosa* durch die Blockierung der Bindungsstelle von CFTR für LPS mit einem homologen Peptid die durch *P. aeruginosa* induzierte Apoptose nicht verhindern konnte.⁸⁶

Die Arbeitsgruppe von Cannon et al. konnte zwei Korrelationen belegen: Erstens wurde eine Wechselbeziehung zwischen Expression von CFTR und der Apoptosequantität gemessen. Zweitens hat diese Arbeitsgruppe eine Korrelation zwischen der Menge internalisierter Bakterien und der Apoptoserate herstellen können. Die gemessenen Unterschiede und Wechselbeziehungen zwischen

den untersuchten Parametern erlauben jedoch noch keine kausale Schlussfolgerung. Man kann also nicht sagen, dass die erhöhte Apoptoserate durch die Menge der internalisierten Bakterien begründet ist, denn der ursächliche Zusammenhang ist in dieser Arbeit nicht untersucht worden. Die Arbeitsgruppe konnte ferner nachweisen, dass sich keine Auswirkung auf die Apoptosehäufigkeit ergibt, wenn die Internalisierung mittels Cytochalasin D inhibiert wird, das zur Zerstörung von Aktinfilamenten führt und als Konsequenz die Internalisierung hemmt.¹⁵ Auch diese Ergebnisse von Cannon et al. sprechen gegen einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der Internalisierung und der Apoptoseinduktion. Die Autoren argumentieren, dass die Internalisierung von *P. aeruginosa* ein unabhängiger Prozess ist, der nicht von der Internalisierung abhängig ist. Weiterhin haben die Ergebnisse von Cannon et al. gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der wildtyp CFTR – Expression an der Zelloberfläche besteht. Aber auch in diesem Fall konnte kein ursächlicher Zusammenhang hergestellt werden..

Die Ergebnisse von Cannon et al. unterscheiden sich von denen der vorliegenden Arbeit. Die vorliegenden Untersuchungen haben ebenfalls die Apoptosequantität mit der Expression von wildtyp und $\Delta F508$ CFTR ins Verhältnis gesetzt. Dabei konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Die Interpretation der diskrepanten Ergebnisse zwischen den Arbeiten die sich auf ein identisches Zellmodell berufen ist schwierig. Da die Arbeitsgruppe von Cannon et al. keinen kausalen Zusammenhang aufzeigen konnte und die gemessenen Unterschiede auf eine Korrelation beschränkt ist, kommen vielfältige Erklärungsmöglichkeiten in Frage. Beispielsweise könnten die sich unterscheidenden Infektionszeiten, die sich unterscheidenden Nachweismethoden für Apoptose oder andere methodische Unterschiede für die divergierenden Ergebnisse in Frage kommen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sprechen insgesamt für eine von der Internalisierung abgekoppelte Induktion von Apoptose: Der *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 algc::tet mit rough LPS auf der Zelloberfläche war in der Lage, Apoptose zu initiieren, obwohl rough LPS dieses Stammes nicht mit CFTR

interagieren kann und daher folglich das Bakterium auch nicht endozytotisch in respiratorische Epithelzellen aufgenommen werden kann. Die Fähigkeit, Apoptose zu initiieren beschränkte sich jedoch auf die CFT1 – Mutterzelllinie, die nicht retroviral transfiziert worden ist, bei allen retroviral transfizierten Abkömmlingen der Mutterzelllinie CFT1 – parental wurde durch Pak R1 *alg::tet* keine Apoptose induziert. Eine denkbare Möglichkeit für diese Beobachtung wäre, dass die Abkömmlinge von CFT1 – parental eine klonale Resistenz erworben haben, die sie resistent gegen die durch Pak R1 *alg::tet* A induzierte Apoptose machen könnte. Zum besseren Verständnis der Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* Stämmen mit dem rough LPS Phänotyp sind weitere Untersuchungen notwendig, die diese Beobachtung auch in anderen Zellmodellen respiratorischer Epithelzellen testen, um festzustellen, ob das Zellmodell der CFT1 – Zelllinien für die Untersuchung von Apoptose überhaupt geeignet ist. Falls die Transfektion der Mutterzelllinie CFT1 – parental zu einer Veränderung der Abkömmlinge geführt hätte, wäre die Konsequenz, dass die Induktion von Apoptose durch den Stamm Pak R1 *alg::tet* über einen anderen Signaltransduktionsweg vermittelt wird als bei der Apoptoseinduktion durch einen *P. aeruginosa* Stamm, der über den smooth LPS Phänotyp verfügt. Davon abgesehen wären die Zelllinien, die Abkömmlinge von CFT1 – parental sind, nicht geeignet, um Untersuchungen zur Apoptose durch *P. aeruginosa* durchzuführen.

Die bisher erarbeiteten Besonderheiten der Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* sollen nun im Lichte anderer Eigenschaften von *P. aeruginosa* vermittelter Apoptose betrachtet werden.

Da das Typ III Sekretionssystem eine notwendige Voraussetzung für die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* in epithelialen Zellen ist^{52,90}, soll darauf im Folgenden darauf eingegangen werden, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit einer *P. aeruginosa* induzierten, durch das Typ III System vermittelten Apoptose stehen, obwohl in der vorliegenden Arbeit das Typ III System gram – negativer Bakterien nicht explizit untersucht wurde.

Durch das Typ III Sekretionssystem werden Effektorproteine (Zytotoxine) mittels eines bakteriellen Einschleusungssystems in die Wirtszelle eingebracht, um dort physiologische Vorgänge der betroffenen Zelle zu modulieren. Für *P. aeruginosa* sind vier Faktoren, die via Typ III Sekretionssystem in der Wirtszelle agieren, bekannt. Es handelt sich um ExoS, ExoT, ExoU und ExoY.^{31,110,111,29,4} Diese Zytotoxine funktionieren enzymatisch und verändern physiologische Abläufe in der Zelle durch Alteration kovalenter Bindungen, beispielsweise durch ADP-Ribosylierung oder Dephosphorylierung von Wirtsproteinen. Durch *P. aeruginosa* in die Wirtszelle eingeschleustes ExoS kommt es beispielsweise zur Aktivierung proapoptotischer Signaltransduktionswege, während rettende Signaltransduktionswege in der Regulation von Zellwachstum und Zelltod supprimiert werden.⁵⁴

In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch *P. aeruginosa* Stämme Apoptose induzieren, die nicht durch Endozytose via CFTR internalisiert werden, weil der rough LPS Phänotyp keine Endozytose vermittelt. Daher wird eine Apoptoseinduktion befürwortet, zu der die Internalisierung keine Voraussetzung ist. Die, den Ergebnissen dieser Arbeit zu entnehmende Tatsache, dass zur Apoptoseinduktion durch den nicht – invasiven *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 algc::tet auch ohne endozytotische Aufnahme in die Zelle Apoptose in respiratorischen Epithelzelllinien verursacht, lässt darauf schließen, dass zur Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* die alleinige Adhärenz ausreicht. Dies steht im Einklang mit der Typ III-vermittelten Apoptoseinduktion, bei der ebenfalls keine Internalisierung des gesamten Bakteriums notwendig ist.

4.4 Der Signaltransduktionsweg von *P. aeruginosa* induzierter Apoptose

Die vorliegenden Untersuchungen beschäftigten sich in einem wichtigen Teilabschnitt mit der Signalkaskade, die der Apoptose durch *P. aeruginosa* zugrunde liegt. In einer Veröffentlichung von Grassme et al. konnte ein Zusammenhang zwischen einem Signaltransduktionsweg und dem Eliminationsmechanismus von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt hergestellt werden. In vivo wurden an dem Todesrezeptor CD95 und dessen

Ligand CD95L defiziente Mäuse im Vergleich zu wild-typ Mäusen mit einem nasalen Inoculum an *P. aeruginosa* infiziert. Mäuse, die nicht über ein intaktes CD95/CD95L – System verfügten starben mit signifikant höherer Wahrscheinlichkeit an einer *P. aeruginosa* Sepsis als ihre Kontrolltiere.⁴³ Diese Studie von Grassme et al. gab den Anlass, einen Zusammenhang zwischen dem Signaltransduktionsweg von *P. aeruginosa* induzierter Apoptose und dessen Eliminationsweg aus dem Respirationstrakt zu untersuchen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der durch Todesrezeptoren vermittelte Signaltransduktionsweg für eine Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* notwendig ist. Um zu determinieren, ob der intrinsische Weg über die Mitochondrien oder der extrinsische Weg über Todesrezeptoren an der Zelloberfläche wichtiger ist, sind eine Reihe von Jurkat – Zelllinien nach Infektion mit *P. aeruginosa* untersucht worden. Sie verfügen über Blockaden im Signaltransduktionssystem für Apoptose. Die Zellen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: 1.) Zellen mit Blockaden im Todesrezeptorenweg und 2.) Zellen mit Blockaden im intrinsischen Signaltransduktionsweg. Der Signaltransduktionsweg über Todesrezeptoren war durch fehlende Expression von CD95, FADD oder Caspase – 8 blockiert. Der mitochondrielle Weg wurde durch Überexpression von bcl-2 und bcl-xL, zwei antiapoptotische, die Mitochondrienmembran stabilisierende Proteine, gestoppt.

Es konnte gezeigt werden, dass der Signaltransduktionsweg über Todesrezeptoren für die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* entbehrlich ist, da die Zellen, die über eine Blockade im Todesrezeptorenweg verfügten, trotzdem apoptotisch zugrunde gingen. Dahingegen führte die Überexpression der antiapoptotischen, mitochondriellen Proteine zu einer Dämpfung der Apoptoseantwort. Daraus ergab sich, dass der entscheidende Weg bei *P. aeruginosa* - induzierter Apoptose der mitochondrielle Weg war.

In den folgenden Unterkapiteln sollen diese Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang der *P. aeruginosa* - induzierten Apoptose gebracht werden.

4.4.1 Die Rolle der Lipid-reichen Membranplattformen

Der Vollständigkeit wegen soll an dieser Stelle der erste Schritt in der Interaktion von *P. aeruginosa* mit der Wirtszelle diskutiert werden, obwohl diesbezüglich in vorliegende Arbeit keine Experimente durchgeführt worden sind.

Lipid-reiche Membrandomänen sind abgegrenzte Domänen in der Zellmembran eukaryoter Zellen, die besonders viel Ceramid und Sphingolipide enthalten.⁴¹ Bei Aktivierung zugehöriger Rezeptoren wie zum Beispiel CD95 tritt die saure Sphingomyelinase in Aktion, wobei in diesen Membrandomänen aus Sphingomyelin Ceramid frei wird. Durch die Ceramidproduktion werden mehrere Membrandomänen dazu veranlasst, sich zu vereinigen, darunter entstehen Lipid-reiche Membranplattformen, die die Oligomerisierung von Rezeptoren für die Signaltransduktion ermöglichen.⁴¹ Zur Infektion eukaryoter Zellen durch *P. aeruginosa* sind diese Lipid-reichen Membranplattformen unabdingbar. Nur unter der Voraussetzung, dass die Ausbildung von Membranplattformen durch ausreichenden Cholesteringehalt der Zellmembran gewährleistet ist, ist es möglich, dass eine Interaktion zwischen eukaryoter Säugerzelle und prokaryoter Zelle stattfindet. Zu den Reaktionen eukaryoter Zellen, für die die Ausbildung von Membranplattformen notwendig ist, gehören die Induktion von Apoptose in der Wirtszelle, die Ausschüttung von Zytokinen und die Internalisierung der Bakterienzelle.^{41,66,112}

Die Ausbildung von Lipid-reichen Membranplattformen stellt den ersten bisher identifizierten Faktor dar, der ganz am Anfang der Kaskade zur Interaktion zwischen Wirtszelle und Keim steht, sie ist sowohl für die Internalisierung als auch für die Apoptose eine notwendige Bedingung, ohne dessen Erfüllung keine der beiden Mechanismen funktioniert. Die Mechanismen „Internalisierung“ und „Apoptose“ laufen jedoch unabhängig und getrennt voneinander ab, lediglich die Abläufe in der Membran ähneln einander, denn beispielsweise gehen Zellen, die kein CFTR exprimieren und dadurch keine Bakterien internalisieren können, trotzdem an Apoptose zugrunde.⁴⁰

4.4.2 Die Rolle von Apoptose vermittelt durch Todesrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivierung von Caspase – 8 und die Aktivierung von Caspase – 3 nachgewiesen werden. Die Caspase – 8 wird in Zusammenhang mit Todesrezeptoren proteolytisch gespalten und dadurch aktiviert. Caspase – 3 ist eine Effektorcaspase, die sowohl vom intrinsischen als auch vom extrinsischen Weg aktiviert wird.

Bei der durch *P. aeruginosa* induzierten Apoptose findet sich ein bestimmtes Muster der Caspasenaktivierung wieder, das darauf schließen lässt, dass zur Induktion sowohl der intrinsischen als auch den Weg über Todesrezeptoren genutzt wurde: Es werden in erster Linie Caspase-8 und Caspase-3 aktiviert, was für Todesrezeptoren vermittelte Apoptose spricht, jedoch kommt es verspätet auch zur Aktivierung vom Apoptosom in Form von Caspase-9 und Caspase-7, die beide eine Rolle bei intrinsischer, mitochondrieller Apoptoseinduktion spielen.⁵³

Welche der beiden Signaltransduktionswege überwiegt und für die Induktion von Apoptose entscheidend ist, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft.

Es wurden Jurkat-Zellen untersucht, die verschiedene Blockaden der Todesrezeptorkaskade vorwiesen oder die über unterschiedliche Blockaden auf Ebene des mitochondrialen Weg verfügten. Der Todesrezeptorsignaltransduktionsweg wurde einmal durch fehlendes CD95, dann durch fehlendes FADD und schließlich durch fehlende Caspase – 8 unterbrochen. Es konnte gezeigt werden, dass für die durch *P. aeruginosa* induzierte Apoptose dieser Jurkat-Zellen sowohl CD95, FADD als auch Caspase-8 entbehrlich sind. Die Apoptose durch *P. aeruginosa* wird also in erster Linie durch den intrinsischen Signaltransduktionsweg determiniert.

Auch eine andere Studie kam zu einem übereinstimmenden Ergebnis. Apoptose wurde hier nicht nur durch die Expression von Todesrezeptoren vermittelt, denn auch CD95-defektive Zellen werden trotz des Ausfalls dieses Signaltransduktionsmechanismus apoptotisch.⁴¹

4.4.3 Die Rolle intrinsisch vermittelter Apoptose

Bei der Apoptose mittels Todesrezeptoren und der intrinsischen Apoptoseinduktion handelt es sich um weitgehend unabhängige Mechanismen. Trotzdem bestehen zahlreiche Querverbindungen zwischen beiden möglichen Signalkaskaden.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass eine Infektion mit *P. aeruginosa* zu einer Erhöhung der CD95-Rezeptorzahl an der Zelloberfläche führt.^{42,52,15} Jedoch ist die Erhöhung der Zellrezeptorenzahl nicht essentiell für *P. aeruginosa* vermittelte Apoptose⁴¹, worauf auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit schließen lassen: Jurkat-Zellen mit unterschiedlichen Defekten der Todesrezeptorenkaskade gehen nach *P. aeruginosa* Infektion trotzdem apoptotisch zu Grunde. Vermutlich könnte das als ein Hinweis darauf betrachtet werden, dass nach einer *P. aeruginosa* Infektion beide Signalkaskaden aktiv werden, wobei die Todesrezeptorenkaskade aber für den letztlichen „Apoptoseerfolg“ entbehrlich ist.

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von Mitochondrien bei *P. aeruginosa* induzierter Apoptose ist vermutlich der Nachweis von AIF und Cytochrom c im Zytoplasma.^{52,51}

Es gilt zu untersuchen, ob eine Blockierung des intrinsischen Signaltransduktionswegs für einen apoptotischen Zelluntergang relevant ist. Der den intrinsischen Zelltod vermittelnden Mechanismus ist noch weitgehend unerforscht.

Es ist bekannt, dass neben mitochondriellen Alterationen die Aktivierung von zellulären Stresskinasen notwendig ist.⁵² An der Regulation des weiteren Zellschicksals sind MAP-Kinasen beteiligt, die das konzertierte Zusammenspiel zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose koordinieren. Säugerzellen exprimieren drei Untergruppen von MAP-Kinasen: die c-Jun-NH₂-terminale Kinase (JNK), die extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK) und schließlich die Kinase p38. JNK ist eine Stresskinase die durch Zellstress wie UV-Bestrahlung, Hitze-Schock, osmotischen Schock aktiviert wird. Es ist berichtet worden, wie das über Typ III Sekretion in die Wirtszelle gelangende,

prokaryote Protein ExoS in die intrinsische Transduktionskaskade einwirkt: JNK wird durch ExoS aktiviert und gleichzeitig werden die Phosphorylierungseigenschaften von p38 und ERK inhibiert. JNK-medierte Phosphorylierungen sind eine notwendige Voraussetzung für die ExoS vermittelte Apoptose, während die JNK-vermittelten Transkriptionsalterationen nicht essentiell für die von ExoS verursachte Apoptose sind. Eine JNK-Aktivierung korreliert mit Ausschüttung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium und der Aktivierung von Caspase-9.⁵⁴ Es scheint so, als wären beide apoptosevermittelnde Signalwege abhängig von der Einschleusung von ExoS und der durch ExoS vermittelten Aktivierung von JN-Kinasen. Dieser Vorgang ist ein kritischer Mechanismus für die Initiierung von Apoptose durch *P. aeruginosa*. Durch diese Untersuchung wurden bereits bekannte Schritte bei der *P. aeruginosa* vermittelten Apoptose, nämlich die Beteiligung von JN-Kinasen und die Hochregulation von CD95 und CD95L⁵², dem einzelnen Faktor ExoS zugesprochen.⁵⁴ Das Einschleusen von ExoS in die Wirtszellen zwingt die Zelle zum apoptotischen Zelluntergang. Ihr weiteres Schicksal scheint durch das Bakterium diktiert zu werden. Die höchstwahrscheinlich durch JNK hochregulierte Expression von CD95 / CD95L ist von Bedeutung für durch *P. aeruginosa* induzierte Apoptose.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass die ExoS vermittelte Apoptose in Epithelzellen einen anderen Weg einschlägt als die CD95 / CD95L und Caspase – 8 Signaltransduktion.³

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der entscheidende Signaltransduktionsweg über das Mitochondrium erfolgt. Diese Ergebnisse stehen also im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen und lassen darauf schließen, dass der Todesrezeptorenweg unbedeutend für die *P. aeruginosa* vermittelte Apoptose ist.

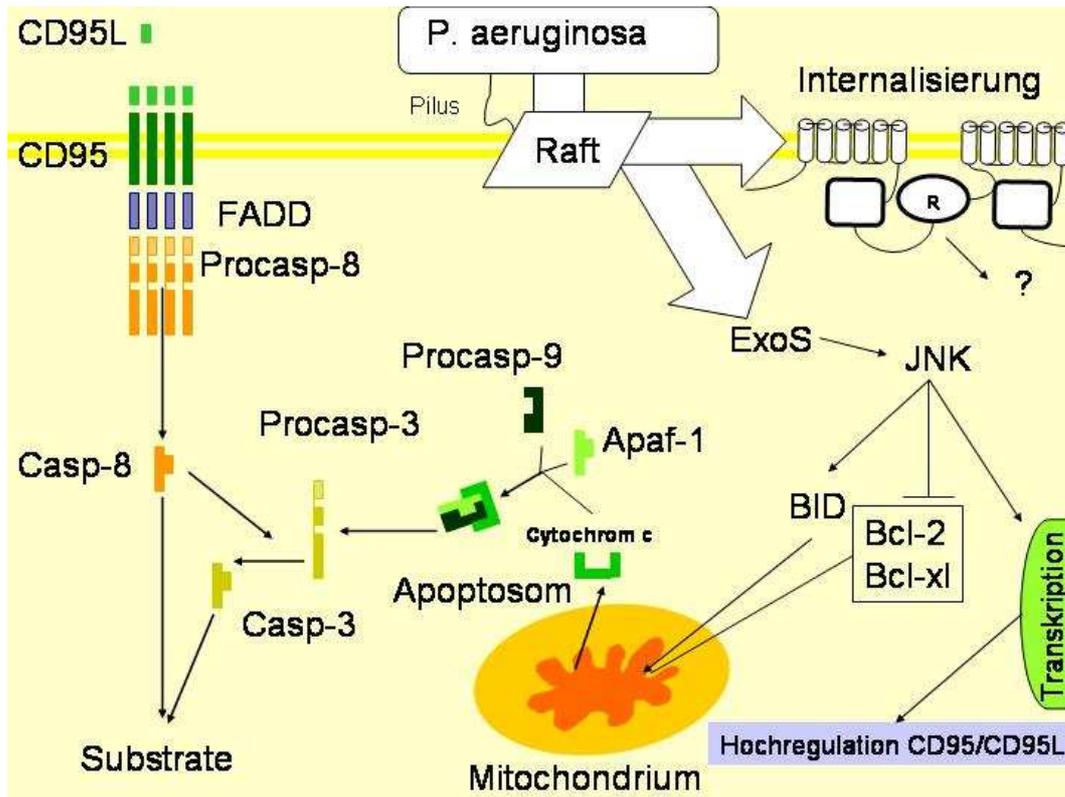


Abbildung 31: **Apoptose-signaltransduktionsweg anhand der derzeitigen Datenlage:** Aufgrund von Lipid-reichen Membranplattformen (RAFT) kann *P. aeruginosa* an die Wirtszelle adhären, über sein Typ III System ExoS in die Wirtszelle einschleusen und schließlich in Abhängigkeit von Rafts von der Wirtszelle internalisiert werden. Im Zellinneren aktiviert ExoS JN-Kinasen, die einerseits auf Proteinebene weitere Proteine mit dem Ziel phosphorylieren, ein apoptotisches Zellschicksal auszumachen, und die andererseits auf transkriptionaler Ebene für die Erleichterung der Apoptose führen, indem sie die Transkription von CD95 und CD95L mittels Transkriptionsfaktor hochregulieren.

4.5 Die Rolle der Apoptose für respiratorische Infektionen durch *P. aeruginosa*

Die Rolle der Apoptose bei respiratorischen Infektionen durch *P. aeruginosa* wird in der Literatur widersprüchlich beurteilt. Es ist unklar, ob es sich bei der Apoptose respiratorischer Epithelzellen durch die Interaktion mit *P. aeruginosa* um einen Mechanismus zur Elimination des Keimes aus dem Respirationstrakt handelt, oder ob die Apoptose ein Virulenzfaktor des Wirtes darstellt. Im ersteren Fall wäre Apoptose für den Wirt von Vorteil, weil dadurch die mit pathogenen Keimen beladenen Epithelzellen aus der Lunge entfernt würden. Andererseits könnte der apoptotische Zelluntergang der Wirtszelle dem Keim von Vorteil sein und zu seiner Pathogenität beitragen.

In der Arbeit von Grassmé et al. stellte die Aktivierung von CD95 und CD95L die für die Elimination von *P. aeruginosa* erforderliche Interaktion dar.⁴² Hotchkiss und Mitarbeiter warfen Grassmé et al. methodische Fehler vor, sie entkräfteten die Ergebnisse von Grassmé et al. in der eigenen Veröffentlichung, in dem sie mit einem vergleichbaren Modell aber anderer Untersuchungsmethode gegenteilige Ergebnisse publizierten.⁴⁶

Auch andere Untersuchungen bestätigen, dass CD95 zwar an der Apoptoseinduktion beteiligt sein kann, jedoch seine Beteiligung nicht unbedingt erforderlich ist.^{54,41} Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen aufgrund der Untersuchungen mit Jurkat – Zellen, die Defekte im Signaltransduktionsweg für Todesrezeptoren aufwiesen, für eine verzichtbare Rolle von CD95 bei der Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa*: ein Fehlen von CD95, FADD oder Caspase – 8 hinderte *P. aeruginosa* nicht an der Apoptoseinduktion. In der Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* in epithelialen Zellen ist die Signaltransduktionskette über CD95 / CD95L und Caspase – 8 nicht unbedingt für die Initiierung von Apoptose notwendig.³

Es existieren bisher zwei Arbeiten, die Aussage darüber treffen, wie die Apoptose durch *P. aeruginosa* an der Elimination des Keimes beteiligt sein könnte.

Die zystische Fibrose bedingt einen isolierten Immundefekt in der Abwehr von *P. aeruginosa*. Postuliert man nun, dass Apoptose der infizierten Zelle den Wirt

in seiner Abwehr gegen *P. aeruginosa* unterstützt, dann wäre die aufgrund des mutierten CFTR-Kanals gestörte Apoptoseregulation eine Erklärung für die defizitäre Keimelimination.

Im Umkehrschluss würde das bedeuten: die Menge der CFTR-Proteine an der Oberfläche der Zelle bedingt die Apoptosewahrscheinlichkeit der Zelle.

In der Arbeit von Cannon et al. konnte eine Aussage zur Korrelation der Ereignisse Endozytose von *P. aeruginosa* und Apoptose getroffen werden, die sich auf ein kurzes Zeitfenster bis zu acht Stunden bezog.

Die Autoren machten dies anhand von zwei Beziehungen fest: Erstens war die Apoptosefrequenz abhängig von der Expression von wildtyp CFTR. Zweitens konnte eine Beziehung zwischen der Menge an internalisierten *P. aeruginosa* Keimen und der Apoptosefrequenz der Zellen ermittelt werden.¹⁵ Die Untersuchungen von Cannon et al. reichen nicht aus um eine kausale Beziehung zwischen Endozytose und Apoptose herzustellen. Die Autoren argumentieren selbst, dass die Apoptose und die Endozytose von *P. aeruginosa* zwei getrennte Mechanismen sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Beziehung zwischen CFTR – Expression und Apoptoserate hergestellt werden. Dieser Unterschied zur Arbeit von Cannon et al. könnte auf methodische Unterschiede zurückgeführt werden; beispielsweise könnte die Wahl der Infektionszeiten, die Wahl der untersuchten Kinetiken und die Wahl der Messmethoden für Apoptose für die Unterschiede bei den Ergebnissen der durchgeführten Experimente verantwortlich sein.

Wenn man bezogen auf das vereinfachte Krankheitsmodell der zystischen Fibrose davon ausgeht, dass die verminderte Elimination von *P. aeruginosa* bei der zystischen Fibrose auf die fehlende Expression von funktionierendem CFTR auf der Oberfläche von respiratorischen Epithelzellen zurückzuführen ist, dann sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit gegen einen solchen Eliminationsmechanismus via CFTR und nachfolgender Apoptose

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen der Endozytose von *P. aeruginosa* und der Apoptose hergestellt werden. Es konnte weder ein Unterschied in der Apoptosehäufigkeit abhängig von der CFTR-

Expression gemessen werden, noch gab es bei der CFT1-parental Zelllinie Unterschiede in der Apoptosehäufigkeit nach Infektion mit dem nicht internalisierbaren *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *algC::tet*, der über den LPS Phänotyp rough verfügt, im Vergleich zur Infektion mit Pao 1v, der über smooth LPS verfügt. Obwohl in der vorliegenden Studie keine Internalisierungsraten von *P. aeruginosa* untersucht worden sind, scheint es dennoch wahrscheinlich, dass eine Kausalitätsbeziehung zwischen Internalisierung und Apoptose nicht existiert. Da CFT1 – Zellen apoptotisch werden, obwohl sie mit einem nicht – endozytierbaren *P. aeruginosa* Stamm infiziert worden sind, spricht stark dafür, dass die Internalisierung für die Induktion von Apoptose nicht erforderlich ist.

Die Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Induktion von Apoptose durch den *P. aeruginosa* Stamm Pak R1 *algC::tet*, der über den LPS – Phänotyp rough auf seiner Oberfläche verfügt, stellt sich schwierig dar. In den untersuchten Zellsystemen ist die Induktion von Apoptose durch diesen Stamm uneinheitlich. Die Ergebnisse lassen sich nicht mit der Expression von CFTR in Verbindung bringen, da die Mutterzelllinie als einzige Zelllinie apoptotisch wird nach der Infektion mit dem rough LPS – Stamm Pak R1 *algC::tet*. Die Derivate der CFT1 – parental sind resistent gegen die Apoptose durch Pak R1 *algC::tet*. Eine spekulative Erklärungsmöglichkeit wäre, dass CFT1 – LCFSN, CFT1 – LC3 und CFT1 - Δ F508 einen klonalen Apoptosedefekt erworben haben, der sie resistent gegen Apoptose durch *P. aeruginosa* Stämme des rough Phänotyps.

Die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* in respiratorischen Epithelzellen ist im vereinfachten Krankheitsmodell der zystischen Fibrose kein Eliminationsmechanismus aus der Lunge, da kein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung von CFTR und der Induktion von Apoptose hergestellt werden konnte. Das untersuchte Modell respiratorischer Epithelzellen mit unterschiedlicher CFTR wildtyp und Δ F508 ist möglicherweise sogar ungeeignet diese Hypothese zu testen, wenn die Spekulation über die verschiedenen Reaktionen auf *P. aeruginosa* mit rough – Phänotyp sich bewahrheiten sollten. Laut der vorliegenden Experimente scheint es keine Assoziation zwischen der Induktion von Apoptose und der Expression von

CFTR zu geben. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass freies LPS nicht in der Lage ist, via CFTR Apoptose auszulösen, obwohl freies *P. aeruginosa* LPS genauso wie das ganze Bakterium mittels CFTR internalisiert wird.⁹⁵ Die *P. aeruginosa* vermittelte Apoptoserate blieb unter Koinkubation mit freiem LPS unbeeinflusst.

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben die Aussage, dass die Internalisierung von *P. aeruginosa* in die respiratorische Epithelzelle nicht das Apoptose verursachende Agens ist. Die spezifische Interaktion zwischen CFTR und smooth LPS von *P. aeruginosa* verursacht keine Apoptoseinduktion. Des Weiteren besteht keine Beziehungen zwischen der Expression von CFTR in respiratorischen Epithelzellen und der Apoptoserate.

Für die Ausweitung der Beobachtungen auf den eukaryoten Gesamtorganismus reichen die vorliegenden Daten nicht aus. *P. aeruginosa* ist in der Lage auch in anderen Zelltypen Apoptose auszulösen. Welche Konsequenzen die Apoptose anderer Zellsysteme auf die respiratorische Infektion hat, bleibt zu erforschen. Die Funktion der durch bakterielle Erreger induzierten Apoptose kann für den Wirt sowohl vorteilhafte als auch schädigende Eigenschaften im Verlauf einer Lungeninfektion haben.⁸ Allgemein betrachtet kann man bei intrazellulären Erregern beobachten, dass Apoptose durch diese Erreger einen Vorteil für den Wirt darstellt. Dadurch wird die Beseitigung der Bakterienzellen aus dem Organismus beschleunigt.^{28,82}

Dahingegen verhält es sich bei einem extrazellulären pathogenen Keimen, wie zum Beispiel *Burkholderia cepacia*, einem mit *P. aeruginosa* verwandtem Keim, gegenteilig: *B. cepacia* induziert Apoptose in neutrophilen Granulozyten, es ist für den Erreger von Vorteil, wenn diese für die Immunabwehr wichtigen Zellen durch Apoptose untergehen.^{8,47} Auch bei *P. aeruginosa* könnte es sich um einen ähnlichen Mechanismus handeln, nämlich ein Überlebensvorteil für den Keim. Das würde bedeuten, dass *P. aeruginosa* unter normaler Abwehrlage ausreichend mittels eines CFTR-abhängigen Mechanismus aus der Lunge eliminiert wird.^{86,98,95} Bei veränderter Abwehrlage oder bei fehlendem Eliminationsmechanismus durch CFTR wird dann der Weg geebnet für eine

Wirtsschädigung durch Apoptose.

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Apoptose durch *P. aeruginosa* schädlich für den Wirt sein könnte, erbrachte eine Studie an einem Mausmodell. Durch antiapoptotische Behandlung der Mäuse konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse einen vorteilhafteren Verlauf einer *P. aeruginosa* Sepsis hatten als die Kontrollmäuse.¹⁸

Nach der Infektion durch *P. aeruginosa* werden in der Zelle sowohl antiapoptotische als auch apoptotische Signalkaskaden moduliert. Das ausgeklügelte Gleichgewicht zwischen Zelluntergang, Zellüberleben und CFTR-getriggelter Elimination des Keims sichert dem Wirt die Fähigkeit, den Keim erfolgreich zu bekämpfen.

In einer kürzlich publizierten Studie⁹¹ sehen die Autoren die Verzögerung in der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten als Ursache für eine gestörte Clearance von *P. aeruginosa* an. Das durch NF κ B, nach dessen Aktivierung durch *P. aeruginosa* LPS, verursachte Expressionsmuster in epithelialen Zellen entspricht einer Reihe von Faktoren, die für die schnelle Transmigration von neutrophilen Granulozyten notwendig sind.

Als Schlussfolgerung der vorliegenden Arbeit ergibt sich, dass das LPS von *P. aeruginosa* nicht in der Lage ist mittels der spezifischen Interaktion mit CFTR einen apoptotischen Untergang der verschiedenen untersuchten Zelllinien zu initiieren. CFTR dient weder als Induktor noch als Modulator der durch *P. aeruginosa* induzierten Apoptose. Für die Apoptose durch *P. aeruginosa* ist der intrinsische Signaltransduktionsweg entscheidend. Der Weg über Todesrezeptoren ist für eine Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* entbehrlich. Welche Rolle die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* im menschlichen Respirationstrakt spielt bleibt weiterhin unklar. Unter Umständen könnte die Unabhängigkeit der Apoptose durch *P. aeruginosa* von der Expression von CFTR auf eine schädigende Rolle im Respirationstrakt von mit *P. aeruginosa* Erkrankten Individuen hindeuten. Zur endgültigen Klärung der Rolle der Apoptose durch *P. aeruginosa* im Respirationstrakt des Wirtsorganismus könnten Versuche in vivo dienlich sein.

5 Zusammenfassung

Pseudomonas aeruginosa ist ein opportunistischer Keim, der mit zu den häufigsten Erregern nosokomialer Pneumonien zählt. Auf Intensivstationen ist *P. aeruginosa* ein Hochrisikokeim. Bei einer nosokomialen *P. aeruginosa* Pneumonie ist mit einer Letalität von bis zu 50% zu rechnen. Besonders anfällig für eine *P. aeruginosa* Pneumonie sind beatmete Patienten. Für dieses Patientenkollektiv ist *P. aeruginosa* der häufigste Erreger, der isoliert wird. Auf der Grundlage dieser Problematik ergibt sich eine dringende Notwendigkeit, neue Präventions- und Therapiemaßnahmen zu entwickeln. *P. aeruginosa* ist ein ubiquitär vorkommender Keim. Er ist daher in ständigem Kontakt mit gesunden Keimträgern, die jedoch nicht an einer *P. aeruginosa* Infektion erkranken. Das Verständnis über die Clearance von *P. aeruginosa* aus der Lunge gesunder Individuen könnte zu neuen Möglichkeiten führen, den Wirtsorganismus bei der Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt zu unterstützen. Aus der Kenntnis der genauen Eliminationsmechanismen von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt könnten sich neue Präventions- und Therapiemaßnahmen ergeben.

Bei der Abwehr gegen *P. aeruginosa* spielt der Chloridkanal **C**ystic **F**ibrosis **T**ransmembrane **C**onductance **R**egulator (CFTR) eine wichtige Rolle. CFTR fungiert als spezifischer Rezeptor für das **L**ipopolysaccharid (LPS) von *P. aeruginosa*. Die Interaktion zwischen CFTR und *P. aeruginosa* LPS vermittelt die endozytotische Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle. Dieser Mechanismus ist eine entscheidende Voraussetzung zur Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt. Die monogen erbliche Erkrankung Zystische Fibrose (ZF), der eine Mutation des CFTR – Gens zugrunde liegt, verursacht einen spezifischen Defekt in der Abwehr von *P. aeruginosa*. Die fehlende Internalisierung von *P. aeruginosa* in die respiratorische Epithelzelle führt bei diesen Patienten zu einer mangelnden Clearance, worauf dieses Patientenkollektiv chronische Infektionen durch *P. aeruginosa* entwickelt. Die Internalisierung von *P. aeruginosa* muss eine Signalkaskade in Gang setzen, an deren Ende die Elimination von *P. aeruginosa* aus dem Respirationstrakt steht. Die genauen Mechanismen der Elimination nach der Internalisierung von *P. aeruginosa* in die Wirtszelle sind noch ungeklärt.

Gegenstand dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* durch eine spezifische *P. aeruginosa* LPS – CFTR Interaktion ausgelöst wird. Ebenfalls sollte in dieser Arbeit der genaue Signaltransduktionsweg der Apoptose durch *P. aeruginosa* ermittelt werden. Anhand der Ergebnisse sollte abgeleitet werden, welche Rolle die Apoptose bei der Verhinderung von respiratorischen Infektionen durch *P. aeruginosa* spielt.

Ein in - vitro Modell von respiratorischen Epithelzellen, die sich durch die Expression von wildtyp CFTR und $\Delta F508$ CFTR an ihrer Oberfläche unterscheiden, diente dazu, Apoptosefrequenzen abhängig von der CFTR Expression flusszytometrisch zu messen. $\Delta F508$ CFTR ist ein mutiertes CFTR-Molekül, das die Fähigkeit verloren hat, *P. aeruginosa* LPS zu binden und zu internalisieren. Anhand dieses in – vitro Zellmodells sind Untersuchungsreihen mit unterschiedlichen Stimulantien für die Apoptoseinduktion durchgeführt worden. An erster Stelle stand die Induktion von Apoptose durch isoliertes *P. aeruginosa* LPS. Aus diesen Experimenten ergab sich, dass die Apoptoseinduktion nicht durch Interaktion von *P. aeruginosa* LPS und wildtyp CFTR an der Oberfläche von respiratorischen Epithelzellen erfolgte. Auch die Erleichterung der Internalisierung von *P. aeruginosa* LPS durch Inkubation von polaritätslosen Epithelzellen konnte keine Apoptose in respiratorischen Epithelzellen induzieren.

Die Infektion dieser respiratorischen Epithelzellen mit dem vollständigen Bakterium *P. aeruginosa* hingegen löste in allen untersuchten Zelllinien zeit- und dosisabhängig Apoptose aus. Es konnten keine Unterschiede in der Apoptosefrequenz durch Variation der CFTR-Expression erzielt werden. Selbst *P. aeruginosa* Stämme, die durch einen LPS-Defekt nicht via CFTR internalisierbar sind, führten in respiratorischen Epithelzellen ohne wesentliche Unterschiede zum apoptotischen Untergang.

Auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass bei allen untersuchten respiratorischen Epithelzellen eine zeitabhängige Aktivierung sowohl der Initiatorcaspase – 8 als auch der Effektorcaspase – 3 stattfindet.

Mittels eines weiteren in-vitro Modells von Jurkat – Zelllinien, die über

verschiedene Blockaden in der extrinsischen und der intrinsischen Apoptoseinduktion verfügen, konnte nach Infektion dieser Zellen mit *P. aeruginosa* deren Apoptosefrequenz durch flusszytometrische Messung detektiert werden, um den Signaltransduktionsweg für Apoptose durch *P. aeruginosa* zu determinieren. Die Untersuchungen zum Signaltransduktionsweg von *P. aeruginosa* induzierter Apoptose ergaben, dass der intrinsische Signalweg für die Apoptose durch *P. aeruginosa* entscheidend war. Umgekehrt war der extrinsische Weg, an dem CD95, FADD und Caspase – 8 beteiligt sind, für die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* nicht erforderlich.

CFTR ist nicht an der Signaltransduktion für Apoptose in respiratorischen Epithelzellen beteiligt, da das LPS von *P. aeruginosa* - obwohl es mit CFTR interagiert und endozytotisch in die Zelle internalisiert wird - keine Apoptose in respiratorischen Epithelzellen induzierte. Die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* in respiratorischen Epithelzellen wurde weder durch die Internalisierung von *P. aeruginosa* noch durch die von *P. aeruginosa* LPS moduliert. Daher scheint die Induktion von Apoptose ein von der Internalisierung von *P. aeruginosa* beziehungsweise *P. aeruginosa* LPS abgekoppelter Prozess zu sein. Der Signaltransduktionsweg der Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* scheint über keine Verbindungen zum dem Transduktionsweg zu verfügen, der die Internalisierung von *P. aeruginosa* in respiratorische Epithelzellen über CFTR vermittelt. Die Aktivierung von CFTR hat wahrscheinlich weder Dämpfungs- noch Verstärkerfunktion für den Ausgang von Apoptose in respiratorischen Epithelzellen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableiten, dass die Apoptoseinduktion durch *P. aeruginosa* im vorliegenden Zellmodell nicht über die Aktivierung von CFTR induziert wird. Die Expression von wildtyp CFTR an der Zelloberfläche von respiratorischen Epithelzellen, die diesen Zellen ermöglicht, das Bakterium *P. aeruginosa* via Endozytose zu internalisieren, hat keine Auswirkungen auf die Apoptoseinduktion. Daraus lässt sich schließen, dass die Internalisierung von *P. aeruginosa* ein vermutlich von der

Apoptoseinduktion unabhängiger Vorgang ist. Das Eliminationsmodell für *P. aeruginosa*, das sich aus der Erkrankung Zystische Fibrose abzeichnet, spricht dafür, dass zur Elimination von *P. aeruginosa* eine spezifische Interaktion zwischen Bakterium und CFTR statt finden muss. Für die Induktion von Apoptose durch *P. aeruginosa* war keine spezifische Interaktion mit CFTR erforderlich. Sehr wahrscheinlich kommt Apoptose daher auch nicht für die spezifische Elimination von *P. aeruginosa* aus der Lunge in Frage.

6 Literaturverzeichnis

6. Literaturverzeichnis

1. Anonymous
Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995
Am.J.Respir.Crit Care Med. 153, 1711-1725
2. Anonymous
National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999
Am.J.Infect.Control 27, 520-532
3. Alaoui-El-Azher, M., Jia, J., Lian, W., Jin, S. (2006)
ExoS of *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis through a Fas receptor/caspase 8-independent pathway in HeLa cells
Cell Microbiol. 8, 326-338
4. Allewelt, M., Coleman, F. T., Grout, M., Priebe, G. P., Pier, G. B. (2000)
Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread
Infect.Immun. 68, 3998-4004
5. Barriere, H., Poujeol, C., Tauc, M., Blasi, J. M., Counillon, L., Poujeol, P. (2001)
CFTR modulates programmed cell death by decreasing intracellular pH in Chinese hamster lung fibroblasts
Am.J.Physiol.Cell Physiol. 281, C810-C824
6. Bax, W. A., Cluysenaer, O. J., Bartelink, A. K., Aerts, P. C., Ezekowitz, R. A., van Dijk, H. (1999)
Association of familial deficiency of mannose-binding lectin and meningococcal disease
Lancet 354, 1094-1095
7. Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., Green, D. R. (2000)
Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome
Nat.Cell Biol. 2, 469-475
8. Behnia, M., Robertson, K. A., Martin, W. J. (2000)
Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease
Chest 117, 1771-1777
9. Belaud-Rotureau, M. A., Leducq, N., Macouillard Poulletier, de Gannes, Diolez, P., Lacoste, L., Lacombe, F., Bernard, P., Belloc, F. (2000)
Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis
Apoptosis. 5, 551-560
10. Bergmann, A., Agapite, J., Steller, H. (1998)
Mechanisms and control of programmed cell death in invertebrates
Oncogene 17, 3215-3223

6. Literaturverzeichnis

11. Bhat, R., Marx, A., Galanos, C., Conrad, R. S. (1990)
Structural studies of lipid A from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: occurrence of 4-amino-4-deoxyarabinose
J.Bacteriol. 172, 6631-6636
12. Bonten, M. J., Gaillard, C. A., de Leeuw, P. W., Stobberingh, E. E. (1997)
Role of colonization of the upper intestinal tract in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia
Clin.Infect.Dis. 24, 309-319
13. Burns, J. L., Gibson, R. L., McNamara, S., Yim, D., Emerson, J., Rosenfeld, M., Hiatt, P., McCoy, K., Castile, R., Smith, A. L., Ramsey, B. W. (2001)
Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis
J.Infect.Dis. 183, 444-452
14. Cain, K., Bratton, S. B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D. G., Sun, X. M., Cohen, G. M. (2000)
Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes
J.Biol.Chem. 275, 6067-6070
15. Cannon, C. L., Kowalski, M. P., Stopak, K. S., Pier, G. B. (2003)
Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 29, 188-197
16. Cannon, C. L., Kowalski, M. P., Stopak, K. S., Pier, G. B. (2003)
Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 29, 188-197
17. Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., Dixit, V. M. (1995)
FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis
CELL 81, 505-512
18. Coopersmith, C. M., Stromberg, P. E., Dunne, W. M., Davis, C. G., Amiot, D. M., Buchman, T. G., Karl, I. E., Hotchkiss, R. S. (2002)
Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis
JAMA 287, 1716-1721
19. Cryz, S. J., Jr., Pitt, T. L., Furer, E., Germanier, R. (1984)
Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*
Infect.Immun. 44, 508-513

6. Literaturverzeichnis

20. Dacheux, D., Attree, I, Schneider, C., Toussaint, B. (1999)
Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system
Infect.Immun. 67, 6164-6167
21. Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., Beach, M. (2001)
Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999
Clin.Infect.Dis. 32 Suppl 2, S114-S132
22. Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H. (1999)
Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis
Annu.Rev.Biochem. 68, 383-424
23. El-Solh, A. A., Sikka, P., Ramadan, F., Davies, J. (2001)
Etiology of severe pneumonia in the very elderly
Am.J.Respir.Crit Care Med. 163, 645-651
24. Evans, D. J., Frank, D. W., Finck-Barbancon, V., Wu, C., Fleiszig, S. M. (1998)
Pseudomonas aeruginosa invasion and cytotoxicity are independent events, both of which involve protein tyrosine kinase activity
Infect.Immun. 66, 1453-1459
25. Evans, D. J., Pier, G. B., Coyne, M. J., Jr., Goldberg, J. B. (1994)
The *rfb* locus from *Pseudomonas aeruginosa* strain PA103 promotes the expression of O antigen by both LPS-rough and LPS-smooth isolates from cystic fibrosis patients
Mol.Microbiol. 13, 427-434
26. Fagon, J. Y., Chastre, J., Domart, Y., Trouillet, J. L., Pierre, J., Darne, C., Gibert, C. (1989)
Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques
Am.Rev.Respir.Dis. 139, 877-884
27. Fagon, J. Y., Chastre, J., Hance, A. J., Montravers, P., Novara, A., Gibert, C. (1993)
Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay
Am.J.Med. 94, 281-288
28. Fan, T., Lu, H., Hu, H., Shi, L., McClarty, G. A., Nance, D. M., Greenberg, A. H., Zhong, G. (1998)
Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation
J.Exp.Med. 187, 487-496

6. Literaturverzeichnis

29. Finck-Barbancon, V, Goranson, J., Zhu, L., Sawa, T., Wiener-Kronish, J. P., Fleiszig, S. M., Wu, C., Mende-Mueller, L., Frank, D. W. (1997)
ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury
Mol.Microbiol. 25, 547-557
30. Fleiszig, S. M., Evans, D. J., Do, N., Vallas, V, Shin, S., Mostov, K. E. (1997)
Epithelial cell polarity affects susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* invasion and cytotoxicity
Infect.Immun. 65, 2861-2867
31. Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., Forsberg, A. (1997)
Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments
Mol.Microbiol. 25, 1125-1139
32. Galadari, S., Kishikawa, K., Kamibayashi, C., Mumby, M. C., Hannun, Y. A. (1998)
Purification and characterization of ceramide-activated protein phosphatases
Biochemistry 37, 11232-11238
33. Gallagher, A. M., Gottlieb, R. A. (2001)
Proliferation, not apoptosis, alters epithelial cell migration in small intestine of CFTR null mice
Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol 281, G681-G687
34. Gao, L., Kim, K. J., Yankaskas, J. R., Forman, H. J. (1999)
Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia
Am.J.Physiol. 277, L113-L118
35. Gegner, J. A., Ulevitch, R. J., Tobias, P. S. (1995)
Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance. Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14
J.Biol.Chem. 270, 5320-5325
36. Gerceker, A. A., Zaidi, T., Marks, P., Golan, D. E., Pier, G. B. (2000)
Impact of heterogeneity within cultured cells on bacterial invasion: analysis of *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica* serovar typhi entry into MDCK cells by using a green fluorescent protein-labelled cystic fibrosis transmembrane conductance regulator receptor
Infect.Immun. 68, 861-870
37. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., Parks, W. P. (1973)
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors
J.Natl.Cancer Inst. 51, 1417-1423
38. Gottlieb, R. A., Dosanjh, A. (1996)
Mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits acidification and apoptosis in C127 cells: possible relevance to cystic fibrosis
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93, 3587-3591

6. Literaturverzeichnis

39. Gottlieb, R. A., Nordberg, J., Skowronski, E., Babior, B. M. (1996)
Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 93, 654-658
40. Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2003)
Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts
Nat.Med. 9, 322-330
41. Grassme, H., Jendrossek, V., Riehle, A., von Kurthy, G., Berger, J., Schwarz, H., Weller, M., Kolesnick, R., Gulbins, E. (2003)
Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts
Nat.Med. 9, 322-330
42. Grassme, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kurthy, G., Lang, F., Weller, M., Gulbins, E. (2000)
CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*
SCIENCE 290, 527-530
43. Grassme, H., Kirschnek, S., Riethmueller, J., Riehle, A., von Kurthy, G., Lang, F., Weller, M., Gulbins, E. (2000)
CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*
SCIENCE 290, 527-530
44. Hauser, A. R., Engel, J. N. (1999)
Pseudomonas aeruginosa induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells
Infect.Immun. 67, 5530-5537
45. Heyland, D. K., Cook, D. J., Griffith, L., Keenan, S. P., Brun-Buisson, C. (1999)
The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. The Canadian Critical Trials Group
Am.J.Respir.Crit Care Med. 159, 1249-1256
46. Hotchkiss, R. S., Dunne, W. M., Swanson, P. E., Davis, C. G., Tinsley, K. W., Chang, K. C., Buchman, T. G., Karl, I. E. (2001)
Role of apoptosis in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia
SCIENCE 294, 1783-
47. Hutchison, M. L., Poxton, I. R., Govan, J. R. (1998)
Burkholderia cepacia produces a hemolysin that is capable of inducing apoptosis and degranulation of mammalian phagocytes
Infect.Immun. 66, 2033-2039

6. Literaturverzeichnis

48. Hyde, S. C., Emsley, P., Hartshorn, M. J., Mimmack, M. M., Gileadi, U., Pearce, S. R., Gallagher, M. P., Gill, D. R., Hubbard, R. E., Higgins, C. F. (1990)
Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport
Nature 346, 362-365
49. Illek, B., Yankaskas, J. R., Machen, T. E. (1997)
cAMP and genistein stimulate HCO₃⁻ conductance through CFTR in human airway epithelia
Am.J.Physiol 272, L752-L761
50. Jarvis, W. R., Martone, W. J. (1992)
Predominant pathogens in hospital infections
J.Antimicrob.Chemother. 29 Suppl A, 19-24
51. Jendrossek, V., Fillon, S., Belka, C., Muller, I., Puttkammer, B., Lang, F. (2003)
Apoptotic response of Chang cells to infection with *Pseudomonas aeruginosa* strains PAK and PAO-I: molecular ordering of the apoptosis signaling cascade and role of type IV pili
Infect.Immun. 71, 2665-2673
52. Jendrossek, V., Grassme, H., Mueller, I., Lang, F., Gulbins, E. (2001)
Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases
Infect.Immun. 69, 2675-2683
53. Jenkins, C. E., Swiatonowski, A., Issekutz, A. C., Lin, T. J. (2004)
Pseudomonas aeruginosa exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism
J.Biol.Chem. 279, 37201-37207
54. Jia, J., Alaoui-El-Azher, M., Chow, M., Chambers, T. C., Baker, H., Jin, S. (2003)
c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis
Infect.Immun. 71, 3361-3370
55. Julien, M., Verrier, B., Cerutti, M., Chappe, V, Gola, M., Devauchelle, G., Becq, F. (1999)
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) confers glibenclamide sensitivity to outwardly rectifying chloride channel (ORCC) in Hi-5 insect cells
J.Membr.Biol. 168, 229-239
56. Jungas, T., Motta, I., Duffieux, F., Fanen, P., Stoven, V., Ojcius, D. M. (2002)
Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
J.Biol.Chem. 277, 27912-27918

6. Literaturverzeichnis

57. Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., Blenis, J. (1998)
Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade
Curr.Biol. 8, 1001-1008
58. Juo, P., Woo, M. S., Kuo, C. J., Signorelli, P., Biemann, H. P., Hannun, Y. A., Blenis, J. (1999)
FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas
Cell Growth Differ. 10, 797-804
59. Kang, P. J., Hauser, A. R., Apodaca, G., Fleiszig, S. M., Wiener-Kronish, J., Mostov, K., Engel, J. N. (1997)
Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury
Mol.Microbiol. 24, 1249-1262
60. Kerem, E., Corey, M., Kerem, B., Durie, P., Tsui, L. C., Levison, H. (1989)
Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus
J.Pediatr. 114, 767-773
61. Khaled, A. R., Kim, K., Hofmeister, R., Muegge, K., Durum, S. K. (1999)
Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96, 14476-14481
62. Kim, J. A., Kang, Y. S., Lee, S. H., Lee, E. H., Lee, Y. S. (2001)
Role of pertussis toxin-sensitive G-proteins in intracellular Ca²⁺ release and apoptosis induced by inhibiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channels in HepG2 human hepatoblastoma cells
J.Cell Biochem. 81, 93-101
63. Kim, J. A., Kang, Y. S., Lee, S. H., Lee, E. H., Yoo, B. H., Lee, Y. S. (1999)
Glibenclamide induces apoptosis through inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channels and intracellular Ca⁽²⁺⁾ release in HepG2 human hepatoblastoma cells
Biochem.Biophys.Res.Comm. 261, 682-688
64. Knirel, Y. A. (1990)
Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*
Crit Rev.Microbiol. 17, 273-304
65. Knirel, Y. A., Bystrova, O. V., Shashkov, A. S., Lindner, B., Kocharova, N. A., Senchenkova, S. N., Moll, H., Zahringer, U., Hatano, K., Pier, G. B. (2001)
Structural analysis of the lipopolysaccharide core of a rough, cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*
Eur.J.Biochem. 268, 4708-4719
66. Kowalski, M. P., Pier, G. B. (2004)
Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to lipid rafts of epithelial cells is required for *Pseudomonas aeruginosa*-induced cellular activation
J.Immunol. 172, 418-425

6. Literaturverzeichnis

67. Kroemer, G. (1997)
The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis
Nat.Med. 3, 614-620
68. Kulshin, V. A., Zahringer, U., Lindner, B., Jager, K. E., Dmitriev, B. A., Rietschel, E. T. (1991)
Structural characterization of the lipid A component of *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides
Eur.J.Biochem. 198, 697-704
69. Lai, H. C., Kosorok, M. R., Laxova, A., Davis, L. A., FitzSimmon, S. C., Farrell, P. M. (2000)
Nutritional status of patients with cystic fibrosis with meconium ileus: a comparison with patients without meconium ileus and diagnosed early through neonatal screening
Pediatrics 105, 53-61
70. Lee, A., Chow, D., Haus, B., Tseng, W., Evans, D., Fleiszig, S., Chandy, G., Machen, T. (1999)
Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*
Am.J.Physiol 277, L204-L217
71. Lee, A., Chow, D., Haus, B., Tseng, W., Evans, D., Fleiszig, S., Chandy, G., Machen, T. (1999)
Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*
Am.J.Physiol. 277, L204-L217
72. Leu, H. S., Kaiser, D. L., Mori, M., Woolson, R. F., Wenzel, R. P. (1989)
Hospital-acquired pneumonia. Attributable mortality and morbidity
Am.J.Epidemiol. 129, 1258-1267
73. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. (1976)
A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells
Int.J.Cancer 17, 62-70
74. Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., Todaro, G. (1976)
A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells
Int.J.Cancer 17, 62-70
75. Lortholary, O., Fagon, J. Y., Hoi, A. B., Slama, M. A., Pierre, J., Giral, P., Rosenzweig, R., Gutmann, L., Safar, M., Acar, J. (1995)
Nosocomial acquisition of multiresistant *Acinetobacter baumannii*: risk factors and prognosis
Clin.Infect.Dis. 20, 790-796

6. Literaturverzeichnis

76. Maiuri, L., Raia, V., De Marco, G., Coletta, S., de Ritis, G., Londei, M., Auricchio, S. (1997)
DNA fragmentation is a feature of cystic fibrosis epithelial cells: a disease with inappropriate apoptosis?
FEBS Lett. 408, 225-231
77. Markowicz, P., Wolff, M., Djedaini, K., Cohen, Y., Chastre, J., Delclaux, C., Merrer, J., Herman, B., Veber, B., Fontaine, A., Dreyfuss, D. (2000)
Multicenter prospective study of ventilator-associated pneumonia during acute respiratory distress syndrome. Incidence, prognosis, and risk factors. ARDS Study Group
Am.J.Respir.Crit Care Med. 161, 1942-1948
78. Medzhitov, R., Janeway, C. Jr (2000)
Innate immunity
N.Engl.J.Med. 343, 338-344
79. Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., Dixit, V. M. (1996)
FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex
CELL 85, 817-827
80. Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Dixit, V. M. (1998)
An induced proximity model for caspase-8 activation
J.Biol.Chem. 273, 2926-2930
81. Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., . (1992)
Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen
J.Biol.Chem. 267, 10709-10715
82. Ojcius, D. M., Souque, P., Perfettini, J. L., Dautry-Varsat, A. (1998)
Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to infection with the obligate intracellular pathogen Chlamydia psittaci
J.Immunol. 161, 4220-4226
83. Papazian, L., Bregeon, F., Thirion, X., Gregoire, R., Saux, P., Denis, J. P., Perin, G., Charrel, J., Dumon, J. F., Affray, J. P., Gouin, F. (1996)
Effect of ventilator-associated pneumonia on mortality and morbidity
Am.J.Respir.Crit Care Med. 154, 91-97
84. Pawlowski, J., Kraft, A. S. (2000)
Bax-induced apoptotic cell death
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 97, 529-531

6. Literaturverzeichnis

85. Penketh, A., Pitt, T., Roberts, D., Hodson, M. E., Batten, J. C. (1983)
The relationship of phenotype changes in *Pseudomonas aeruginosa* to the clinical condition of patients with cystic fibrosis
Am.Rev.Respir.Dis. 127, 605-608
86. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S. (1997)
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 94, 12088-12093
87. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R., Goldberg, J. B. (1996)
Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections.
SCIENCE 271, 64-67
88. Pier, G. B., Grout, M., Zaidi, T. S., Olsen, J. C., Johnson, L. G., Yankaskas, J. R., Goldberg, J. B. (1996)
Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections.
SCIENCE 271, 64-67
89. Price, D., Ahearn, D. G. (1988)
Incidence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in whirlpools
J.Clin.Microbiol. 26, 1650-1654
90. Rajan, S., Cacalano, G., Bryan, R., Ratner, A. J., Sontich, C. U., van Heerckeren, A., Davis, P., Prince, A. (2000)
Pseudomonas aeruginosa induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors
Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 23, 304-312
91. Reiniger, N., Ichikawa, J. K., Pier, G. B. (2005)
Influence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on gene expression in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection of human bronchial epithelial cells
Infect.Immun. 73, 6822-6830
92. Sanchez Carballo, P. M., Rietschel, E. T., Kosma, P., Zahringer, U. (1999)
Elucidation of the structure of an alanine-lacking core tetrasaccharide trisphosphate from the lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* mutant H4
Eur.J.Biochem. 261, 500-508
93. Sawa, T., Yahr, T. L., Ohara, M., Kurahashi, K., Gropper, M. A., Wiener-Kronish, J. P., Frank, D. W. (1999)
Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury
Nat.Med. 5, 392-398

6. Literaturverzeichnis

94. Schiller, N. L. (1988)
Characterization of the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to complement-mediated killing: role of antibodies to the rough lipopolysaccharide on serum-sensitive strains
Infect.Immun. 56, 632-639
95. Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E., Pier, G. B. (2002)
CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99, 6907-6912
96. Schroeder, T. H., Lee, M. M., Yacono, P. W., Cannon, C. L., Gerceker, A. A., Golan, D. E., Pier, G. B. (2002)
CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99, 6907-6912
97. Schroeder, T. H., Reiniger, N., Meluleni, G., Grout, M., Coleman, F. T., Pier, G. B. (2001)
Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract
J.Immunol. 166, 7410-7418
98. Schroeder, T. H., Reiniger, N., Meluleni, G., Grout, M., Coleman, F. T., Pier, G. B. (2001)
Transgenic cystic fibrosis mice exhibit reduced early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the respiratory tract
J.Immunol. 166, 7410-7418
99. Sreaton, G. R., Xu, X. N., Olsen, A. L., Cowper, A. E., Tan, R., McMichael, A. J., Bell, J. I. (1997)
LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 94, 4615-4619
100. Sopena, N., Sabria, M., Pedro-Botet, M. L., Manterola, J. M., Matas, L., Dominguez, J., Modol, J. M., Tudela, P., Ausina, V., Foz, M. (1999)
Prospective study of community-acquired pneumonia of bacterial etiology in adults
Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 18, 852-858
101. Tang, H. B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B. H., Goldberg, J. B., Prince, A. (1996)
Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection
Infect Immun JID - 0246127 64, 37-43
102. Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998)
Caspases: enemies within
SCIENCE 281, 1312-1316

6. Literaturverzeichnis

103. Tobias, P. S., Soldau, K., Gegner, J. A., Mintz, D., Ulevitch, R. J. (1995)
Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14
J.Biol.Chem. 270, 10482-10488
104. Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T., Frank, D. W. (1999)
Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions
Infect.Immun. 67, 914-920
105. Vandivier, R. W., Fadok, V. A., Hoffmann, P. R., Bratton, D. L., Penvari, C., Brown, K. K., Brain, J. D., Accurso, F. J., Henson, P. M. (2002)
Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis
J.Clin.Invest 109, 661-670
106. Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C., Hemmer, M. (1995)
The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee
JAMA 274, 639-644
107. Wenzel, R. P. (1988)
The mortality of hospital-acquired bloodstream infections: need for a new vital statistic?
Int.J.Epidemiol. 17, 225-227
108. Wilson, R., Pitt, T., Taylor, G., Watson, D., MacDermot, J., Sykes, D., Roberts, D., Cole, P. (1987)
Pyocyanin and 1-hydroxyphenazine produced by *Pseudomonas aeruginosa* inhibit the beating of human respiratory cilia in vitro
J.Clin.Invest. 79, 221-229
109. Wine, J. J. (1999)
The genesis of cystic fibrosis lung disease
J.Clin.Invest. 103, 309-312
110. Yahr, T. L., Goranson, J., Frank, D. W. (1996)
Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III pathway
Mol.Microbiol. 22, 991-1003
111. Yahr, T. L., Vallis, A. J., Hancock, M. K., Barbieri, J. T., Frank, D. W. (1998)
ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 95, 13899-13904
112. Yamamoto, N., Yamamoto, N., Petroll, M. W., Cavanagh, H. D., Jester, J. V. (2005)
Internalization of *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by lipid rafts in contact lens-wearing rabbit and cultured human corneal epithelial cells
Invest Ophthalmol.Vis.Sci. 46, 1348-1355

6. Literaturverzeichnis

113. Yu, V. L., Singh, N. (2004)
Excessive antimicrobial usage causes measurable harm to patients with suspected ventilator-associated pneumonia
Intensive Care Med. 30, 735-738
114. Zaidi, T. S., Lyczak, J., Preston, M., Pier, G. B. (1999)
Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated corneal epithelial cell ingestion of *Pseudomonas aeruginosa* is a key component in the pathogenesis of experimental murine keratitis
INFECTION AND IMMUNITY. 67, 1481-1492
115. Zhou, P., Chou, J., Olea, R. S., Yuan, J., Wagner, G. (1999)
Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96, 11265-11270

7 Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-binding Cassette
AP	alkalische Phosphatase
Apaf-1	apoptosis protease activating factor-1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
CAD	Caspase activated DNAase
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
CARD	caspase recruitment domain
CD	cluster of differentiation
CD95L	CD95 ligand
CFTR	cystic fibrosis conductance regulator
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signaling domain
DNA	desoxyribonucleic acid
DR	death receptor
ECGS	endothelial cell growth supplement
EGF	epidermal growth factor
FADD	Fas-associated death domain protein
FLICE	FADD-like ICE (anderer Name für Caspase-8)
FLIP	FLICE inhibitory protein
IAP	inhibitor of apoptosis protein
ICE	Interleukin-1beta converting enzyme
LPS	Lipopolysaccharid
MOI	multiplicity of infection
MSD	membrane spanning domain
NBD	nucleotide binding domain
NFkappaB	nuclear factor-kappa B
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDZ-Domäne	PSD-95/SAP90 disks-large protein ZO-1
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PRM	pattern recognition moleküle
t-Bid	truncated Bid
TRAIL	TNF receptor-related apoptosis-inducing ligand
ZF	zystische Fibrose

8 Publikationsverzeichnis

Pseudomonas aeruginosa does not induce apoptosis via the extrinsic death receptor pathway

Sara Dias-Loureiro, C Karcher, Klaus Unertl, Torsten H Schroeder

104th annual Conference of the American Society of Microbiology, May 23rd-27th 2004, New Orleans, Abstract No D-060

9 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. K. Unertl für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Zentrum für medizinische Forschung in Derendingen.

Ich danke Herrn PD Dr. T.H. Schröder für die Überlassung des Themas, die bereitwillige und engagierte Betreuung mit großem persönlichem Einsatz zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit. Ebenfalls danke ich ihm für die unermüdliche Förderung, tatkräftige und kompetente Unterstützung nicht nur bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: A. Mager, M. Hoch – Gutbrod, I. Vollmer, M. Feigle, E. Hoffmann und C. Zanke.

Ich bedanke mich bei Professor Dr. S. Wesselborg für die Einarbeitung in die Methode Western – Blot und für den zur Verfügung gestellten monoklonalen Antikörper (anti - Caspase – 8). Ich bedanke mich ebenfalls bei den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Dr. K. Lauber und J. Manns für die freundliche Einarbeitung und die Kopie der Protokolle..

Ich danke den Mitgliedern der anästhesiologischen Abteilung des Zentrums für medizinische Forschung in Derendingen: Dr. H. Häberle für die stetige Hilfsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen und für deren Klärung an der frischen Luft, Dr. C. Karcher für die penetrante Internalisierung eines wichtigen Buches und die nicht enden wollenden Diskussionen über das perfekte Getränk, Dr. J. Trapp für die phantasievolle Interpretation meiner Ergebnisse.

Mein Dank gilt schließlich meinen Mitdotorandinnen N. Bauer und S. Berberich für die langen, gemeinsamen „Sessions“ beim Faxen machen und Bakterien schütteln.

Ich danke meinem Ehemann Dr. R. Laszlo für das inhaltliche und formale Korrekturlesen, für die intensive, aber immer konstruktive Kritik.

Ich danke R. Dias-Loureiro für die fachfremde Korrektur.

Ich danke meinen Eltern, die mich all die Jahre unterstützt haben und denen ich nahezu alles verdanke, was ich bis heute erreicht habe.

Ich bedanke mich schließlich bei Herrn H. – P. – Kehlitz dafür, dass ich mich während der Wochenendaufenthalte in Stuttgart immer in seine Wohnung zurückziehen konnte, um weiter konzentriert an dieser Arbeit schreiben zu können.

10 Lebenslauf

15.01.1978	Geburt in Stuttgart Hedelfingen
1984-1988	Besuch der Wilhelmschule in Stuttgart Untertürkheim
1988-1990	Besuch der Lindenrealschule in Stuttgart Untertürkheim
1990-1997	Besuch des Württemberg-Gymnasiums Stuttgart Untertürkheim
24.06.1997	Allgemeine Hochschulreife
1997-2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
09.09.1999	Physikum
29.08.2000	Erstes Staatsexamen
01/2001	Beginn der Promotionsarbeit in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
SS 2001	Urlaubssemester. Ganztätige Tätigkeit im Zentrum für medizinische Forschung in Derendingen
17.09.2003	Zweites Staatsexamen
2003-2004	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum
05.11.2004	Drittes Staatsexamen
11.11.2004	Approbation als Ärztin
seit 09/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikum Tübingen