Peptidoglykan-erkennende Proteine in der Streptococcus pneumoniae Pneumonie

- Einfluss auf den Verlauf und Interaktion mit dem Mikrobiom -

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Alexander N. Dabrowski

aus Hamburg

2018

Diese Dissertation wurde im Zeitraum 01.01.2015 bis 30.06.2018 unter der Leitung von Dr. med. vet. Janine Zahlten in der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Norbert Suttorp
- 2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Petra Knaus

Disputation am 10. Dezember 2018

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Norbert Suttorp für sein Engagement in der Forschung und im SFB-TR84, die hilfreichen Kommentare in den Meetings, sowie für die Begutachtung dieser Forschungsarbeit. Ebenso danke ich Frau Prof. Petra Knaus, für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie die hilfreichen Anmerkungen und Ratschläge zu dieser Forschungsarbeit.

Besonders danke ich Janine Zahlten. Ohne Deine persönliche Betreuung und Engagement, auch über Deine Arbeitszeit an der Charité hinaus, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Genauso bedanke ich mich bei Katrin Reppe, die den *in vivo* Teil dieser Arbeit von Anfang an mit betreut und immer mit hilfreichen Ratschlägen diese Arbeit vorangebracht hat. Vielen Dank euch beiden für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit!

Des Weiteren danke ich den vielen Kooperationspartner, mit deren Unterstützung die Daten für diese Arbeit erst erhoben werden konnten. Besonders danke ich Herr PD Dr. Torsten Hain, Dr. Markus Weigel und Kassandra Komma für die Bearbeitung und Auswertung der Mikrobiomdaten, Herrn Prof. Achim Gruber und Kristina Dietert, PhD für die histopathologische Bewertung der Tiere, sowie Herrn Prof. Hackstein und Dr. Nelli Baal, für die Etablierung und Messung der FACS Proben.

Vielen Dank auch an meinen Mentoren, PD Dr. Matthias Peiser und PD Dr. Markus Heimesaat, die stets hilfreiche Ratschläge und Hinweise zu dieser Arbeit hatten.

Auch meinen aktuellen und ehemaligen Kollegen aus der Arbeitsgruppe danke ich herzlichst. Danke Anshu, Aritra, Christian, Christin und Claudia. Die Zeit mit euch war toll und ich konnte mich immer auf euch verlassen!

Darüber hinaus danke ich allen anderen Kollegen aus dem Labor im Virchow und vom Campus Mitte, insbesondere Prof. Leif Sander, Prof. Bastian Opitz und Catherine für die vielen Hinweise und Hilfestellungen, Birgitt, Cengiz, Doris, Ekaterina, Gustavo, Iris, Laura, Ling, Markus B., Philipp, Sandra W., Sarah B., Sarah V., Ute und die vielen anderen, durch die die Arbeit so angenehm war.

Einen ganz besonderen Dank spreche ich meiner Mutter, Sylvia und Sarah W. aus. Vielen Dank, für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit! Des Weiteren danke ich von Herzen meiner Familie und meinen Freunden für die mentale Unterstützung und Unternehmungen, die eine Bereicherung und Ablenkung von der Arbeit waren.

Vielen Dank euch allen!

Inhaltsverzeichnis

1	Eir	ıleitu	ing	1
	1.1	Pne	umonie	1
	1.2	Fun	ktion und Aufbau der Atemwege	3
	1.3	Pne	umokokken	5
	1.3	.1	Allgemeiner Überblick	5
	1.3	.2	Virulenzfaktoren	7
	1.4	Imn	nunantwort auf bakterielle Lungeninfektion	9
	1.5	Wir	t-Abwehrproteine	.11
	1.5	.1	Struktur und Überblick über Peptidoglykan-erkennende Proteine	. 12
	1.5	.2	Insekten-PGRP am Beispiel von D. melanogaster	14
	1.5	.3	PGRP in Säugetieren: PGLYRP	. 16
	1.6	Mik	rrobiom in Gesundheit und Erkrankung	20
2	Zie	elsetz	ung	23
	2.1	Frag	gestellung	23
	2.2	Vor	arbeiten	24
3	Ma	nteria	alien	. 25
4	Me	ethod	len	37
	4.1	Pne	umokokkenstämme und -anzucht	37
	4.2	In v	<i>ivo</i> Experimente	37
	4.2	.1	Verwendete Mausstämme	
	4.2	.2	Haltungsbedingungen	38
	4.2	.3	Vergesellschaftung	. 38
	4.2	.4	Infektion mit S. pneumoniae und Monitoring	. 39
	4.2	.5	CFU Bestimmung	40
	4.2	.6	Durchflusszytometrische Zellanalyse	40
	4.2	.7	Mikrobiom im Caecum	.41
	4.2	.8	Histologie und Immunhistochemie	43
	4.2	.9	Zytokinmessung	44
	4.2	.10	IκBa Proteindetektion durch Western Blot	44
	4.3	In v	<i>itro</i> Versuche	45
	4.3	.1	Antibakterieller Assay mit rPGLYRP2	45
	4.3	.2	Isolierung von Primärzellen	45
	4.3	.3	RNA Isolierung	47

4.3.4	Umschreibung der RNA in cDNA 47
4.3.5	Präamplifikation der cDNA 47
4.3.6	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)
4.3.7	Microarray
4.3.8	Eliminierung von Pneumokokken durch PMN 49
4.3.9	ECIS
4.3.10	rPGLYRP4 Degradation
4.4 Sta	tistik
5 Ergebr	iisse
5.1 Ein	fluss von PGLYRP2 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie 53
5.1.1	Pglyrp2 wird durch Pneumokokken in phagozytischen Zellen induziert
5.1.2	Höhere Bakterienlast in der Milz von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 48 hpi. 53
5.1.3	PGLYRP2-KO Mäuse erreichen früher die Abbruchkriterien nach Infektion mit
	S. pneumoniae als WT Mäuse
5.1.4	Beschleunigter Krankheitsverlauf in PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 55
5.1.5	Rekombinantes PGLYRP2 wirkt nicht antibakteriell in vitro
5.1.6	Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine KC, IL-6 und TNF- α
	sind in PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen in der Lunge verringert 57
5.1.7	Geringere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge von
	PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 59
5.1.8	PGLYRP2 reguliert nicht den Transkriptionsfaktor ΙκΒα60
5.1.9	Vergleichbares Mikrobiom in WT und PGLYRP2-KO Mäusen61
5.2 Ein	fluss von PGLYRP4 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie 64
5.2.1	Geringere Pneumokokkenlast in PGLYRP4-KO vs. WT Mäuse 48 hpi 64
5.2.2	Erhöhter Entzündungsgrad und vermehrte Zellinfiltration in den Lungen von
	PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen
5.2.3	Reduzierte Expression von Pglyrp4 in Alveolarepithelzellen und Induktion in
	MΦ
5.2.4	Höhere Expression von Komplement-Faktoren und IFN-assoziierten Genen in
	AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen
5.2.5	Höhere Expression der Tight Juntion Gene Cldh18, F11r und Cdh1 und
	verlängerte Barriereintegrität von PGLYRP4-KO gegenüber WT AEC in vitro

5.2.6	Erhöhte Aktivierung von PMN durch den Überstand von AEC von
	PGLYRP4-KO Mäusen73
5.2.7	Proteolytischer Abbau von PGLYRP4 durch Pneumokokken75
5.2.8	Größere Artenvielfalt und β -Diversität im <i>Caecum</i> von uninfizierten
	PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen75
5.2.9	Die Vergesellschaftung von WT bzw. PGLYRP4-KO Tieren mit keimfreien
	WT Mäusen ist ausreichend für die Übertragung der Mikrobiota80
5.2.10	Induktion des PGLYRP4-KO Phänotyps in keimfreien WT Mäusen durch
	Übertragung der Mikrobiota80
6 Disku	ssion
6.1 Der	PGLYRP2-KO führt zu einer verringerten Immunabwehr in der Pneumokokken-
indu	zierten Pneumonie
6.1.1	Erhöhte Expression von Pglyrp2 in Phagozyten, aber nicht in Lungenepithel-
	zellen nach Infektion mit S. pneumoniae
6.1.2	Höhere bakterielle Belastung in der Peripherie und weniger PMN-Infiltration in
	die Lungen von PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen
6.1.3	Beschleunigter Verlauf der Pneumonie und früheres Erreichen der Abbruch-
	kriterien in PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen86
6.1.4	Implikationen des schnelleren Krankheitsverlaufes in PGLYRP2-KO gegenüber
	WT Mäusen für den Menschen
6.1.5	Die verringerte Abwehrleistung in PGLYRP2-KO Mäusen ist nicht abhängig
	von direkten antibakteriellen Effekten, Ik $B\alpha$ oder der Darmmikrobiota87
6.2 Der	PGLYRP4-KO führt zu einem proinflammatorischen Phänotyp und einer besseren
Patl	nogeneliminierung in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie
6.2.1	Effizientere Eliminierung von Pneumokokken und stärkere Entzündungs-
	reaktionen in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen90
6.2.2	Dichtere epitheliale Lungenbarriere und erhöhte Aktivierung von PMN durch
	AEC von PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen91
6.2.3	S. pneumoniae schützt sich vor einer direkten antibakteriellen Wirkung von
	PGLYRP4 durch seine Kapsel, Proteasen und N-Glykosidasen
6.2.4	Ein vermehrt proinflammatorisches Mikrobiom in PGLYRP4-KO Mäusen ist
	für die geringere Bakterienlast gegenüber WT Mäusen verantwortlich94
6.2.5	Implikationen des PGLYRP4-KO für den Menschen95
6.3 G	emeinsamkeiten und Unterschiede zwischen PGLYRP2 und PGLYRP496

6	.4 Aus	sblick und fortführende Arbeiten	
	6.4.1	Arbeiten zu PGLYRP2	
	6.4.2	Arbeiten zu PGLYRP4	
7	Zusami	menfassung	
8	Summa	ıry	
9	Literat	ur	
10	Abbildu	ungsverzeichnis	XIII
11	Tabelle	enverzeichnis	XV
12	Publikationen, Vorträge und PräsentationenXVI		
13	LebenslaufXVII		
14	Anhang	g	XXI
15	Selbstä	ndigkeitserklärung	XXV

Abkürzungsverzeichnis

A66	S. pneumoniae, Serotyp 3, NCTC 7978
ABC (in ABC-	ATP-bindende Kassette (antigen-binding cassette)
Transportproteine)	
ad	Auffüllen auf
AdcA	Adhesin Kompetenz A (a <i>dhesin competence A</i>)
AEC	Alveolarepithelzelle (alveolar epithelial cell)
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom (acquired immune deficiency syndrome)
AMΦ	Alveolarmakrophage (alveolar macrophage)
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B. subtilis	Bacillus subtilis
BgaA	β-Galaktosidase
$BMM\Phi$	Aus dem Knochenmark differenzierte Markophage (bone marrow-derived macrophage)
BSA	Bovines Serum Albumin
Caco-2	Eine humane, kolorektale Adenokarzinom-Epithelzelllinie
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie (community acquired pneumonia)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CFU	Kolonie-bildende Einheit (colony forming unit)
CI	Konfidenzintervall (confidence interval)
COPD	Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
C _T	Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen des definierten Fluoreszenzgrenzwertes
	(threshold cycle)
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
D39	S. pneumoniae, Serotyp 2, NCTC 7466
D39∆Cps	S. pneumoniae, Serotyp 2, NCTC 7466 kapseldefiziente Mutante
DACS	Diaminocarbonsäure
D-Ala	D-Alanin
DAP	Meso-Diaminopimelinsäure
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Demineralisiertes, filtriertes (0,22 µm) Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat (Diethyldicarbonat)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DSS	Natrium-Dextran-Sulfat (dextran-sodium-sulfate)
Е	Effizienz
E. coli	Escherichia coli
ECIS	Elektrische Zell-Substrat Widerstandsmessung (electric cell-substrate impedance sensing)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiaminetetraacetic acid)
FBS	Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Sciences Association
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
Glc-DAG	Glukosyl-diacylglycerol
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglukosamin
	, , , , , , , , , , , , , , , , , , , ,

Glu	D-Glutaminsäure
GMDP	Glukosaminylmuramyldipeptid
GNBP	Gramnegatives Bindungsprotein
HAP	Nosokomiale Pneumonie (hospital aquired pneumonia)
HBSS	Salzlösung nach Hanks
НСАР	Pneumonie im Zusammenhang mit Patienten die regelmäßig medizinische betreut werden (<i>healthcare associated pneumonia</i>)
HDP	Wirt-Abwehrprotein (host defense protein)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEK293	Epitheliale, humane embyonale Nierenzellline
hpi	Stunden nach der Infektion (hours post infection)
HSI	Herpes-Simplex Infektion
HSP70	Hitzeschockprotein 70
i. p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
Imd	Immundefekt (Signalweg)
IQR	Interquartilabstand (interquartil range)
IVC	Individuell-belüftete Käfige (individual ventilated cages)
ΙκΒα	NF-κB Inhibitor alpha
KC	Keratinozyten-Lockstoff, Maus-Homolog des humanen IL-8
КО	Kockout
KO2	PGLYRP2-KO
KO4	PGLYRP4-KO
L (in PGRP-L)	Groß (<i>larg</i>)
L. monocytogenes	Listeria monocytogenes
L929 Zellen	Fibroblasten-Zellline aus murinem Fettgebwebe
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
L-Ala	L-Alanin
LM	Niedrig schmelzend (low melting)
LP	Lipopeptid
LPS	Lipopolysaccharid
LRTI	Infektion der unteren Atemwege (lower respiratory tract infection)
LTA	Lipoteichonsäure (lipoteichonic acid)
Lys	L-Lysin
LytA	Autolysin
MARCO	Makrophagen-Rezeptor mit kollagenartiger Struktur (macrophage receptor with collagenous structure)
MDP	Muramyldipeptid
Mincle	Makrophagen-induzierter Ca ²⁺ -abhängiger Lektin Rezeptor
MOI	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

MTP	Muramyltripeptid
MTP _{Lys}	Muramyltripeptid mit einem Lysin als dritte Aminosäure
MurNAc	<i>N</i> -Acetylmuraminsäure
МΦ	Makrophage
NAD^+	Oxidiertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Reduziertes Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NanA	Neuramidase
NDH	NADH Dehydrogenase
NET	Neutrophile extrazelluläre Falle (neutrophil extracellular trap)
NF-κB	Nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet
NHAP	Pneumonie im Zusammenhang mit Patienten aus Pflegeeinrichtungen (nursing home
	associated pneumonia)
NK	Natürliche Killerzelle
NLRP	NOD, Leucin-reiche Wiederholungen und Pyrin Domäne enthaltendes Protein
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
NOS	Reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species)
ns	Nicht signifikant
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei 595 nm
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
OH•	Hydroxylradikal
OTU	Operative Taxonomische Einheit (operational taxonomic unit)
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffert saline)
PC	Hauptkoordinate (principal coordinate)
PCoA	Multidimentsionale Skalierung (principal Coordinate Analysis)
PFA	Paraformaldehyd
PGRP/PGLYRP	Peptidoglykan-erkennenden Proteine (peptidoglycan-recognition proteins)
PGN	Peptidoglykan
PiaA	Pneumokokken Eisen Exporter (<i>pneumococcal iron acquisition A</i>)
PiuA	Pneumokokken Eisen Importer (<i>pneumococcal iron uptake A</i>)
Ply	Pneumolysin
PMN	Neutrophiler Granulozyt (polymorphonuclear granulocyte)
РО	Phenoloxidase
PROGRESS	Pneumonia Research Network on Genetic Resistance and Susceptibility for the Evolution
DO	of Severe Sepsis
proPO	Prophenoloxidase
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
PsaA	Pneumokokken Oberflächen Adhesin A (<i>pneumococcal surface adhesin A</i>)
PSK	Polysaccharidkapsel
PspA	Pneumokokkenobertlächenprotein A (pneumococcal surface protein A)
PspC	Pneumokokkenobertlächenprotein C (pneumococcal surface protein C)
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction)
R ²	Bestimmtheitsmaß

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rPGLYRP	Rekombinantes PGLYRP
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S (in PGRP-S)	Klein (small)
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. enterica	Salmonella enterica
S. pyogenes	Streptococcus pyogenes
S. pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
SCFA	Kurzkettige Fettsäure (short-chain fatty acid)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert (standard error of the mean)
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms)
SPF	Spezifisch pathogenfrei
Spp.	Spezies
StrH	β-N-Acetylglukosyl Amidase
tag7	PGLYRP1
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
$T_{\rm H}$	T Helfer Zelle
THP-1	Humane monozytäre Zelllinie eines Patienten mit akuter monozytische Leukämie
THY	Todd-Hewitt Boullion mit Hefeextrakt (Todd-Hewitt bouillion with yeast)
TLR	Toll-ähnlichen Rezeptor (Toll-like receptor)
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TREM-1	Triggering Rezeptor exprimiert auf myeloischen Zellen
UV	Ultraviolett
VAP	Beatmungs-assoziierte Pneumonie (ventilator associated pneumonia)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (world health organization)
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdanziehung
ΔC_{T}	Relativer Expressionsunterschied des Genes zwischen der behandelten zur unbehandelten Probe
$\Delta\Delta C_{T}$	Normierter relativer Expressionsunterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und eines Referenzgenes

1 Einleitung

1.1 Pneumonie

Laut Weltgesundheitsorganisation (*world health organization*, WHO) starben im Jahr 2015 schätzungsweise 3,2 Millionen Menschen an einer Infektion der unteren Atemwege (*lower respiratory tract infection*, LRTI). Dies macht LRTI zur dritthäufigsten Todesursache weltweit [1]. Innerhalb dieser Gruppe sind Pneumokokken am häufigsten als ursächlicher Erreger genannt [2] und betreffen schätzungsweise 1,5-2 Millionen Menschen jährlich [3,4]. Somit sterben jedes Jahr mehr Menschen an Pneumokokken-ausgelösten Krankheiten, als an den durch die Medien besser bekannten Infektionskrankheiten wie der Tuberkulose (1,37 Mio. [1]), dem erworbenem Immunschwächesyndrom (*acquired immune deficiency syndrome*, AIDS, 1 Mio. [5]), Cholera (95.000 [6]) oder während des Ebola Ausbruchs 2014-2016 (11.500 [7], Abb. 1.01). Zudem können Pneumokokken zwar allgemein gut antibiotisch behandelt werden, jedoch sind Resistenzen gegenüber u. a. β -Lactam- und Makrolidantibiotika schon seit vielen Jahrzenten bekannt [8,9] und der Anteil an multiresistenten Stämmen nimmt stetig zu [10]. Bei voranschreitender Antibiotikaresistenz und Adaption von Pneumokokken an die gängigen Impfstoffe, könnte sich dieses Bild in den nächsten Jahrzehnten zusehends verschlimmern.



Abb. 1.01: Pneumokokken sind die häufigste Todesursache bei Infektionserkrankungen. Aufgelistet sind die häufigsten und durch Medien bekannten Infektionskrankheiten mit den geschätzten weltweiten Todesfällen in den Jahren 2016 (AIDS und Masern), während des Ebola Ausbruchs in 2014-2016 (für Ebola), bzw. für alle anderen Todesfälle im Jahr 2015 [1,3–7,11–14].

Trotzt der hohen Virulenz der Pneumokokken zeigen Studien, dass insbesondere Kinder in ihren ersten Lebensjahren mehrfach asymptomatisch besiedelt werden [15,16]. Diese asymptomatische Besiedelung ist zunächst nicht problematisch, da viele Pneumokokken-Serotypen bei funktionierendem Immunsystem keine invasive Erkrankung auslösen und auch

invasive Serotypen durch effektive Abwehrmechanismen unter Kontrolle gehalten werden [17]. Sobald es jedoch zu einer Schwächung des Immunsystems kommt, können sich die Pneumokokken unkontrolliert vermehren und sich z. B. von den oberen Atemwegen entlang bestehender anatomischer Strukturen bis in die Lunge ausbreiten. Dort verursachen sie zunächst lokal eine Pneumonie und können im Krankheitsverlauf weitere Erkrankungen wie z. B. eine Entzündung des Mittelohrs (Otitis), der Hirnhaut (Meningitis) und des Herzen (Endokarditis) verursachen oder zu einer Bakteriämie mit anschließender Sepsis führen [9,17,18]. Klinisch kann die Pneumonie grob in zwei Unterarten eingeteilt werden: Erstens, die ambulant erworbene Pneumonie (community acquired pneumonia, CAP) und zweitens, die nosokomiale Pneumonie (hospital acquired pneumonia, HAP) [19]. Die Pneumonie ist in Deutschland nicht meldepflichtig, wodurch es nur Schätzungen zur Anzahl der jährlichen Erkrankungen gibt. Demzufolge gibt es nach aktuellen Schätzungen in Deutschland ca. 625.000-920.000 Fälle einer CAP [20] und ca. 75.000-112.000 Fälle einer HAP pro Jahr [21]. Die HAP betrifft, da im Krankenhaus erworben, zumeist geschwächte Patienten, zum Beispiel nach Unfällen und Operationen mit Aufenthalt auf der Intensivstation, einer schweren Virusinfektion oder immunkomprimierte Patienten. Dementsprechend sind hier vor allem sogenannte Krankenhauskeime, wie der Methicillin-resistente Staphylococcus aureus (MRSA), als verursachend für die Pneumonie zu nennen. Die CAP betrifft hingegen insbesondere mehr oder minder gesunde Menschen, die per Definition bereits vor oder innerhalb 48 Stunden nach der stationären Aufnahme in einem Krankenhaus Symptome zeigen [19]. Neben der Unterscheidung zwischen HAP und CAP gibt es noch weitere Einteilungen wie die Pneumonie im Zusammenhang mit beatmeten Patienten (ventilator associated pneumonia, VAP), Patienten aus Pflegeeinrichtungen (nursing home associated pneumonia, NHAP) und von Patienten die z. B. regelmäßig medizinisch betreut werden (healthcare associated pneumonia, HCAP) [19]. Diese weiteren Klassifizierungen sollen hier jedoch nicht näher beschrieben werden.

Der weltweit häufigste Erreger einer CAP ist mit einer Prävalenz von bis zu 50% im Allgemeinen *Streptococcus* (*S.*) *pneumoniae*. Weitere Erreger können unter anderem *Haemophilus influenzae*, *Chlamydophila pneumoniae*, Adeno- und Influenzaviren oder *Legionella spp*. sein [2,9,22]. Dabei kann die Prävalenz von Region zu Region höchst unterschiedlich sein. So konnte in asiatisch-pazifischen Regionen z. B. *Klebsiella pneumoniae* mit bis zu 15% Prävalenz als ursächliches Pathogen für eine CAP ermittelt werden [23] und in tropischen Regionen ist auch *Acinetobacter baumannii* ein relevanter Erreger der CAP [24]. Besonders Kinder unter 5 Jahren und ältere Menschen ab 65 Jahren sind öfter von einer schweren Pneumonie betroffen und müssen stationär im Krankenhaus behandelt werden. Bei

diesen schweren Fällen steigt die Mortalität dramatisch von weniger als 1% auf bis zu 23%, trotz Behandlung mit Antibiotika und anderen unterstützenden Medikamenten [9].

1.2 Funktion und Aufbau der Atemwege

Die menschlichen Atemwege werden generell in die oberen und die unteren Atemwege unterteilt. Zu den oberen Atemwegen gehören die Nase, der Mund und der Rachen. Der Kehlkopf sitzt am Übergang zu den unteren Atemwegen, die aus der Luftröhre und den Lungen gebildet werden (siehe Abb. 1.02). Zu den Aufgaben der Atemwege gehört das befeuchten und erwärmen der eingeatmeten Luft, die Säureregulation des Blutes und der Transport von Sauerstoff in den Körper hinein und von Kohlenstoffdioxid aus dem Körper heraus [25,26].

Dadurch, dass die Atemwege im ständigen Kontakt mit der Umwelt stehen, können neben dem lebensnotwendigen Sauerstoff auch z. B. luftgetragene Schadstoffe, Pollen, Viren und Bakterien in den Körper gelangen. Um den Körper davor zu bewahren, hat sich ein ausgeklügeltes Schutz- und Filtersystem entwickelt [25,26].

Dieses beginnt bereits in den oberen Atemwegen, in denen eindringende Substanzen auf den Mukus der Nase, des Mundes und des Rachens treffen. Dieser Mukus wird durch Becherzellen und Drüsen gebildet und besteht aus Immunzellen, Enzymen, Immunglobulin A (IgA) und antimikrobiellen Proteinen, welche Pathogene abtöten und Schadstoffe inaktivieren können. Zudem wird der Mukus ständig durch das Flimmerepithel aus der Nase und dem Rachen zur Speiseröhre transportiert (mukoziliäre Reinigung), bzw. aus dem Mundraum abgeschluckt oder ausgeworfen. Dadurch werden eingedrungene Partikel und Pathogene über den Gastrointestinal-Trakt (GI-Trakt) weiter unschädlich gemacht und ausgeschieden [25,26].

Substanzen, die diese erste Barriere überwinden, gelangen über die Luftröhre in die Lunge mit ihren Bronchien und Alveolen (vgl. Abb. 1.02C) [25,26]. Die Lunge des Menschen besteht aus ca. 500 Mio. Alveolen [27], die von einem feinen Netz aus Blutkapillaren umschlossen (siehe Abb. 1.02C-D) und primär für den Sauerstoffaustausch zuständig sind [25,26]. Die Alveolen sitzen am Ende der terminalen Bronchien, welche sich über ca. 23 Generationen aus der Verzweigung der Luftröhre bilden. Auch in der Luftröhre und den Bronchien wird Mukus produziert und über Flimmerepithel zu den oberen Atemwegen transportiert. In den Alveolen fehlt dieser Schutzmechanismus jedoch, da andernfalls kein Gasaustausch stattfinden könnte [25,26].



Abb. 1.02: Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus der unteren humanen Atemwege. A) Gezeigt wird der Kehlkopf, die Luftröhre und ihre Verzweigung in primäre und sekundäre Bronchien, B) die Luftröhre mit ihren Verzweigungen zu den Bronchien und den fünf Lungenlappen, C) die Alveolen, die an den terminalen Bronchien sitzen und von blutführenden Gefäßen umgeben sind, sowie D) die zelluläre Bestandteile einer einzelnen Alveole [28].

Die luftzugewandte Seite der Alveolen wird von zwei Epithelzellarten (*alveolar epithelial cell*, AEC) gebildet. Etwa 90-95% der Oberfläche besteht aus Typ 1 AEC und 5-10% aus Typ 2 AEC, welche über sogenannte *Tight Junctions* eng miteinander verbunden sind [25,26]. Trotz der großen Unterschiede in der Oberfläche wird davon ausgegangen, dass über die gesamte Lunge etwa die gleiche Anzahl an Typ 1 wie Typ 2 AEC vorliegen [26]. Typ 1 AEC bilden primär die Blut-Luft-Schranke. Typ 2 Zellen bilden und speichern primär das *Surfactant* und dienen zusätzlich als Ersatz für Typ 1 AEC [25]. Das *Surfactant* besteht hauptsächlich aus Phospholipiden, welche die Oberflächenspannung des Flüssigkeitsfilmes, der den Alveolen aufliegt, reduziert. Dadurch wird die Auffaltung der Alveolen nach dem Ausatmen ermöglicht [25,26]. Des Weiteren enthält das *Surfactant* auch sogenannte *Surfactant*-assoziierte Proteine, die *Surfactant*-stabilisierende Eigenschaften haben, sowie direkt antimikrobiell und opsonisierend wirken können [25]. Damit sind sie ein wichtiger Faktor um bis hierhin eingedrungene Pathogene zu beseitigen. Sie wirken gemeinsam mit den Alveolarmakrophagen (AMΦ), die neben toten Zellmaterial und Staubpartikel auch geringe Mengen an Bakterien phagozytieren können [25,26].

Diese AM Φ sorgen dafür, dass eingedrungene Pathogene sich nicht festsetzen und übermäßig vermehren können. Aus dem Vergleich mit der Mauslunge, welche aus ca. 4 Millionen Alveolen besteht und schätzungsweise 1-1,3 Millionen AM Φ beherbergt, kann geschlussfolgert werden, dass nicht jede Alveole ständig mit einer AM Φ belegt ist. Es ist eher so, dass nur jede dritte Alveole eine AM Φ enthält und diese sich frei bewegen kann und zwischen den Alveolen patrouilliert [29].

1.3 Pneumokokken

1.3.1 Allgemeiner Überblick

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokkus) wurde bereits in den frühen 1880er Jahren unabhängig von Louis Pasteur und George M. Sternberg entdeckt. Sie beschrieben die Pneumokokken zunächst als lanzettförmige, kugelige (kokkoide) Bakterien und später als Diplokokken. Im weiteren Verlauf wurden Pneumokokken, als eine der ersten Bakterienart überhaupt, mittels der zu dieser Zeit entwickelten Gram-Färbung, positiv gefärbt [8]. Wie fast alle Bakterien schützen Pneumokokken ihre Zellmembran durch eine Schicht aus Peptidoglykan (PGN). Dieses besteht aus einer linearen Zuckerkette, die durch kurze Peptide vernetzt sind. Das Zuckerrückgrat wird als hoch konserviert angesehen und besteht abwechselnd $\beta(1\rightarrow 4)$ verknüpften *N*-Acetylglukosamin aus (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäure (MurNAc) Einheiten. Dahingegen sind die Peptide hoch variabel, können jedoch grob in zwei Kategorien unterteilt werden: L-Lysin (Lys)-Typ und meso-Diaminopimelinsäure (DAP)-Typ PGN. Diese Unterteilung beruht auf dem archetypischen Stammpeptid, dass aus fünf Aminosäuren gebildet wird: L-Alanin (L-Ala), D-Glutaminsäure (Glu), einer Diaminocarbonsäure (DACS) und zwei D-Alanin (D-Ala). In den meisten gramnegativen Bakterien ist die DACS eine DAP und bei den meisten grampositiven Bakterien ein Lys. Die erste und die fünfte Aminosäure können in einigen Bakterienarten von diesem Archetyp abweichen. Die Komplexität des PGN wird durch Quervernetzungen weiter erhöht, wodurch eine Vielzahl unterschiedlicher PGN-Modifikationen möglich sind (Abb. 1.03A) [30-32]. Im gleichen Maße gibt es verschiedene Enzyme, die PGN spalten können. Einige davon werden von den Bakterien selbst produziert, um z. B. eine Zellteilung zu ermöglichen, oder intrazelluläre Bestandteile freizusetzen. Andere werden vom Wirt produziert um u. a. die immunmodulatorische Wirkung des PGN zu neutralisieren (Abb. 1.03 und 1.04) [33-35].



Abb. 1.03: Struktur vom Lys-Typ PGN und dessen enzymatische Spaltung. A) Das grampositive Lys-Typ PGN ist eine polymere Struktur bestehend aus sich wiederholenden Sequenzen an GlcNAc und MurNAc. Des Weiteren ist über den Milchsäurerest zumeist ein Pentapeptid bestehend aus L-Ala, Glu, Lys und zwei D-Ala verknüpft. Quervernetzungen mit weiteren Peptidketten von Lys zu Glu über mehrere Aminosäuren sind möglich. Der Abbau von PGN kann z. B. durch verschiedene bakterielle und humane Enzyme geschehen. Hierzu gehören Lysozym, welches an der β -1,4-glykosidischen Bindung zwischen MurNAc und GlcNAc spaltet, Glukosaminidasen, welche zwischen GlcNAc und MurNAc spalten, das Peptidoglykan-erkennende Protein (*peptidoglycan recognition protein*, PGRP/PGLYRP¹) 2, welches zwischen MurNAc und L-Ala spaltet, sowie Carboxypeptidasen, die terminale Aminosäuren abspalten und Endopeptidasen, welche Peptidbindungen innerhalb der Peptidketten spalten. Struktur von B) Muramyldipeptid (MDP), C) Muramyltripeptid, (MTP) in der das dritte Peptid Lysin ist (MTP_{Lys}) mit Spaltstellen für PGLYRP2 und eine Carboxypeptidase und D) Glukosaminylmuramyldipeptid (GMDP) mit Spaltstelle für eine Glukosaminidase [32,33,36,37].

Bei grampositiven Bakterien ist diese PGN-Schicht wesentlich dicker als bei gramnegativen Bakterien, jedoch haben gramnegative Bakterien eine weitere äußere Membran und eine Lipopolysaccharid (LPS)-Schicht, die sie zusätzlich schützen. Über der PGN-Schicht können auch bei grampositiven Bakterien weitere Protein und Polysaccharid-Schichten liegen [38]. Im Falle der Pneumokokken wird das PGN durch eine Kapsel aus Polysacchariden (Polysaccharidkapsel, PSK) ummantelt (Abb. 1.04) [38,39]. Diese PSK wird bei Pneumokokken für die Einteilung in verschiedene Serotypen genutzt. Bislang sind mehr als 97 unterschiedliche Serotypen bekannt [39]. Weitere Merkmale von Pneumokokken sind die

¹ Peptidoglykan-erkennende Proteine werden in Insekten mit PGRP und in Säugetieren mit PGLYRP abgekürzt [71]. Siehe hierfür auch Abschnitt 1.5.1.

α-Hämolyse, die Empfindlichkeit gegen Galle und Optochin, sowie das Wachstum unter aeroben und anaeroben Bedingungen [38].

1.3.2 Virulenzfaktoren

Bereits 1931 war bekannt, dass die PSK ein essentieller Faktor für die Virulenz der Pneumokokken ist. Dubos und Avery zeigten, dass durch enzymatischen Abbau der Kapsel die Pneumokokken ihre Virulenz sowohl in Mäusen, als auch in Affen verloren [40,41]. Dies kann unter anderem mit einer Maskierung der Pneumokokken vor dem Immunsystem begründet werden: Die PSK verringert die Bindung von Komplementfaktoren, Antikörpern gegen Oberflächenproteine und den mukoziliären Abtransport [17,42]. Damit reduziert die PSK u. a. die Erkennung und Phagozytose durch Makrophagen (M Φ) und neutrophile Granulozyten (polymorphonuclear granulocyte, PMN) [8,39]. Andererseits kann das Immunsystem gegen ebendiese PSK Antikörper bilden und somit eine virulente Ausbreitung der Pneumokokken im Körper unterbinden [8]. Nicht nur der Serotyp, sondern auch die Dicke der PSK kann variieren. Die dicksten Kapseln wurden bislang bei den Serotypen 3, 37 und Mutanten von u. a. 6A und 19F festgestellt [8]. Des Weiteren ist bekannt, dass Pneumokokken die Dicke ihrer PSK im Wirt anpassen können. So nimmt die Kapseldicke bei engem Kontakt mit Epithelzellen ab, um effizienter durch die Zellen migrieren zu können. Im Anschluss wird wieder ein Teil des ursprünglichen Kapselmaterials aufgebaut [43]. Dies lässt darauf schließen, dass die Virulenz der Pneumokokken stark von der Kapselbeschaffenheit abhängt. Die Zahl unterschiedlicher PSK-Typen könnte unter anderem durch Selektionsdruck, z. B. durch Vakzinierung, sowie durch Punktmutationen weiter ansteigen [39].

Weitere Virulenzfaktoren der Pneumokokken sind unter anderem das Pneumolysin (Ply), Metalltransportproteine, die IgA1 Protease und Glykosidasen (siehe Abb. 1.04).

Das Poren-verursachende Toxin Ply ist u. a. mit der Hämolyse, sowie der Transmigration durch Epithelzellen verknüpft, aktiviert das Komplementsystem und wird hauptsächlich über Autolyse durch das Autolysin (LytA) freigesetzt. Damit ist es nicht nur ein wichtiger Virulenzfaktor der Pneumokokken, sondern aktiviert ebenfalls das Immunsystem und trägt zur Erkennung der Bakterien bei [17,42]. Transportproteine der Klasse Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Kassette (ABC, *ATP-binding cassette*) sind hauptsächlich für den Im- und Export von Substanzen in die bzw. aus der Zelle verantwortlich. Zu diesen ABC-Transportproteinen gehört u. a. das Mangantransportprotein "Pneumokokkenoberflächenprotein A" (*pneumococcal surface protein A*, PsaA). Das Mangan ist essenziell für das Wachstum und die Vermehrung der Pneumokokken. Wenn der PsaA und damit der

Manganimport z. B. durch zu hohe Konzentrationen von Zink inhibiert wird, kann das Wachstum der Bakterien gebremst und die Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress gesteigert werden [44]. Daher ist das Zusammenspiel von Metalltransportproteine wie PsaA und Adhäsin Kompetenz A (adhesin competence A, AdcA), welches den Zinkhaushalt regelt, überaus wichtig für das Überleben der Bakterien. Des Weiteren nutzen Pneumokokken N- und O-Glykosidasen, wie z. B. die Neuraminidase (NanA), eine β -Galaktosidase (BgaA) und eine β-N-Acetylglykosyl Amidase (StrH) um Zuckerstrukturen von Proteinen abzuspalten. Dadurch gewinnen Bakterien einerseits Energie für Wachstum und Biofilmgenerierung und andererseits können die Bakterien durch diese Enzyme leichter an Zelloberflächen adhärieren und ggf. Enzyme des Immunsystems deaktivieren [45,46]. Des Weiteren besitzen Pneumokokken mehrere Proteasen, die Wirtsproteine inaktivieren und verdauen können. Zu diesen Enzymen gehören die Serinproteasen "high-temperature requirement A" (HrtA), die Zellwand-assoziierte Serinprotease A (cell-wall associated serine protease A, PrtA) und das Subtilase-Familienprotein A (subtilase family protein A, SFP), sowie die Zink-Metalloproteasen (zinc metalloproteinases, Zmp) A, B, C und D [47]. Die ZmpA ist auch als IgA1 Protease bekannt und wurde kürzlich nicht nur als oberflächenverankertes Protein, sondern ebenfalls als sekretiertes Enzym beschrieben [48].



Abb. 1.04: Übersicht über einige wichtige Virulenzfaktoren der Pneumokokken. Schematische Darstellung von *S. pneumoniae* als Diplokokkus. Die PSK umgibt die Peptidoglykan-Zellwand der Pneumokokken. Die ABC-Transportproteine AdcA, PiaA (*pneumococcal iron acquisition*), PiuA (*pneumococcal iron uptake*) und PsaA sind für den In- und Export von Metallen verantwortlich. LytA setzt u. a. intrazelluläre Bestandteile wie Ply frei. Deglykolysierende Proteine wie NanA, BgaA und StrH spalten Zuckerstrukturen von Proteinen und akquirieren so Nährstoffe für das Bakterium oder modifizieren die Aktivität von Proteinen. Die Cholin-bindenden Proteine PspA und PspC (*pneumococcal surface protein C*) sind Adhäsionsproteine und interagieren u. a. mit dem Komplementsystem. Proteasen wie HrtA, PrtA, SFP und ZmpA (IgA1 Protease) bauen andere Proteine ab und verringern damit u. a. die Wirt-Immunabwehr [17,47,48].

1.4 Immunantwort auf bakterielle Lungeninfektion

Säugetiere schützten sich vor Infektionen und eindringende Fremdstoffe durch das Immunsystem, welches in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt wird. Das angeborene Immunsystem umfasst hoch konservierte Faktoren, welche in dieser und ähnlicher Form auch in Pflanzen, Insekten und anderen niederen Tieren vorhanden sind. Hierzu gehören u. a. mechanische Schutzbarrieren wie der Mukus, geschlossene Zellbarrieren (Epithel- und Endothelzellen in z. B. der Haut und Lunge) und spezialisierte Zellen wie M Φ und PMN, welche über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) eindringende Erreger wie Viren und Bakterien erkennen und anschließend unschädlich machen können [49].

Zu diesen PRR gehören z. B. die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*Toll-like receptor*, TLR), die Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (*nucleotide-binding oligomerization domain*, NOD), Leucin-reiche Wiederholungen und Pyrin-Domäne enthaltende Proteine (*nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), *leucine rich repeat and pyrin domain containing*, NLRP), die C-Typ Lektine und zumindest in Insekten auch die PGRP [49,50]. Diese PRR können z. B. sekretierte Bestandteile oder Oberflächenmoleküle von Bakterien erkennen und leiten die Produktion und Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen und anderen Substanzen ein. Hierzu gehören z. B. Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin (IL)-1 β und IL-8, aber auch viele weitere Moleküle wie Komplementfaktoren, Interferone (IFN), reaktive Sauerstoff (*reactive oxygen species*, ROS)- und Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, NOS), sowie antimikrobielle Proteine (siehe Abb. 1.05) [49,51–53].



Abb. 1.05: Abwehr von Bakterien an der epithelialen Barriere und Zusammenspiel wichtiger Zellen. A) Bakterien induzieren Zellschäden. Dadurch werden u. a. Zytokine freigesetzt, die Immunzellen rekrutieren und aktivieren. B) Patrouillierende MΦ (z. B. in der Lunge) können Bakterien bereits vor der Infiltration tieferliegender Schichten erkennen und phagozytieren. Zytokine werden freigesetzt um weitere Immunzellen zu rekrutieren. C) Epithelzellen können Bakterien detektieren, Zytokine und weitere Substanzen ausschütten und Antigene von intrazellulären Erregern (v. a. Viren) präsentieren. D) Spezialisierte Epithelzellen (Becherzellen) sekretieren Mukus um eine schützende Barriere zwischen dem Epithel und möglichen Pathogenen und Umwelteinflüssen zu schaffen. E) Zellen (z. B. dendritische Zellen, DC) präsentieren spezialisierten T- und B-Zellen bakterielle Antigene und aktivieren diese u. a. zur Antikörperproduktion (B-Zellen). F) MΦ und u. a. natürliche Killerzellen (NK Zellen) können sich wechselseitig stimulieren um weitere Effektorfunktionen auszuüben. Bei den Makrophagen gehören u. a. Zytokinausschüttung, Bildung von ROS und NOS, sowie die Phagozytose zu ihren Effektorfunktionen. G) PMN werden durch Zytokine zum Ort der Infektion geleitet und aktiviert. Anschließend können diese u. a. Zytokinauschüttung, NET) binden. Angepasst nach [54].

Die genannten Moleküle können Pathogene direkt eliminieren, für Immunzellen markieren oder sie führen zur Aktivierung spezieller Immunzellen, welche wiederrum an der Eliminierung der Pathogene oder an der Reparatur geschädigter Gewebe beteiligt sind [49,55–57]. Insbesondere AMΦ und PMN spielen bei der Pneumokokken-induzierten Pneumonie eine entscheidende Rolle [58,59]. Bei kleineren Mengen an Pneumokokken sorgen die AMΦ, welche in den Außenwänden der Alveolen patrouillieren, für die Erregerelimination. Jedoch haben die AMΦ nur eine begrenzte Kapazität zur Eliminierung von eingedrungenen Erregern, sodass diese bei größeren Mengen an Pathogenen Unterstützung von anderen Immunzellen benötigen. Diese Unterstützung leisten vor allem PMN die aus dem Knochenmark rekrutiert werden und die Pathogene wie z. B. Pneumokokken eliminieren [60].

Zur Erkennung von Pneumokokken sind vor allem TLR2, TLR9, NOD2, möglicherweise TLR4, sowie in Insekten und eventuell auch in Säugetieren die PGLYRP von Bedeutung [53]. Daneben gibt es noch weitere Rezeptoren, wie NLRP3, CD14, Makrophagen-Rezeptor mit kollagenartiger Struktur (*macrophage receptor with collagenous structure*, MARCO) und C-Typ Lektine, wie der Makrophagen-induzierte Ca²⁺-abhängige Lektin Rezeptor (*macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor*, Mincle), welche bestimmte Bestandteile der Pneumokokken erkennen können und somit ebenfalls einen Teil zur Immunabwehr gegen *S. pneumoniae* beitragen [50,53,61–66]. Wichtige Strukturen der Pneumokokken, die von Rezeptoren erkannt werden, sind in der Abbildung 1.06 aufgezeigt.



Abb. 1.06: Wichtige Moleküle für die Pneumokokken-Erkennung. Es werden extra- und intrazelluläre Rezeptoren und Proteine von Säugetieren, sowie die bekannten Liganden von *S. pneumoniae* dargestellt. Die sekretierten PGLYRP interagieren mit PGN- und PGN-Fragmenten wie MTP, aber nicht mit MDP. Die Transmembranrezeptoren TLR2 und TLR4 interagieren mit PGN, LP und LTA, bzw. mit LTA und möglicherweise Ply. Die C-Typ Lektine, wie Mincle erkennen Glykolipide wie das Glc-DAG. Für CD14 sind die Interaktionspartner LTA und PGN bekannt, wohingegen für den Transmembranrezeptor MARCO der spezifische Pneumokokken-Ligand bislang unbekannt ist. Die intrazellulären Rezeptoren NOD2, und NLRP3 erkennen MDP bzw. Ply, LTA, MDP, extrazelluläres ATP und bakterielle Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA). Als weitere wichtiger Rezeptor für die Erkennung von Pneumokokken ist der TLR9 bekannt. Dieser liegt endosomal vor und erkennt bakterielle DNA. Glc-DAG: Glykosyl-diacylglycerol, LP: Lipopeptide, LTA, Lipoteichonsäure [50,53,61–66].

1.5 Wirt-Abwehrproteine

Neben Zytokinen, Komplementfaktoren, ROS und NOS, die entweder direkt antibakteriell oder indirekt durch die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen wirken, gibt es sogenannte antimikrobielle Proteine [49,55–57,67]. Diese gelten als körpereigene Antibiotika und können gegen verschiedene Organismen, wie Bakterien, Viren und Pilze wirken. Ihre antimikrobiellen Eigenschaften werden zumeist durch *in vitro* Tests ermittelt, in denen diese Proteine direkt Pathogene abtöten oder zumindest deren Wachstum inhibieren können. Studien zeigen jedoch,

dass viele dieser antimikrobiellen Proteine unter physiologischen Bedingungen keine direkten, antibakteriellen Eigenschaften besitzen [68]. Dennoch schützen diese Proteine vor Pathogenen und tragen einen Teil zur Gesundheit des Wirtes bei. Die Schutzfunktion scheint bei diesen Proteinen auch auf immunmodulatorischen Effekten, wie z. B. der Chemotaxis, der Regulation von Zytokinausschüttung, Förderung der Angiogenese und Apoptose-Vermittlung, zu beruhen [67,68]. Aus diesem Grund ist die generelle Bezeichnung als Wirt-Abwehrproteine (*host defense proteins*, HDP) treffender für diese Gruppe an Molekülen [68]. Bislang sind mehr als 120 humane HDP und insgesamt ca. 3000 HDP über alle Spezies bekannt [68,69]. Die größte Gruppe an humanen HDP bilden dabei die Defensine mit 40 Proteinen [70]. Weitere HDP sind u. a. das Cathelicidin LL-37, das PGN-lysierende Lysozym und die Familie der PGLYRP [67–71].

1.5.1 Struktur und Überblick über Peptidoglykan-erkennende Proteine

Die PGRP wurden erstmals 1996 unabhängig voneinander in der Motte Bombyx mori als PGRP [72] und in der Maus als tag7 [73] beschrieben. Yoshida et al. zeigten, dass dieses PGRP bakterielles PGN binden kann (vgl. Abb. 1.07) und Kustikova et al. konnten eine höhere Genexpression von tag7 (später bezeichnet als PGLYRP1) in verschiedenen Tumorgeweben aufzeigen [72,73]. Bereits 1998 konnten Kiselev et al. nachweisen, dass ihr identifiziertes tag7 die Apoptose in murinen L929 Zellen fördert [74]. Kurz darauf wurde bekannt, dass diese Proteine zu einer größeren Familie gehören und von Insekten bis Säugetieren hoch konserviert sind [75,76]. Funktionelle Untersuchungen mit humanen PGRP (später identifiziert als PGLYRP1) zeigten, dass es nicht nur PGN bindet und die Apoptose fördert, sondern auch antibakterielle Eigenschaften gegenüber Bacillus megaterium hat [77]. In den folgenden Jahren wurde diese Proteinfamilie in verschiedenen Modellsystemen untersucht und systematisch benannt. So werden die PGRP zunächst in leichte (small, S) oder schwere (large, L) PGRP unterteilt (PGRP-S bzw. PGRP-L) und im Folgenden die Säugetier-PGRP als PGLYRP benannt und durchnummeriert [71]. Leichte PGRP sind ca. 200 Aminosäuren lang und schwere PGRP sind oftmals doppelt so lang. Damit ergeben sich Molekülmassen der Monomere von ca. 19-45 kDa [71]. Insgesamt sind bislang mehr als 100 verschiedene PGRP identifiziert worden, davon vier in den meisten Säugetieren, neun in der Anophelesmücke (Anopheles gambiae) und 19 in der Fruchtfliege (Drosophila (D.) melanogaster) [78]. Es gibt jedoch auch Lebewesen, die keine PGRP besitzen. Hierzu gehören insbesondere Pflanzen und Nematoden [71]. Die gemeinsame Determinante in allen PGRP ist die ca. 165 Aminosäuren lange, konservierte Bakteriophagen- und Bakterien-Typ 2-Amidase-ähnliche PGRP-Domäne am C-Terminus



(siehe Abb. 1.07). Der *N*-Terminus hingegen ist für jedes PGRP einzigartig und hoch variabel [79].

Abb. 1.07: C-Terminale PGN-Bindungsdomäne von humanem PGLYRP1 und PGLYRP3 im Komplex mit Muramyltripeptid. Die PGLYRP sind im Regenbogen-Farbcode eingefärbt und A und C) als Bändermodell mit Disulfidbrücken als schwarze Linien oder als B und D) Kalottenmodell dargestellt. Da keine Kristallstrukturen von einem humanen PGLYRP1-PGN Komplex in der Literatur (PubMed, UniProt, PDB) vorhanden sind wird nur PGLYRP3 als Komplex mit MTP gezeigt. In C und D) wird das MTP als Kugel-Stab-Modell gezeigt, wobei Kohlenstoff grau, Sauerstoff rot und Stickstoff blau gefärbt sind. Die Proteinstrukturen sind aus der RCSB Protein Data Bank (PDB ID: 1YCK (PGLYRP1) und 1TWQ (PGLYRP3), http://www.rcsb.org/) entnommen [80]. Originaldaten von [79,81].

PGRP können generell in zwei Gruppen eingeordnet werden. Die eine Gruppe besitzt eine *N*-Acetylmuramyl-L-alanin Amidase Funktion, die andere Gruppe besitzt diese enzymatische Aktivität nicht. Nicht-enzymatische Insekten-PGRP aktivieren den Toll und Immundefekt (*immune deficiency*, Imd) Signalweg oder die Prophenoloxidase (proPO) Kaskade, wodurch z. B. antibakteriell-wirkenden Proteine sekretiert werden. Die nicht-enzymatischen PGRP von Säugetieren sind jedoch als direkt antibakteriell-wirkende Proteine beschrieben. Sie stellen somit keine Rezeptoren, sondern direkte Effektorproteine dar [71]. Des Weiteren ist aus Kristallstrukturanalysen bekannt, dass in den PGN-Bindungstaschen von enzymatisch-aktiven PGRP ein Zn²⁺ vorliegt [82].

Das Zink dient als elektrophiler Katalysator und vermittelt die enzymatische Funktion dieser PGRP [81]. Weitere Unterschiede zwischen den einzelnen PGRP sind unter anderem die stabilisierenden Disulfidbrückenbindungen. Nur eine einzige scheint zwischen allen PGRP konserviert zu sein und eine weitere scheint ausschließlich in den Amidase-PGRP vorhanden zu sein [79]. Verschiedene Bindungsstudien zeigten ebenfalls, dass die Bindung von PGN und PGN-Fragmenten über Wasserstoff-Brückenbindungen und van-der-Waals Kräfte, sowohl mit dem Peptidstamm, als auch der Zuckerkette, aufgebaut wird. Den zahlenmäßig größten Anteil stellen hier die van-der-Waals Kräfte (43 gegenüber 9 Wasserstoff-Brücken) und beide Kräfte werden überwiegend mit dem Peptid-Stamm ausgebildet [81,83]. Dies scheint u. a. ein Mechanismus zu sein, über den vor allem Insekten zwischen verschiedenen bakteriellen Erregern unterscheiden und somit ihre Immunabwehr koordinieren können [81].

Des Weiteren ist bekannt, dass die PGRP nicht nur über eine PGN-erkennende Bindungstasche verfügen, sondern eine weitere Bindungstasche besitzen, die auf der gegenüberliegenden Seite des Proteins angeordnet ist [82]. Zu den bekannten und vermuteten Liganden zählen unter anderem das Hitzeschockprotein 70 (HSP70), LTA, LPS, 1,3-β-Glukan, das Gramnegative Bindungsprotein 1 (*Gram-negative binding protein 1*, GNBP1), Komplementfaktoren und Fettsäuren [79,84–89]. Bei der Bindung von PGN scheinen zudem immer zwei PGRP-Moleküle beteiligt zu sein (Abb. 1.08). Durch die Bildung von Dimeren, mit zueinander gewandten PGN-Bindungsdomänen, wird das PGN eingeschlossen und Rezeptoren frei [82].



Abb. 1.08: Proteinstruktur vom PGLYRP3-Dimer. Die *C*-terminalen Enden von zwei PGLYRP3 Proteinen sind in Türkis, bzw. Gelb dargestellt. A) Im Bändermodell sind fünf Seitenketten markiert, die wahrscheinlich an der Bindung von PGN beteiligt sind (Grün) und jeweils ein Natriumion in der Gelenkschleife (*hinge loop*), die die beiden Monomere verbindet. B) Im Kalottenmodell ist die PGN-Bindungstasche in Rot bzw. Grün dargestellt [82].

1.5.2 Insekten-PGRP am Beispiel von D. melanogaster

Die PGRP gehören zu den wichtigsten PRR in Insekten. Im folgendem wird hier, stellvertretend für weitere Insektenarten, auf die Funktion von PGRP in *D. melanogaster* eingegangen. Insgesamt besitzt *D. melanogaster* 13 PGRP-Gene, welche durch alternatives Spleißen in insgesamt 19 verschiedene, funktionale Proteine umgeschrieben werden [76].

Sie dienen als membrangebundene (z. B. PGRP-LC), intrazelluläre (z. B. PGRP-LE) oder lösliche Rezeptoren (z. B. PGRP-SA und -SD), die Pathogene erkennen und je nach Pathogen, unterschiedliche Signalwege aktivieren können. PGRP-SA erkennt vor allem grampositive Bakterien und Pilze und aktiviert im Zusammenspiel mit anderen PGRP und Proteinen den Toll-Signalweg (Abb. 1.09A). PGRP-LC und -LE werden hingegen vor allem durch gramnegative Bakterien und deren DAP-Typ PGN angesprochen und aktivieren den Imd-Signalweg (Abb. 1.09C), welcher das Ortholog des Säugetier-TNF- α Signalweges ist. Durch die Aktivierung des Toll- bzw. Imd-Signalweges wird der "nukleäre Faktor, der an den Promotor leichter Kappa-Ketten von B-Lymphozyten bindet" (*nuclear factor 'kappa-lightchain-enhancer' of activated B-cells*, NF- κ B) aktiviert, transloziert in den Zellkern und sorgt für die Expression von antimikrobiellen Peptiden wie Drosomycin, Diptericin und Defensine [71,90].

Weitere Mechanismen von PGRP sind z. B. die Autophagie durch PGRP-LE nach intrazellulärer Erkennung von z. B. *Listeria* (*L.*) monocytogenes, die Phagozytose von Bakterien nach Erkennung durch PGRP-LC oder -SC1 und die Aktivierung der proPO Kaskade (Abb. 1.09B), welche u. a. zu Wundheilung und Melaninbildung führt [78,90]. Eine weitere bereits erwähnte Eigenschaft von PGRP ist deren enzymatische Aktivität. In Drosophila konnte diese Amidase-Funktion, durch welche die Aminosäurebindung zwischen dem Zuckerrückgrat und dem Stammpeptid hydrolysiert wird, für PGRP-SC1, -SB1 und -LB nachgewiesen werden und ist für einige weitere PGRP vorhergesagt (Abb. 1.09D und Abb. 1.03). Durch diese Hydrolyse kann die Immunantwort auf bakterielles PGN reduziert, bzw. verändert werden. In diesem Zusammenhang wird von der Rolle als *Scavenger*-Rezeptor gesprochen, da hierdurch eine Immunantwort gestoppt werden könnte. Des Weiteren kann diese Funktion auch zur Homöostase zwischen Immunsystem und kommensalen Bakterien z. B. im Darm beitragen. Wie bereits angedeutet, ist dies die einzig konservierte Funktion von PGRP, die sowohl in Insekten als auch in Säugetieren vorkommt und somit kann auch für das Säugetier PGLYRP2 die Rolle als *Scavenger*-Rezeptor diskutiert werden [90].



Abb. 1.09: Funktionen von Insekten-PGRP. A) Der Toll-Signalweg wird in *D. melanogaster* durch PGRP-SD und -SA aktiviert, die Lys-Typ PGN von grampositiven Bakterien erkennen. Des Weiteren können Pilzstrukturen durch GNBP1 und 3 erkannt werden. Auch DAP-Typ PGN kann in einigen Insekten durch GNBP erkannt werden, jedoch ist diese Funktion in Drosophila nicht vorhanden. B) Die Prophenoloxidase (proPO) kann durch PGRP-LE und -SA aktiviert werden, welche entweder DAP-Typ oder Lys-Typ PGN erkennen. Als Folge dessen, werden ROS und Melanin gebildet, die antibakterielle und Wundheilungseigenschaften haben. C) Der Imd-Signalweg wird durch PGRP-LC und -LE erkannt, welche extra- oder intrazelluläres DAP-Typ PGN erkennen. D) Die Hauptaufgabe der löslichen Amidasen PGRP-SC1, -SB1 und -LB besteht in der Hydrolyse von PGN, aber PGRP-SC1 kann ebenfalls die Phagozytose von Bakterien fördern. PO: Phenoloxidase [71,78].

1.5.3 PGRP in Säugetieren: PGLYRP

Neben Insekten besitzen auch Menschen und Tiere wie z. B. Mäuse, Rinder, Fische und Vögel eine Anzahl an PGLYRP [71]. In Menschen und Mäusen wurden jeweils vier PGLYRP (PGLYRP1-4) identifiziert, welche sich sowohl in ihren Expressionsmustern als auch in ihren Funktionen voneinander unterscheiden. So werden die PGLYRP1, 3 und 4 im Allgemeinen als direkt antibakteriell-wirkende Proteine und das PGLYRP2 als enzymatisch wirkendes Protein beschrieben [91]. Es sind jedoch weitere hiervon unabhängige Funktionen beschrieben. Allen Säugetier-PGLYRP ist gemein, dass sie als Dimere vorliegen und nicht membranständig sind, sondern als ungebundene Proteine sekretiert werden [92,93]. Neben den Homodimeren ist auch ein Heterodimer aus PGLYRP3 und 4 bekannt [71]. Demzufolge werden PGLYRP3 und 4 zumeist in denselben Zellen und Zellkompartimenten exprimiert. Hauptsächlich können diese beiden Proteine in Epithelgeweben, insbesondere im Ösophagus, der Haut und im Darm nachgewiesen werden [71]. PGLYRP1 wird hauptsächlich in PMN produziert, in deren Granula gespeichert und zusammen mit diesen aktiv ausgeschleust [71]. Das PGLYRP2 wird hingegen hauptsächlich in der Leber produziert und ins Blut sekretiert, wo es durch den Körper zirkuliert [92,94]. Des Weiteren können diese Proteine durch verschiedene Stimulanzien in vielen anderen Zellen zur Expression angeregt werden [95–102].

In Insekten zählen die PGRP zu den wichtigsten Pathogenabwehrproteinen, wohingegen die Bedeutung von PGLYRP in Säugetieren weniger gut untersucht ist. Jedoch kann, unter anderem durch die Expressionsprofile und Stimulierbarkeit durch Pathogene und pathogen-assoziierte Substanzen, ähnliches auch für Säugetiere angenommen werden. Unterstützend für diese These ist unter anderem ihr breites Wirkungsspektrum gegen verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien. Für PGLYRP1, 3 und 4 konnten antibakterielle Eigenschaften gegen u. a. *Staphylococcus* (*S.*) *aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus* (*B.*) *subtilis*, *Escherichia* (*E.*) coli, *Streptococcus* (*S.*) *pyogenes*, *Salmonella* (*S.*) *enterica*, *Shigella sonnei*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa* und *Lactobacillus acidophilus* nachgewiesen werden [93,103]. Neuere Ergebnisse belegen auch für PGLYRP2 ein breites Wirkspektrum gegen extrazelluläre, grampositive und –negativ Bakterien (*B. subtilis*, *E. coli*) und intrazelluläre, gramnegative Bakterien (*Chlamydia trachomatis*) [104].

Ihre antibakterielle Wirkung sollen die PGLYRP über die Induktion dreier, unabhängig voneinander induzierten Stressantworten (oxidativer-, Thiol- und Metall-Stress, Abb. 1.10) entfalten. In *E. coli* konnte gezeigt werden, dass nur die gemeinsame Induktion aller drei Wege bakterizid ist. Kann einer dieser Wege nicht angesprochen werden, werden die Bakterien am Wachstum gehindert, überleben jedoch und können sich wieder vermehren, sobald die PGLYRP Konzentration sinkt [105].



Abb. 1.10: Mechanismus der antibakteriellen Wirkung der PGLYRP. PGLYRP binden an die Zelloberfläche von Bakterien und induzieren den vermehrten Import von Zink und Kupfer in das Bakterium. Des Weiteren verringern sie die Konzentration von intrazellulären Thiolen durch einen erhöhten Verbrauch und unabhängig von der Induktion oxidativen Stresses. Über welche Mechanismen die PGLYRP diese Wirkung vermitteln ist bislang ungeklärt. Zusätzlich wird oxidativer Stress über einen gesteigerten zentralen Kohlenstoff Katabolismus und einer Blockierung des Elektronentransportes in der Atmungskette induziert. Im Einzelnen ergibt sich eine gesteigerte Glykolyse mit einem höheren Verbrauch von NADH. Elektronen können über die Atmungskette nicht in Wasser eingebaut werden, sodass reaktive Sauerstoffspezies wie Hydroxylradikale (OH $^{\circ}$) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) entstehen. NAD⁺: oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, NADH: reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, NDH: NADH Dehydrogenase. [91].

Die enzymatische Aktivität des PGLYRP2 ist vergleichbar mit der von Insekten PGRP [94]. Wie bereits erwähnt, hydrolysiert PGLYRP2 die Aminosäurebindung zwischen MurNAc und L-Ala, von sowohl polymerem PGN, als auch kleineren Fragmenten (Abb. 1.03A und C). Dabei ist das minimal erkannte Motiv das MTP (Abb. 1.03C) [94]. PGLYRP2 kann in Mengen von ca. 10–100 µg/ml PGLYRP2 in humanem Blut nachgewiesen werden und liegt damit bis zu 10-fach höher konzentriert vor als Lysozym, ein anderes humanes PGN-hydrolysierendes Enzym [34,35]. Im Zusammenspiel mit Lysozym und anderen Amidasen, können unterschiedliche immunmodulatorische PGN-Fragmente entstehen (siehe auch Abb. 1.03). Zusätzlich zu den beschrieben antibakteriellen Eigenschaften wurden parallel weitere immunologisch relevante Funktionen entdeckt. So entdeckten Forscher um L. P. Sashchenko u. a. anti-Tumor, chemotaktische und zellaktivierende Funktionen von PGLYRP1 [106–108] und Read *et al.* entdeckten, dass PGLYRP1 der bislang einzige bekannte, endogene Ligand für den "auslösenden Rezeptor, exprimiert auf myeloischen Zellen" (*triggering receptor expressed on myeloid cells*, TREM-1) ist [109].

Für PGLYRP2 konnte gezeigt werden, dass der Gen-*knockout* (KO) protektiv gegen eine *P. aeruginosa* Augeninfektion [110] und PGN- oder MDP-induzierte Arthritis ist [100]. Bei

einer Natrium-Dextransulfat (DSS)-induzierten Psoriasis-ähnlichen Hautentzündung oder Kolitis hingegen ist PGLYRP2 protektiv [111]. Weitere Studien zeigen eine Assoziation zwischen PGLYRP2 und Parkinson [112], sowie dem Sozialverhalten von Mäusen [113].

Für das PGLYRP3 konnte ein Einfluss auf die humane Monozyten Zelllinie THP-1 festgestellt werden. Durch eine Stimulation der THP-1 Zellen mit PGN und Zugabe von rekombinantem PGLYRP (rPGLYRP) 3 weisen die Zellen eine höhere Phagozytose-Kapazität und schütteten mehr Entzündungsmediatoren aus [114]. In einer intestinalen Epithelzelllinie (Caco-2) zeigt sich allerdings ein gegenteiliger Effekt. PGLYRP3-KO Zellen zeigten eine erhöhte Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und diese Ergebnisse konnten durch eine Überexpression von PGLYRP3 in diesen Zellen umgekehrt werden [115]. PGLYRP3, wie auch PGLYRP1, 2 und 4 zeigen einen protektiven Effekt bei der DSS-induzierten Kolitis [100,111]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl PGLYRP3, als auch PGLYRP4, einen Einfluss auf den Verlauf und den Schweregrad einer chemisch-induzierten Dermatitis haben. Dabei wird u. a. das Gleichgewicht von regulatorischen T-Zellen und T-Helfer (T_H) 17 Zellen beeinflusst [116].

Die demonstrierten direkten, antibakteriellen Effekte und die immunmodulatorischen Effekte sind höchstwahrscheinlich voneinander unabhängige Prozesse. Die Hinweise hierfür liefert zum einen die Anordnung der Bindungstaschen für PGN und die für andere Moleküle auf zueinander gegenüberliegenden Seiten [82]. Des Weiteren konnten R. Dziarski *et al.* zeigen, dass die direkten antibakteriellen Eigenschaften von PGLYRP3 und 4 von der *N*-Glykosylierung der Proteine abhängt. Durch Entfernung dieser posttranslationalen Proteinmodifikation wird der antibakterielle Effekt inhibiert [93]. Weitere Gruppen arbeiteten mit PGLYRP, die in *E. coli* produziert wurden und somit keine *N*-Glykolysierung aufweisen. Dennoch sind diese Proteine immunmodulatorisch aktiv [106–108,114].

Diese antibakteriellen und die immunmodulatorischen Effekte der PGLYRP können nicht nur auf Pathogene wirken, sondern auch einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Mikrobiota² haben. So zeigten Studien aus der Gruppe von R. Dziarski, dass das Darmmikrobiom³ in allen vier PGLYRP-KO Mauslinien verändert ist [111]. Im weiteren Verlauf ihrer Untersuchungen konnten sie nachweisen, dass die Veränderungen im Mikrobiom den Verlauf der DSSinduzierten Kolitis beeinflusst [117].

² Mikrobiota: Die Gesamtheit der Mikroorganismen innerhalb einer bestimmten ökologischen Nische.

³ Mikrobiom: Die Gesamtheit der genetischen Informationen (z. B. durch 16S rRNA Sequenzierung erhalten) einer mikrobiellen Gemeinschaft.

1.6 Mikrobiom in Gesundheit und Erkrankung

Der Mensch ist von einer Vielzahl an Mikroorganismen bevölkert. Aktuelle Schätzungen gehen von ca. 38 Billionen $(3,8 \cdot 10^{13})$ Bakterien im Referenzmensch (u. a. 70 kg schwer, Männlich, 20-30 Jahre alt, vgl. [118]) aus. Das sind in etwa genauso viele bakterielle, wie humane Zellen $(3 \cdot 10^{13})$ [118]. Zusätzlich wird der Mensch von Archaeen, Viren, Pilzen, Protozoen und Metazoen bevölkert, doch Bakterien stellen die zahlenmäßig bei weitem größte Fremdpopulation dar [119]. Die Gesamtheit an Mikroorganismen in einer bestimmten ökologischen Umgebung wird im Allgemeinen als Mikrobiota, wohingegen die genetischen Informationen daraus als Mikrobiom bezeichnet werden [120]. Meistens wird das Mikrobiom jedoch auf die Domäne der Bakterien beschränkt und wird auch in dieser Arbeit so verwendet. Mikroben kolonisieren nahezu alle Bereiche unserer Welt und leben sogar an extremsten Orten, wie heiße, saure Geysire, "schwarzen Rauchern" oder im arktischen Permafrost [121–124]. So ist es nicht verwunderlich, dass auch Menschen und Tiere eine Unzahl an Mikroben beherbergen und diese in allen Bereichen auf und im Körper zu finden sind (vgl. Abb. 1.11) [125,126].



Abb. 1.11: Mikrobiota in Mensch. Relativer Anteil der am häufigsten vertretenen Arten an Bakterien, Viren und Pilzen im Menschen. Viren sind unterteilt in Bakteriophagen und eukaryotische Viren, Pilze in die fünf größten Phyla, sowie "andere" und Bakterien in die sechs größten Phyla [126].

In den Mikrobiota sind sowohl kommensale als auch pathogene Bakterien enthalten, wobei die kommensalen Bakterien den Wirt u. a. mit Nährstoffen versorgen, aber auch Körpernischen belegen, wodurch pathogene (potentiell schädliche) Bakterien sich nicht einnisten oder übermäßig vermehren können [127,128]. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien wird auch als Dysbiose bezeichnet und kann im Rahmen vieler Krankheiten beobachtet werden [128,129]. Hierzu gehören unter anderem Typ 1 und Typ 2 Diabetes, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (z. B. Morbus Crohn) und die chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) [128,129]. Bei diesen Erkrankungen ist nicht bekannt, ob die Erkrankung zu einer Dysbiose führt, oder ob eine Dysbiose die kausale Ursache ist bzw. begünstigend auf die Entwicklung dieser Erkrankungen wirkt. Bei andern Erkrankungen gibt es jedoch einen klaren

Zusammenhang zwischen eine Dysbiose und der Entwicklung einer Erkrankung. Hierzu zählen zum Beispiel Infektionskrankheiten, wie die Pneumonie, bei der die initiale Einnistung und die Vermehrung eines Pathogens durch einen Dysbiose begünstigt werden kann [130]. Wie der Körper zwischen "guten", kommensalen und "schlechten", pathogenen Bakterien unterscheidet, konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden. Eine Möglichkeit könnte eine unterschiedliche Erkennung von Bakterien über PGLYRP oder PRR und deren Aktivierung sein. Wie bereits erwähnt, können zumindest Insekten-PGRP zwischen verschiedenen bakteriellen Substanzen unterscheiden und werden ggf. unterschiedlich stark durch verschiedene PGN aktiviert [78,81,131]. Des Weiteren konnten Brown *et al.* kürzlich Unterschiede in der Aktivierung von NOD-Rezeptoren durch verschiedene Bakterien nachweisen. In diesen Experimenten führte eine stärkere Aktivierung zu einer verbesserten *in vitro* Eliminierung von *S. pneumoniae* [131].

Aufgrund der Tatsache, dass die Lunge bis vor einigen Jahren als steril angenommen wurde, sind die meisten Untersuchungen zu Mikrobiota im GI-Trakt durchgeführt worden. Durch neue, auf 16S ribosomale RNA (rRNA) Analysen basierende Methoden, wird heutzutage jedoch davon ausgegangen, dass die Lunge ebenfalls von Mikrobiota beherbergt wird [126]. Daraus folgend steigt die Anzahl an Veröffentlichungen, die eine wechselseitige Beeinflussung zwischen Lungen- und Darmmikrobiota aufzeigen. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass die Darmmikrobiota wichtig für eine wirksame Verteidigung gegen eine S. pneumoniaeinduzierte Lungeninfektion ist [130]. Aus humanen Studien ist zudem bekannt, dass es bei entzündlichen Darmerkrankungen (z. B. Morbus Crohn) vermehrt zu Lungenerkrankungen (wie z. B. COPD) kommen kann und auch der umgekehrte Fall, dass COPD Patienten vermehrt Morbus Crohn entwickeln, ist in der Literatur beschrieben [132]. Es ist vorstellbar, dass bei einer Veränderung der Darmmikrobiota die von den Bakterien produzierten kurzkettigen Fettsäuren (short-chain fatty acid, SCFA) einen Teil zu dieser wechselseitigen Beeinflussung beisteuern. Diese SCFA werden über das Blut durch den Körper transportiert und stehen somit systemisch zur Verfügung [133]. Vor allem Butyrat besitzt diverse immunmodulatorische Eigenschaften. So kann es unter anderem die Zytokinexpression, Zellproliferation, -migration und -adhäsion beeinflussen [134]. Insbesondere Bakterien der Familie Lachnospiraceae sind für die Butyrat-Produktion bekannt [135], aber auch andere Bakterien, wie der Lactobacillus rhamnosus, können immunmodulatorisch wirken [136] und vor Infektionserkrankungen schützen [137,138].
2 Zielsetzung

2.1 Fragestellung

Peptidoglykan-erkennende Proteine sind als antimikrobielle und immunmodulierende Proteine bekannt und liegen hochkonserviert in verschiedenen Spezies wie Insekten und Säugetieren vor [75,76]. Ihre Eigenschaften in Bezug auf eine Infektion mit *S. pneumoniae* sind bislang nur unzureichend untersucht. Dabei gehören die Pneumokokken zu einer der häufigsten Todesursache weltweit und stellen unter den Infektionskrankheiten die weltweit häufigste Todesursache dar (Abb. 1.01). Untersuchungen zu Mechanismen der Immunabwehr und dessen Regulation durch konservierte Strukturen des angeboren Immunsystems könnten zur Verbesserung der Behandlung von Infektionskrankheiten, wie der Pneumokokken-induzierten Pneumonie, beitragen und neue Therapieansätze ermöglichen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Immunproteine PGLYRP2 und PGLYRP4 auf den Verlauf der Pneumokokken-induzierten Pneumonie untersucht.

PGLYRP2 ist für seine Eigenschaft als PGN-hydrolysierende Amidase und für antibakterielle Eigenschaften gegen mehrere Pathogene bekannt [92,94,104]. Zusätzlich vermögen zumindest die PGN-Amidasen von Insekten die Immunerkennung von PGN zu verändern [90]. Daher wurden verschiedene primäre Zellen von BALB/c Wildtyp (WT) Mäusen isoliert und die Genexpression von PGLYRP2 analysiert, sowie mögliche antibakterielle Eigenschaften *in vitro* untersucht. Des Weiteren wurde mit WT und PGLYRP2-KO Mäusen im *in vivo* Infektionsmodell die Bakterienbelastung in Lunge, Milz und Blut, die approximative Sterblichkeit, die Zytokinspiegel in Blut und Lunge, die Zellrekrutierung in der Lunge, sowie das Darmmikrobiom in uninfizierten und infizierten PGLYRP2-KO Tiere mit WT Tieren analysiert. Dadurch sollten mögliche direkte oder indirekte antibakterielle oder immunmodulatorische Eigenschaften des PGLYRP2 untersucht werden.

Das PGLYRP4 ist vor allem für seine direkten, antibakteriellen Eigenschaften, sowie für eine Beeinflussung des Darmmikrobioms und entzündliche Prozesse bekannt [93,103,111,114]. Durch Versuche in einem transnasalen in vivo Infektionsmodell mit WT und PGLYRP4-KO Mäusen sollte der Einfluss des PGLYRP4 in Hinblick auf die Bakterienbelastung in der Lunge, Milz und im Blut untersucht werden. Zusätzlich wurden histologische Untersuchungen der Lunge, die Zellrekrutierung in die Lunge, sowie das Darmmikrobiom in uninfizierten und mit S. pneumoniae infizierten PGLYRP4-KO Tiere im Vergleich mit WT Tieren untersucht. Dadurch sollte z. B. eine Beeinflussung von entzündlichen Prozessen und

immunmodulatorische Eigenschaften analysiert werden. Darüber hinaus wurde durch *in vitro*-Untersuchungen die Genexpression von PGLYRP4 und weiterer relevanter Gene, wie z. B. *Tight Junction* Proteine und Komplementfaktoren, analysiert. Dadurch sollten mögliche, durch den PGLYRP4-KO beeinflusste Zelltypen und Veränderungen von z. B. der Barrierefunktion der Lunge adressiert werden. Durch die Untersuchung von PMN von WT und PGLYRP4-KO Mäusen sollten Unterschiede in der Eliminierung von Pneumokokken durch diese Phagozyten geklärt werden. Zusätzlich wurde der Einfluss der Mikrobiota auf den Verlauf der Pneumokokken-induzierten Pneumonie durch eine Übertragung auf keimfreie BALB/c WT Mäuse untersucht.

2.2 Vorarbeiten

Diese Arbeit baut auf den Daten einer Dissertation aus der Arbeitsgruppe zum Thema PGLYRP4-KO Mäuse in der Pneumokokkenpneumonie von A. Shrivastav auf [139]. Daher gibt es in einzelnen Bereichen Überschneidungen zwischen diesen Arbeiten. Zudem wurden, für einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn, Daten aus der vorangegangenen Arbeit erweitert bzw. Versuche neu durchgeführt oder mit neuen Parametern neu analysiert und ausgewertet. Des Weiteren wurden Daten zum PGLYRP2-KO Thema von U. Behrendt erhoben. Zur besseren Lesbarkeit wurden diese Daten im entsprechenden Teil der Ergebnisse eingearbeitet. Alle Daten wurden mindestens statistisch und graphisch neu ausgewertet und in den entsprechenden Abschnitten kenntlich gemacht. Dies betrifft im Einzelnen die Abbildung 5.02 (U. Behrendt), 5.11 und 5.19 (A. Shrivastav).

3 Materialien

Materialen wie Pipettenspitzen, Spritzenfilter und Zentrifugenröhrchen wurden im Generellen von Sarstedt (Nümbrecht, DE), BioZym (Hessisch Oldendorf, DE), B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE), Thermo Scientific (Braunschweig, DE) oder Corning (New York, NY, US) bezogen. Neben standardmäßigen Geräten wie Pipetten und Pipettierhilfen, Sterilwerkbänken, Inkubatoren, Wasserbädern, Heiz- und Rührgeräten, Zentrifugen und Vortex-Mischern wurden die in Tabelle 3.01 aufgeführten Geräte und Instrumente verwendet:

Gerät	Hersteller
7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
ECIS Modell 1600R	Applied Biophysics (Troy, NY, US)
FastPrep-24	MP Biomedicals (Santa Ana, CA, US)
FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices (Biberach, DE)
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad (München, DE)
NanoDrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Scientific (Braunschweig, DE)
Odyssey Infrared Imager	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE)
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research (Watertown, MA, US)
BAT-12 Microprobe Thermometer	Physitemp Instruments Inc. (Clifton, JN, US)
RET-3 rectal probe for mice	Bioseb (Vitrolles, FR)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, DE)
DynaMag 2	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)

	Tab. 3.01:	Geräte und	Instrumente	mit	Hersteller.
--	------------	------------	-------------	-----	-------------

Die zur Auswertung und Steuerung verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 3.02 aufgelistet:

Tab. 3.02: Computerprogramme zur Auswertung und Steuerung von Geräten undInstrumenten mit Hersteller.

Programm	Hersteller
ECIS Software v1.2	Applied Biophysics (Troy, NY, US)
FlowJo V10	FlowJo, LLC (Ashland, OR, US)
Image Studio Software v5.2	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE)
Prism 6	GraphPad software (San Diego, CA, US)
SDS v1.4.1	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
SoftMax Pro 6	Molecular Devices (Biberach, DE)

In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.03 aufgeführt:

Material	Bestellnummer	Hersteller
8W10 PET ECIS Slides	72010	Ibidi (München, DE)
Amersham Protran Premium 0,45 μm NC	10600003	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Columbia Agar-Platten mit 5% Schafsblut	254071	BD (Heidelberg, DE)
Kanüle, stumpf (0,8 x 22 mm / 21 x 7/8")	9180109	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
K-EDTA Blutröhrchen	20.1341	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Lysing matrix tube type D	6913-100	MP Biomedicals (Santa Ana, CA, US)
MACS pre-separation filter	130-041-407	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
MACS separation columns	130-042-201 (MS), 130-042- 401 (LS)	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
MicroAMP optical 96-well reaction plate	N8010560	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
MicroAMP optical adhesive film	4306311	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
Petrischalen	351029	Corning (New York, NY, US)
Spritzen 1 ml Omnifix®-F	9161406V	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Sterile und DNA-freie		
Reaktionsröhrchen Biosphere® SafeSeal Tube 1.5 ml	72.706.200	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Whatman gel blotting paper	3030-917	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)

Tab. 3.03: Verbrauchsmaterialen mit Bestellnummer und Hersteller.

In Tabelle 3.04 und 3.05 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet:

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	1067901	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Agarose LE	840004	BioZym (Hessisch Oldendorf, DE)
Ammoniumchlorid	9718	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Ammoniumpersulfat (APS)	EC-504	National Diagnostics (Atlanta, GA, US)
Bovines Serum Albumin (BSA)	A3059	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Bromphenolblau	17-1329-01	Pharmacia Biotech AB (Uppsala, SE)
Calciumchlorid	1.02083.0250	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Chloroform	1.02431.1000	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Coomassie-Brillant-Blau R-250	13-7920	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	D5758	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
DMEM	41965-039	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
dNTP	U1240	Promega (Mannheim, DE)
Ethylendiamintetraessigsäure di-natriumsalz-dihydrat (Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O)	1.12029.1000	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Essigsäure (100%)	3738.2	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol	10730322	Fisher Scientific (Schwerte, DE)
Ethidiumbromid	15585011	Invitrogen (Carlsbad, CA, US)
FBS Gold	A15-151	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Formaldehyd 30%, Methanol- frei	4235	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
GlutaMAX (L-Glutamin)	35050-038	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
Glycerol (>99,5%)	G9012	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Glycerol (89%)	104094	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Glycin	23390.03	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Salzlösung nach Hanks (HBSS)	9117.1	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Hefeextrakt	288620	BD (Heidelberg, DE)
HEPES-Puffer (1M)	15630-056	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
Isopropanol	CP41.3	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kaliumhydrogencarbonat	1.04854.0500	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Kupfersulfat-pentahydrat	C8027	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, UA)
UltraPure LMP Agarose	16520-050	Invitrogen (Carlsbad, CA, US)
Methanol	141091.1212	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)
Natriumchlorid	9265.2	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Tab. 3.04: Chemikalien mit Bestellnummer und Hersteller.

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20765.03	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Natriumhydroxid (NaOH)	1.06498.1000	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
N,N,N',N'-Tetramethylethan- 1,2-diamin (TEMED)	35925.01	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, DE)
Odyssey Blocking Buffer (PBS)	927-40000	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, DE)
Paraformaldehyd (PFA)	15127	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	14190-094	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
RPMI 1640	21875-034	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
Salzsäure (37%)	9277.1	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Schwefelsäure (96%)	9316.1	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Todd-Hewitt-Bouillon	249240	BD (Heidelberg, GER)
Tris Base (Trizma)	T6066	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Zinksulfat-heptahydrat	Z0251	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)

Tab. 3.05: Fortsetzung von Tab. 3.4

In dieser Arbeit verwendetet Arzneimittel sind in Tabelle 3.06 aufgeführt:

Substanz	PZN oder Zul Nr.	Hersteller
Ampuwa Spüllösung	PZN-4801694	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, DE)
Heparin	PZN-03862340 ZulNr.: 6391377.00.00	Rotexmedica GmbH (Trittau, DE)
NaCl Lösung (0,9%)	PZN-06605514 ZulNr.: 6948822.00.00	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, DE)
Ketamin (Ketavet, 100 mg/ml)	ZulNr.: 9089.01.00	Bela-pharm GmbH & Co. KG (Vechte, DE)
Thilo-Tears® Gel Augensalbe	PZN-03549324 ZulNr.: 9011.00.00	Alcon Pharma GmbH (Freiburg, DE)
Xylazin (Xylavet, 20 mg/ml)	ZulNr.: 401510.00.00	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (Burgdorf, DE)

Tab. 3.06: Arzneimittel mit Pharmareferenz- oder Zulassungsnummer und Hersteller.

PZN: Pharmareferenznummer, Zul.-Nr.: Zulassungsnummer

In Tabelle 3.07 sind in dieser Arbeit genutzte Proteine und Enzyme aufgelistet:

Substanz	Bestellnummer	Hersteller
Collagenase A	10103578001	Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
Complete Mini Tabletten	4693116001	Hoffmann-La Roche AG (Basel, CH)
Dispase	351235	Corning Life Sciences B.V. (Amsterdam, NL)
DNase I	A3778,0500	AppliChem GmbH (Darmstadt, GER)
Fibronektin	F2006	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Hyaluronidase	F3506	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Proteinase K	P6556	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)
Rekombinantes MALP-2	ALX-162-027	Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY, US)
rPGLYRP2, murin	Kundenauftrag	Invigate GmbH (Jena, DE)
rPGLYRP4, murin	Kundenauftrag	Invigate GmbH (Jena, DE)

 Tab. 3.07: Proteine und Enzyme mit Bestellnummer und Hersteller.

In dieser Arbeit genutzte Antibiotika sind in Tabelle 3.08 aufgelistet:

Tab. 3.08: Verwendete Antibiotika mit Angabe der Bestellnummer und des Herstelle	ers.
--	------

Material	Bestellnummer	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	A2212	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
Gentamycin	G1397	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US)

Verwendete Größenstandards sind in Tabelle 3.09 aufgeführt:

Tab. 3.09: Größenstandards für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) undWestern Blot Analyse mit Bestellnummer und Hersteller.

Material	Bestellnr.	Hersteller
Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards	1610375	Bio-Rad (München, DE)

Kommerzielle Kits, sowie fertige Reagenzien sind in Tabelle 3.10 aufgeführt:

Material	Bestellnr.	Hersteller
Anti-Ly-6G MicroBead Kit, mouse	130-092-332	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, DE)
Bio-Rad Protein Assay	500-0006	Bio-Rad (München, DE)
Direct-zol RNA MicroPrep	R2062	Zymo Research (Irvine, CA, US)
Direct-zol RNA MiniPrep	R2052	Zymo Research (Irvine, CA, US)
DreamTaq DNA Polymerase	EP0702	Thermo Scientific (Braunschweig, GER)
DreamTaq Green Buffer	B71	Thermo Scientific (Braunschweig, GER)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Applied Biosystems (Darmstadt, DE)
MagniSort Streptavidin Negative Selection Beads	MSNB- 6002-74	eBioscience (Frankfurt am Main, DE)
PeqGold TriFast	30-2010	VWR International (Erlangen, DE)
ProcartaPlex Multiplex Immunoassay, Mix&Match, Mouse	PPX-06	Invitrogen (Carlsbad, CA, US)
TaqMan Gene Expression Master Mix	4369016	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)
TaqMan PreAmp Master Mix Kit	4488593	Life Technologies (Carlsbad, CA, US)

Tab. 3.10: Kommerzielle Kits und gebrauchsfertige Reagenzien mit Bestellnummer und Hersteller.

Die in Tabelle 3.11 aufgeführten Bakterienstämme wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. S. Hammerschmidt (Universität Greifswald, Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung) zur Verfügung gestellt:

Tab. 3.11: Verwendete Bakterienstämme.

Ziel

S. pneumoniae serotype 2, D39, NCTC 7466	
S. pneumoniae serotype 2, D39∆Cps	

S. pneumoniae serotype 3, A66, NCTC 7978

Antikörper für die Durchflusszytometrie, Western Blot Analyse oder Zellisolierung, sind in Tabelle 3.12 aufgelistet:

Antigen	Klon	Konjugat	Anwendung	Bestellnr.	Hersteller
Aktin	Polyklonal	Unkonjugiert	WB	sc-1616	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, US)
CD3ε	145-2C11	PE	FACS	100307	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD4	GK1.5	PE/Cy7	FACS	100422	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD8a	53-6.7	APC	FACS	100712	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD11b	M1/70.15	PE/ Texas Red	FACS	RM2817	Invitrogen (Carlsbad, CA, US)
CD11c	N418	PE/Cy7	FACS	117318	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD16/ CD32	2.4G2	Biotin	AEC	553143	BD (Heidelberg, DE)
CD19	6D5	PerCP/ Cy5.5	FACS	115534	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD31	MEC 13.3	Biotin	AEC	553371	BD (Heidelberg, DE)
CD45	30-F11	Biotin	AEC	553078	BD (Heidelberg, DE)
CD45	30-F11	APC/ Cy7	FACS	103116	BioLegend (San Diego, CA, US)
CD49b	DX5	Pacific Blue	FACS	108918	BioLegend (San Diego, CA, US)
Goat IgG	Polyklonal	IRDye800	WB	605-732- 125	Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA, US)
Gr-1	RB6-8C5	APC	FACS	108412	BioLegend (San Diego, CA, US)
I-A/I-E	M5/114.15.2	FITC	FACS	107606	BioLegend (San Diego, CA, US)
ΙκΒα	44D4	Unkonjugiert	WB	4812S	Cell Signaling (Danvers, MA, US)
Rabbit IgG	Polyklonal	Cy5.5	WB	611-113- 122	Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA, US)
Siglec-F	E50-2440	PE	FACS	552126	BD (Heidelberg, DE)
ΤCR γ/δ	GL3	FITC	FACS	118106	BioLegend (San Diego, CA, US)

Tab. 3.12: Antikörper mit Antigen, Konjugat, Anwendungsbereich, Bestellnummer und Hersteller.

FACS: Durchflusszytometrie, AEC: Zellisolation der AEC, WB: Western Blot

Die Oligonukleotide für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) sind in Tabelle 3.13 aufgelistet und wurden von Life Technologies (Carlsbad, CA, US) bezogen.

Gen	Bestellnummer
С3	Mm01232779_m1
Cdh1	Mm01247357_m1
Cldn18	Mm00517321_m1
F11r	Mm00554113_m1
Gapdh	Mm99999915_g1
Ifng	Mm01168134_m1
Ifngr1	Mm00599890_m1
Pglyrp2	Mm01348077_m1
Pglyrp4	Mm01220032_m1

Tab. 3.13: Oligonukleotide für die qPCR mit Gennamen und Bestellnummer.

Die Verwendeten Medien, Puffer und Lösungen für die Versuche sind in den Tabellen 3.14 bis 3.20 aufgelistet und nach Verwendung in der Bakterienkultur (Tab. 3.14), für *in vivo* Versuche (Tab. 3.15), die Zellisolation (Tab. 3.16 und 3.17), PCR (Tab. 3.18), bzw. SDS-PAGE und Western Blot Analyse (Tab. 3.19 und 3.20) aufgeteilt.

Gemisch	Me	enge	Substanz
CaCl ₂ Lösung	11,1 mg	1 M	CaCl ₂
	100 ml		ddH2O
CuSO ₄ Lösung	50 mg	2 M	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$
	100 ml		ddH2O
RPMI (+Zn/Ca/Cu)	94 ml		RPMI 1640
	105 mg	150 mM	NaCl
	294 µl	5 µM	ZnSO ₄ Lösung
	57,6 µl	1 mM	CaCl ₂ Lösung
	250 µl	5 µM	CuSO ₄ Lösung
	5 ml	5%	Glycerol
THY-Medium	30 g	3%	Todd-Hewitt-Bouillon
Autoklavieren (115 °C, 10 min)	5 g	0,5%	Hefeextrakt
	11		ddH ₂ O
ZnSO ₄ Lösung	49 mg	1,7 mM	$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$
	100 ml		ddH ₂ O

Tab. 3.14: Medien und Lösungen für die Bakterienkultur mit Substanz- und Mengenangaben.

Gemisch]	Menge	Substanz
Collagenase A (>0,75 U/ml)	20 ml		HBSS
(Lagerung: -20 °C)	100 mg	>0,75 U/ml	Collagenase A (>0,15 U/mg)
DNase I (10.000 U/ml)	1 ml		HBSS
(Lagerung: -20 °C)	3,3 mg	10 U/µ1	DNase I
Formaldehyd 4% (pH 7)	10 ml	4%	Formaldehyd 30%, Methanol-frei
	75 ml		ddH ₂ O
Heparin-Lösung	5 ml	12.500 I.E/ml	Heparin (25.000 I.E./ml)
(Lagerung: 4 °C)	5 ml		NaCl-Lösung (0,9%)
Narkosegemisch	2 ml	18,2 mg/ml	Ketamin
(Lagerung: 4 °C)	1 ml	1,82 mg/ml	Xylazin
	9 ml		NaCl-Lösung
PBS/Tween (0,05%)	50 µl	0,05%	Tween 20
	11		PBS
PFA, 4% (pH 7,4)	5 ml		PBS (10x)
(Lagerung: 4 °C)	2 g	4%	Paraformaldehyd (PFA)
	100 µl		NaOH (1 M)
	45 ml		ddH ₂ O
Proteinaseinhibitor	10 ml		HBSS
(Lagerung: -20 °C)	1 Tbl.		Complete Mini Tablette
Ulmer-Mix	3 ml	35,7 mg/ml	Ketamin
(Lagerung: 4 °C)	2,4 ml	5,7 mg/ml	Xylazin
	3 ml		NaCl-Lösung
Verdaupuffer	2,7 ml		RPMI 1640
(pro Lunge)	0,3 ml	8,6%	FBS
	0,5 ml	ca. 0,1 U/ml	Collagenase A (>0,75 U/ml)
	3,2 µl	ca. 10 U/ml	DNase I (10.000 U/ml in HBSS)

Tab. 3.15: Lösungen und Puffer für die in vivo Versuche mit Substanz- und Mengenangabe.

Gemisch	Me	enge	Substanz
AEC-	485 ml		DMEM
Infektionsmedium	10 ml	2%	FBS
(Lagerung: 4 °C)	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
AEC-	478 ml		DMEM
Isolationsmedium I	100 µl	100 U	DNase I (1 U/µl)
(Lagerung: 4 °C)	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
	5 ml	10/	Penicillin/Streptomycin
	5 1111	170	(100 µg/ml)
	12,5 ml	25 mM	HEPES-Lösung (1 M)
AEC-	428 ml		DMEM
Isolationsmedium II	50 ml	10%	FBS
(Lagerung: 4 °C)	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
	5 ml	1%	Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)
	12,5 ml	25 mM	HEPES-Lösung (1 M)
AEC-Puffer	100 ml		PBS
(Lagerung: 4 °C)	3 ml	3%	FBS
	372,24 mg	10 mM	Na ₂ -EDTA \cdot 2 H ₂ O
АМФ-	440 ml		RPMI 1640
Isolationsmedium	50 ml	12%	FBS
(Lagerung: 4 °C)	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
	5 ml	1%	Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)
BMMΦ-	375 ml		RPMI 1640
Kulturmedium	50 ml	10%	FBS
(Lagerung: 4 °C)	75 ml	15%	L929 Zellüberstand
	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
ΒΜΜΦ-	250 ml		RPMI 1640
Wachstumsmedium	100 ml	20%	FBS
(Lagerung: 4 °C)	150 ml	30%	L929 Zellüberstand
	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)
	5 ml	1%	Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)
DNase I (1 U/ul)	10 mg	1 U/µ1	DNase I
(Lagerung: -20 °C)	30 ml	•	PBS
Infektionsmedium I	485 ml		RPMI 1640
(Lagerung: 4 °C)	10 ml	2%	FBS
	5 ml	1%	L-Glutamin (4,5 mM)

Tab. 3.16: Benötigte Medien, Lösungen und Puffer für die Kultur und Isolierung von primären Zellen mit Substanz- und Mengenangaben.

Gemisch	Ν	lenge	Substanz
Lavage-Puffer	495 ml		PBS
(Lagerung: 4 °C)	372,24 mg	2 mM	Na_2 -EDTA · 2 H ₂ O
	5 ml	1%	Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml)
LM-Agar	0,5 g	1%	Low-melt (LM) Agar
(Lagerung: 4 °C)	ad 50 ml		PBS
MACS Puffer	0,5 g	0,5%	BSA
(Lagerung: 4 °C)	74,45 mg	2 mM	Na ₂ -EDTA \cdot 2 H ₂ O
	ad 100 ml		PBS
Narkose-Heparin-	2 ml	18,2 mg/ml	Ketamin
Gemisch	1 ml	1,82 mg/ml	Xylazin
(Lagerung: 4°C)	5,5 ml	12.500 I.E./ml	Heparin (25.000 I.E./ml)
	4,5 ml		NaCl-Lösung
PBS/EDTA	372,24 mg	2 mM	Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O
(Lagerung: 4 °C)	ad 500 ml		PBS
Triton X, 1%	100 µl	1%	Triton X-100
	ad 10 ml		PBS

Tab. 3.17: Fortsetzung von Tab. 3.16.

Tab. 3.18: Lösungen und Puffer für die Umschreibung und Amplifizierung von cDNA.

	······································				
TE-Puffer (pH 7,9)	121,1 mg	10 mM	Tris Base		
	37,2 mg	1 mM	Na ₂ -EDTA · 2 H ₂ O		
	ad 100 ml		DEPC-Wasser		
DEPC-Wasser	0,7 ml	0,1%	Diethylpyrocarbonat		
12autoklavieren (115 °C, 10 min)	ad 700 ml		ddH ₂ O		

Tab. 3.19: Benötigte Medien, Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit Substanz- und Mengenangaben.

Gemisch	Me	nge	Substanz
APS-Stocklösung	1 g	10%	Ammoniumpersulfat
(Lagerung: -20 °C)	ad 10 ml		ddH ₂ O
Blot-Puffer (10x)	15 g	125 mM	Tris Base
(Verwenden bei -20 °C)	72 g		Glycin
	ad 1 1		ddH ₂ O
Bromphenolblau (1%)	0,1 g	1%	Bromphenolblau
	ad 10 ml		ddH ₂ O

Gemisch	Me	nge	Substanz
Coomassie-Entfärber	200 ml	20%	Essigsäure (100%)
	800 ml		ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	1 g	0,1%	Coomassie-Brillant-Blau R-250
_	450 ml	45%	Methanol
	100 ml	10%	Essigsäure (100%)
	ad 1 1		ddH ₂ O
Lämmli-Puffer (5x)	3,2 ml		Tris-HCl (1 M, pH 6,8)
	1,5 g	15%	SDS
	100 mg	1%	Bromphenolblau
	3,5 ml	35%	Glycerol (98%)
	2,5 ml	25%	2-Mercaptoethanol
PAGE-Laufpuffer (5x)	15,15 g	125 mM	Tris Base
(Lagerung: 4 °C)	72,07 g	950 mM	Glycin
	5 g	0,5%	SDS
	ad 11		ddH ₂ O
PAGE-Probenpuffer (5x),	1,89 g	312,5 mM	Tris Base
nicht reduzierend	5 g	10%	SDS
(Lagerung: -20 °C)	25 ml	50%	Glycerol (89%)
	2,5 mg	0,005%	Bromphenolblau
	ad 50 ml		ddH ₂ O
Sammelgel	6 ml		ddH ₂ O
	2,5 ml		Sammelgel-Puffer
	100 µl	0,1%	SDS-Lösung (10%)
	1,33 ml	5%	Acrylamid/Bisacrylamid (40%)
	<u>50 µl</u>	0,05%	Ammoniumpersulfat (10%)
	10 µl	0,1%	TEMED
Sammelgel-Puffer (pH 6,8)	6 g	0,5 M	Tris Base
(Lagerung: 4 °C)	ad 100 ml		ddH ₂ O
SDS-Lösung	10 g	10%	SDS
	ad 100 ml		ddH ₂ O
Trenngel	4 ml		ddH ₂ O
	2,5 ml		Trenngel-Puffer
	100 µl	0,1%	SDS-Lösung (10%)
	3,35 ml	13,5%	Acrylamid/Bisacrylamid (40%)
	<u>50 µl</u>	0,05%	APS (10%)
	5 µl	0,05%	TEMED
Trenngel-Puffer (pH 8,8)	18,15 g	1,5 M	Tris Base
(Lagerung: 4 °C)	ad 100 ml		ddH ₂ O
Tris-HCl (pH 6,8)	1,2 g	1 M	Tris Base
	nach pH		HCl
	ad 10 ml		ddH ₂ O

Tab. 3.20: Fortsetzung von Tab. 3.19.

4 Methoden

4.1 Pneumokokkenstämme und -anzucht

In dieser Arbeit wurden insgesamt zwei verschiedene *S. pneumoniae*-Stämme verwendet. Für alle *in vivo* Versuche wurde der WT Serotyp 3 Stamm NCTC 7978 (A66) genutzt. Dieser zeichnet sich durch eine sehr dicke PSK aus und führt in der transnasalen Infektion hauptsächlich zu einer lokalen Pneumonie, die im späteren Verlauf eine Bakteriämie nach sich zieht [140]. Für die *in vitro* Versuche wurde der WT Serotyp 2 Stamm NCTC 7466 (D39) bzw. die unbekapselte Mutante D39 Δ Cps verwendet. Dieser Stamm hat eine weniger dicke PSK und ist daher für die *in vitro* Zellstimulation besser geeignet. Zudem konnte der D39 Stamm nicht für die *in vivo* Infektion verwendet werden, da dieser primär eine Bakteriämie verursacht und sich gleichmäßig im gesamten Körper ausbreitet [140].

Die Bakterien wurden auf Columbia Agar mit 5% Schafsblut angezüchtet (10-16 h, 37°C, 5% CO₂). Anschließend wurden einzelne Kolonien in THY-Medium (plus 10% FBS für A66) bis zu einer $OD_{600} = 0,04-0,06$ eingerührt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,02-0,4$) bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (2000 xg, 10 min) und in Zellkulturmedium (*in vitro* Versuche) bzw. sterilem PBS (*in vivo* Infektion) aufgenommen.

4.2 *In vivo* Experimente

Alle Arbeiten an und mit Tieren wurden in Übereinstimmung mit den Ethikrichtlinien der Charité – Universitätsmedizin Berlin und der *Federation of European Laboratory Animal Sciences Association* (FELASA) durchgeführt. Die Tierversuche waren durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin genehmigt (PGLYRP2-KO Versuche: G0220/13, PGLYRP4-KO Versuche: G0251/12, Vergesellschaftungsversuche: G0266/15).

4.2.1 Verwendete Mausstämme

Die initialen Zuchtpaare für die BALB/c WT, PGLYRP2-KO und PGLYRP4-KO Linien wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Roman Dziarski (Department of Microbiology and Immunology, Indiana University School of Medicine, Indiana, USA) und die initialen Zuchtpaare für die keimfreien BALB/c WT Tiere vom Institut für Versuchstierkunde und Zentrales Tierlaboratorium der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Die weitere Zucht erfolgte in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

4.2.2 Haltungsbedingungen

Die Versuchstierhaltung und -zucht wurde zentral durch die FEM durchgeführt. Die WT, PGLYRP2- und PGLYRP4-KO wurden unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in individuell-belüfteten Käfigen (*individual ventilated cages*, IVC) und die keimfreien BALB/c WT Tiere in Isolatoren gehalten. Für alle Tiere bestand ein 12 h Tag/Nacht Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einer Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und einer relativen Feuchtigkeit von $60 \pm 20\%$.

4.2.3 Vergesellschaftung

Für einen Teil der Versuche wurden weibliche SPF WT, PGLYRP4-KO und keimfreie WT Tiere in einem Alter von 3-4 Wochen aus der FEM abgerufen und SPF WT mit keimfeien WT, bzw. SPF PGLYRP4-KO mit keimfreien WT Tieren in der Tierhaltung der CharitéCrossOver (Lehr- und Forschungszentrum der medizinischen Fakultät, Campus Charité Mitte) vergesellschaftet. Dadurch sollten die Mikrobiota der SPF Tiere auf die keimfreien WT Tiere übertragen werden. Die Vergesellschaftung wurde immer in einem Verhältnis von 1:1 mit maximal sechs Mäusen pro Käfig für 5-6 Wochen durchgeführt. Das initiale Zusammensetzen der Tiere, sowie der wöchentliche Käfigtausch wurde unter einer UV-bestrahlten (30 min) Sterilwerkbank durchgeführt. Käfige, Wasserflaschen, Futter und Trinkwasser wurden autoklaviert und die Tiere nur mit sterilen Handschuhen angefasst.



Abb. 4.01: Schematische Darstellung des Vergesellschaftungs-Experimentes. Es wurden je 1-3 weibliche WT bzw. PGLYRP4-KO Tiere zusammen mit der gleichen Anzahl an weiblichen, keimfreien BALB/c WT Mäuse in einem Käfig zusammengesetzt. Die Tiere hatten zum Zeitpunkt des Zusammensetzens ein Alter von 3-4 Wochen und wurden für 5-6 Wochen vergesellschaftet. Im Anschluss wurden die Tiere entweder euthanasiert und die Proben für die Untersuchung des Mikrobioms der unbehandelten Tiere entnommen, oder die Tiere mit *S. pneumoniae* für 48 h infiziert und anschließend die Untersuchungen inkl. der Entnahme der Proben für die Mikrobiomanalyse entnommen.

4.2.4 Infektion mit S. pneumoniae und Monitoring

Für die transnasale Infektion mit *S. pneumoniae* bzw. der Vehikel-Kontrolle PBS wurden 8-12 Wochen alte Mäuse zunächst interperitoneal (i. p.) mit Ketamin und Xylazin (Ulmer-Mix) narkotisiert. Anschließend wurden diese mit dem Kopf nach oben hängend mit 20 µl der Bakteriensuspension oder sterilem PBS inokuliert. Die Infektionsdosis für die Experimente betrug 10⁵ Kolonien-bildende Einheiten (*colony forming units*, CFU) pro Maus bzw. im Versuch zum approximativen Überleben $5 \cdot 10^4$ CFU/Maus. Die Überwachung der Temperatur, des Gewichtes und äußerer Anzeichen der Erkrankung und des Unwohlseins wurden vor der Infektion, sowie alle 12 h danach durchgeführt. Bei Erreichen des geplanten Versuchsendes oder beim Erreichen der vorher festgelegten Abbruchkriterien wurden die Tiere durch i. p. Injektion mit Ketamin und Xylazin (Narkosegemisch) narkotisiert und anschließend durch das Durchtrennen der *Vena cava* oder durch zervikale Dislokation erlöst. Die Abbruchkriterien wurden definiert als: (i) Verlust von $\geq 25\%$ Körpergewicht, (ii) schwerfällige, pumpende Atmung oder (iii) beschleunigte Atmung in Kombination von Schmerz oder Torkeln.

4.2.5 CFU Bestimmung

Die Bakterienbelastung wurde im Homogenat der Lungen und Milzen, im Blut, bzw. im Zellkulturmedium bestimmt. Dafür wurden die Lungen und Milzen mit 5 ml PBS durch Zellsiebe (100 μ m) gedrückt und das Blut in K-EDTA Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Proben in mehreren Verdünnungsstufen auf Columbia Agar mit 5% Schafsblut ausgestrichen. Die Kolonien wurden nach 16-24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank manuell ausgezählt.

4.2.6 Durchflusszytometrische Zellanalyse

Für die Analyse der Zellpopulationen in den Lungen von WT und PGLYRP2-KO Mäusen wurden die Tiere narkotisiert und über die *Vena cava* endblutet. Anschließend wurden die Lungen über das Herz mit HBSS perfundiert und in Verdaupuffer mit einem Skalpell zerkleinert und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Zur Homogenisierung wurden die Lungen 3-mal mit einer Spritze mit $1^{1/2}$ " Kanüle aufgezogen und durch ein 70 µm Zellsieb gegeben. Das Lungenhomogenat wurde 2-mal mit 50 ml HBSS gewaschen und zentrifugiert (500 xg, 7 min, 4 °C) und in 300 µl HBSS mit 10% Mausserum suspendiert. Nach der Inkubation (15 min, 4 °C) wurden die Zellen zur Detektion von T γδ und NK Zellen mit Antikörpern gegen CD3ε, CD4, CD8a, CD19, CD45, CD49b und TCR γ/δ, oder zur Detektion von PMN, AMΦ, DC mit Antikörpern gegen CD11b, CD11c, CD45, CD49b, Gr-1, I-A/I-E und Siglec-F gefärbt. Im Anschluss an die Inkubation (30 min, 4 °C, im Dunkeln) wurden die Zellen mit 1 ml HBSS gewaschen und zentrifugiert (500 xg, 7 min, 4 °C).

Parallel wurde ein Teil der Zellen für die absolute Zellzahlbestimmung vorbereitet. Hierfür wurden 100 µl der Zellsuspension mit 100 µl anti-CD45-APC (1:100 in HBSS) gefärbt (1 h, RT, im Dunkeln). Die Zellen wurden mit PFA (Endkonzentration 2%, 15 min, RT, im Dunkeln) fixiert, mit 1 ml HBSS gewaschen, zentrifugiert (500 xg, 7 min, 4 °C) und auf 1,5 ml (Zellpopulationsanalyse) bzw. 500 µl (quantitative Zellzahlbestimmung mit TruCount Beads, BD, Heidelberg, DE) suspendiert. Die durchflusszytometische Messung der Proben erfolgte in Kooperation mit Dr. N. Baal (Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen) an einem FACS ARIA III Durchflusszytometer mit einem Minimum an 100.000 aufgenommenen Ereignissen je Probe. Die Zellpopulationen wurden nach Tab. 4.01 zugeordnet.

Zellen	Marker
Leukozyten	CD45 ⁺
PMN	CD45 ⁺ , Gr-1 ^{high} , CD11b ^{high}
ΑΜΦ	CD45 ⁺ , CD11c ^{high} , Siglec-F ^{high}
DC	CD45 ⁺ , CD11c ^{high} , Siglec-F ^{-/low} , CD49b ⁻ , I-A/I-E ^{high/int}
T γδ Zellen	$CD45^+$, $CD3\epsilon^+$, $CD4^-$, $CD8a^-$, $TCR \gamma/\delta^+$
NK Zellen	$CD45^+$, $CD3\epsilon^+$, $CD49b^+$, $CD19^-$

 Tab. 4.01: Definition der Zellpopulation nach Markerexpression.

4.2.7 Mikrobiom im Caecum

Probenentnahme – Die Entnahme der *Caeca* wurde mit separatem Präparationsbesteck durchgeführt. Dieses wurde mit ddH₂O gereinigt und in 70% Ethanol desinfiziert. Die *Caecum*-Proben wurden in sterilen, Biosphere[®] plus Reaktionsgefäßen gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Analyse des Mikrobioms in Kooperation mit PD Dr. T. Hain (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen).

DNA-Isolierung – Die DNA aus je 150 mg *Caecum*, sowie entsprechende Negativkontrollen mit dem DNeasy PowerLyzer PowerSoil Kit (QIAGEN, Hilden, DE) wurden nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden die Proben zunächst mit 750 μ l bead-Lösung und 60 μ l C1-Lösung gemischt und inkubiert (10 min, 70 °C) und anschließend mechanisch mit einem FastPrep-24 Homogenisator lysiert (MP, 6,5 m/s, 45 s). Anschließend wurden die Proben nach Herstellerangaben gereinigt, mit 100 μ l C6-Lösung eluiert, zentrifugiert (10.000 xg, 1 min) und mit UV Licht bestrahlt (30 min).

Bibliothekserstellung – Für die Erstellung der DNA-Bibliothek wurde die variable Region V4 des mikrobiellen 16S Genes mit dem Platinum SuperFi PCR Master Mix (Invitrogen) amplifiziert. Hierfür wurden 10 μ l DNA (max. 2 ng/ μ l) und je 1,25 μ l (10 pmol) der Vorwärtsund Rückwertsoligonukleotide [141] verwendet und die PCR nach dem Programm in Tab. 4.02 durchgeführt.

_	_	Temperatur [°C]	Zeit
Enzymaktivierung / 1. Denaturierung		98	2 min
Denaturierung		98	10 s
Anlagerung	25 Zyklen	55	10 s
Expansion		72	30 s
Finale Expansion		72	5 min
Kühlung		4	00

Tab. 4.02: PCR Programm zur Generierung der DNA-Bibliothek

Im Anschluss an die PCR wurde die Größe der Amplifikate auf einem 1% Agarose-Gel bestätigt und die DNA mit dem AMPure XP DNA beads (Beckman Coulter, Brea, CA, US) gereinigt. *Probenvorbereitung und Sequenzierung* – Für die Sequenzierung wurden die Amplifikate mit dem Nextera XT Index Kit V2 Set A und B (Illumina, San Diego, CA, US) mit Barcodes und Adaptern versehen um ein vermischen der Proben zu ermöglichen. Die PCR Bedingungen sind an Tabelle 4.03 angegeben.

Tab. 4.03: PCR Programm für die Adapter- und Barcode-Ligation

		Temperatur [°C]	Zeit
Enzymaktivierung / 1. Denaturierung		95	3 min
Denaturierung		95	30 s
Anlagerung	8 Zyklen	55	30 s
Expansion		72	30 s
Finale Expansion		72	5 min
Kühlung		4	∞

Anschließend wurden die Proben erneut mit dem AMPure XP DNA beads (Beckman Coulter) gereinigt, sowie einer Qualitätskontrolle mit dem 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US) und einer DNA-Quantifizierung mit dem Qubit Gerät (Thermo Fisher) unterzogen. Die Proben wurden auf 2 nM verdünnt, miteinander vermischt und mit 15% PhiX Genombibliothek zur Qualitätskontrolle versetzt. Anschließend wurde die Sequenzierung, vom 3' und vom 5' Ende der DNA-Amplifikate (*paired-end*), auf einem MiSeq Illumina System mit dem MiSeq Reagent Kit v2 (500-cycles) durchgeführt. Die sequenzierten Amplifikate hatten eine Größe von 292 Basenpaare und resultierten in je Probe 2x 250 Basenpaare langen Sequenzen.

Bioinformatische Auswertung – Die Auswertung erfolgte mit der MiSeq Software v2.6 und dem Programm Mothur v.1.36.1 [142,143]. Mithilfe der Barcodes wurden die Sequenzierungsergebnisse den einzelnen Proben zugeordnet, die Oligonukleotidsequenzen entfernt und die 3' und 5' Sequenzen der Amplifikate gepaart. Die Amplifikate wurden nach der erwarteten Länge gefiltert, mehrdeutige Nukleotidzuordnungen und Homopolymere (>8 Nukleotide) wurden entfernt. Identische Sequenzen wurden kombiniert und mit den Daten in der SILVA-Referenzdatenbank verglichen [144]. Nukleotide außerhalb der erwarteten Zuordnungsregionen wurden beschnitten und chimäre Sequenzzuordnungen entfernt. Anschließend wurden die Ergebnisse taxonomisch zugeordnet und nicht-bakterielle Ergebnisse entfernt. Die operativen taxonomischen Einheiten (*operational taxonomic units*, OTU) wurden mit 15.000 zugeordneten Sequenzen pro Probe und einer Probenteilung mit 1.000 Wiederholungen ermittelt und durch die *cluster split* Methode in Mothur zugeordnet. Für die Darstellung der β-Diversität in der multidimensionalen Skalierung (*principal coordinates analysis*, PCoA) wurde die thetaYC Funktion in Mothur verwendet und die gewichtete UniFrac Werte angegeben [145,146].

4.2.8 Histologie und Immunhistochemie

Für die Entnahme der Lungen zur histologischen Untersuchung wurden die infizierten WT und PGLYRP4-KO Mäuse (*S. pneumoniae*, $5 \cdot 10^5$ CFU) 48 h nach der Infektion (*hours post infection*, hpi) narkotisiert. Den Tieren wurden 100 µl Heparin-Lösung in die *Vena cava* injiziert und kurz danach endblutet. Um den Kollaps der Lungen zu verhindern, wurde die Trachea freigelegt und abgebunden. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, die Lungen vorsichtig entnommen und in 4% Formaldehyd für bis zu 48 h immersions-fixiert. Die histologischen Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. A. Gruber, Ph.D. (Institut für Tierpathologie, Freien Universität Berlin) durchgeführt. Dort wurden die Lungen in Paraffin eingebettet und 2 µm dünne Schnitte erstellt. Anschließend wurde das Paraffin mit Xylene entfernt und das Gewebe mit Hilfe von Ethanol-Wassergemischen rehydriert, wobei der Wasseranteil schrittweise erhöht wurde. Für die histologische Begutachtung wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Die immunhistochemische (*immunohistochemistry*, IHC) Analyse der Zellpopulationen erfolgte mit den Antikörpern aus Tabelle 4.04 [147].

Ziel	Zellen	Bestellnr.	Hersteller
CD68	Makrophagen/Monozyten	ab125212	Abcam (Cambridge, UK)
CD45R	B-Zellen	RA3-6B2	BD (Heidelberg, DE)
CD3	T-Zellen	A 452	DAKO (Glostrup, DK)
NE	Neutrophile Granulozyten	ab68672	Abcam (Cambridge, UK)

Tab. 4.04: Antikörper für die immunhistochemische Analyse mit erkanntem Ziel, durch die positive Färbung detektierte Zellen, Bestellnummer und Hersteller.

Anschließend wurden die IHC-Schnitte wieder mit steigenden Konzentrationen an Ethanol dehydriert, in Xylene gewaschen. Die histologischen HE-Schnitte wurden durch erfahrene Veterinärpathologen begutachtet. Zusätzlich wurden die HE-Schnitte, sowie die IHC-Schnitte mit einem Aperio CS2 Pathologie Scanner (Leica Biosystems Imaging Inc., Vista, CA, US) digitalisiert. Die absolute Zellzahl, sowie die Anzahl durch IHC gefärbter Zellen wurden mit dem Aperio V9 nc Algorithmus und die betroffene, entzündete Lungenfläche wurde mit einem angepassten Aperio GENIE Histologie Mustererkennungsalgorithmus (beides Leica Biosystems Imaging Inc.) analysiert [147]

4.2.9 Zytokinmessung

Die Lungen von PBS-behandelten und mit *S. pneumoniae* infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen wurden 48 hpi entnommen und in Proteaseinhibitor in einem FastPrep-24 Gerät homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat zentrifugiert (14.000 xg, 10 min, 4 °C) und der Überstand für die Zytokinbestimmung verwendet. Das Blut wurde in K-EDTA Röhrchen aus der *vena cava* entnommen, zentrifugiert (1.300 xg, 10min, 4 °C) und das Blutplasma für die Zytokinbestimmung verwendet. Die Analyse erfolgte mit dem ProcartaPlex Multiplex System mit den Zytokinen IL-6, KC (Maus-Homolog des humanen IL-8), IFN- γ und TNF- α nach Herstellerangaben.

4.2.10 IKBa Proteindetektion durch Western Blot

Für die Analyse der relativen Proteinkonzentration in den Lungen von uninfizierten und mit *S. pneumoniae* infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen wurden die Lungenhomogenate aus der CFU Bestimmung verwendet. Die Proteinmenge in den Proben wurde über die Bradford-Methode (Bio-Rad Protein Assay) photometrisch ermittelt. Hierfür wurden 5 µl Probe mit 995 µl fertigem Bradford-Reagenz vermisch und nach 5 min im Photometer bei OD₅₉₅ gemessen. Die Kalkulation der Proteinmenge erfolgte zu einer Albumin-Standardkurve. Als nächstes wurden die Proben mit Lämmli-Puffer gemischt (1:5, 4 °C) und inkubiert (95 °C,

5 min, 750 rpm). Die Proben wurden in die Taschen eines 13,5% SDS-PAGE Gels gegeben und über Elektrophorese getrennt (100 V, 15 min, dann 120 V, 1,5 h). Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (100 V, 1 h, 4 °C) und die freien Bindungsstellen der Membran mit Odyssey Blocking Buffer (PBS) blockiert (über Nacht, 4 °C). Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem primären Antikörper gegen den NF- κ B Inhibitor alpha (I κ B α) inkubiert (rabbit anti-I κ B α , 1:4.000, über Nacht, 4 °C). Nach 3-maligem waschen der Membran mit PBS/Tween wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper inkubiert (anti-rabbit-Cy5.5, 1:2.000, 1 h, RT), 3-mal mit PBS gewaschen und die Banden am Odyssey Infrared Imager detektiert. Zur relativen Quantifizierung wurde im Anschluss mit goat anti-Aktin inkubiert (1:1.000, 1,5 h, RT), 3-mal mit PBS/Tween gewaschen, mit sekundärem Antiköper inkubiert (anti-goat-IRDye800, 1:2.000, 1 h, RT), erneut 1-mal mit PBS/Tween und 2-mal mit PBS gewaschen und die Banden am Odyssey Infrared Imager detektiert. Für die relative Quantifizierung von I κ B α wurde, mit Hilfe der Image Studio Software v5.2, der Quotient aus der I κ B α zur Aktin Bande gebildet.

4.3 *In vitro* Versuche

4.3.1 Antibakterieller Assay mit rPGLYRP2

Die Stämme D39 und D39 Δ Cps wurden wie oben beschrieben vorbereitet und in RPMI (+Zn/Ca/Cu) suspendiert. Anschließend wurden 50 µl der 5 · 10⁴ CFU/ml Bakteriensuspension in Mikrotiterplatten gegeben und entweder mit 90 µg/ml rPGLYRP2, 10 µg/ml Gentamycin oder Medium für 0 h, 6 h und 24 h inkubiert (37°C 5% CO₂). Anschließend wurde die verbliebende Menge an Bakterien wie unter "CFU Bestimmung" ermittelt.

4.3.2 Isolierung von Primärzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen entstammten unbehandelten BALB/c WT Mäusen, welche unter Ketamin und Xylazin Narkose über die V*ena cava* endblutet wurden. Für die Isolierung von AEC wurde dem Narkosegemisch Heparin beigefügt. Alle Zellinfektionen wurden mit D39 und einer Multiplizität der Infektion (*multiplicity of infection*, MOI) von 1 für 6 h durchgeführt.

Alveolarmakrophagen – Zur Isolierung der AMΦ wurde ein Luftröhrenschnitt kurz unterhalb des Kehlkopfes durchgeführt und eine stumpfe Kanüle eingeführt. Über diese wurden die Lungen anschließend lavagiert (10-mal 500 µl Lavage-Puffer) und die Flüssigkeit zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden in AMΦ-Isolationsmedium suspendiert und in Zellkulturplatten ausgesät. Nach 2 h wurde das Medium gewechselt um nicht-adhärente Zellen zu entfernen. Das Medium wurde ca. 2 h vor der Infektion auf Infektionsmedium I umgestellt.

Alveolarepithelzellen – Für die Isolierung von AEC wurde, wie für die AM Φ , eine stumpfe Kanüle in die Luftröhre eingeführt. Über diese wurden ca. 2 ml Dispase und 0,5 ml LM-Agar appliziert. Nach einer kurzen Inkubation (6 min, 37 °C) wurden die Lungen mit Hilfe zweier Pinzetten in 10 ml AEC-Isolationsmedium I zerkleinert und durch Zellsiebe (100 und 70 µm) gegeben. Die Zellsuspension wurde auf 30 ml mit AEC-Isolationsmedium II aufgefüllt, zentrifugiert (200 xg, 10 min, 4 °C) und in 1 ml AEC-Puffer aufgenommen. Die Zellzahl wurde bestimmt, die Suspension zentrifugiert (200 xg, 10 min, 4 °C) und in 100 µl AEC-Puffer je 1 · 10⁷ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden biotinylierter anti-CD45, anti-CD16/CD32 und anti-CD31 Antikörper (1:10) hinzugegeben und inkubiert (15 min, RT). Nach dem Waschen mit 5 ml AEC-Puffer wurden die Zellen wieder in der ursprünglichen Menge an AEC-Puffer aufgenommen und MagniSort Streptavidin Negative Selection Beads (1:10) hinzugegeben und inkubiert (5 min, RT). Die Suspension wurde auf 2,5 ml mit Puffer aufgefüllt und für 5 min am Magneten inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen zentrifugiert (200 xg, 10 min, 4 °C) und die AEC in AEC-Isolationsmedium II aufgenommen. Nach der Inkubation in Zellkulturplatten (über Nacht, 37°C, 5% CO₂) wurden die Zellen 2 h vor dem Experiment mit PBS gewaschen und das das AEC-Infektionsmedium umgestellt.

Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark – Die Isolierung von BMMΦ und PMN erfolgte aus *Femur* und *Tibia*. Die Knochen wurden von Haut, Muskeln und Sehnen befreit und in RPMI 1640 gelagert. Die Knochen wurden mit einem Mörser und Pistill vorsichtig in RPMI 1640 Medium zerkleinert, die Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C). Für die Generierung von BMMΦ wurden die Zellen in BMMΦ-Wachstumsmedium gegeben und ca. 10 Tage in unbehandelten Petrischalen kultiviert. Alle 3-4 Tage wurde frisches Medium hinzugegeben, ohne das alte zu entfernen. Ein Tag vor der Infektion wurde das Zellmedium abgenommen, die Zellen mit kaltem PBS/EDTA und einen Zellschaber vom Boden gelöst und zentrifugiert (300 xg, 10 min, 4 °C). Die BMMΦ wurden in BMMΦ-Kulturmedium gegeben, gezählt und in Zellkulturschalen ausgesät. Zur Isolierung von PMN wurden die zerstoßenen Knochen gesiebt, zentrifugiert und in MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die PMN mit dem Maus anti-Ly6G MicroBead Kit nach Herstellerangaben isoliert. Nach der Zellzahlbestimmung wurden die PMN in Infektionsmedium I ausgesät und direkt infiziert.

4.3.3 RNA Isolierung

Nach Stimulation der Zellen wurde der Zellüberstand abgenommen und die Zellen mit TriFast-Reagenz in passende Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden zwei Methoden der RNA Isolierung angewandt.

Entweder wurde zu dem TriFast-Reagenz ¹/₅ des Volumens an Chloroform hinzugegeben, durch invertieren gemischt, inkubiert (15 min, RT) und zentrifugiert (16.000 xg, 15 min, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen an Isopropanol vermischt. Nach einer Inkubation (-20 °C, über Nacht) wurde zentrifugiert (16.000 xg, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde 2-mal mit Ethanol (-20 °C, 75%) durch gründliches Mischen und Zentrifugation (16.000 xg, 10 min, 4 °C) gewaschen. Nach Lufttrocknung wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Alternativ wurde die Zell-TriFast-Mischung mit dem Direct-zol RNA MiniPrep (oder MicroPrep) Kit nach Herstellerangaben mit DNase I-Verdau isoliert.

4.3.4 Umschreibung der RNA in cDNA

Zur Generierung der komplementären DNA (*complementary DNA*, cDNA) wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Es wurden 0,5-1 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach dem folgenden Programm umgeschrieben:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Dauer [Minuten]	10	120	5	×

Tab. 4.05: PCR Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA

4.3.5 Präamplifikation der cDNA

Die Methode der gezielten Präamplifikation wurde verwendet, um die Detektionsgrenze der qPCR herabzusetzen. Hierfür wurden 250 ng cDNA in 6,25 μ l mit einer verdünnten Mischung der Oligonukleotide (TaqMan Assay Mix, 0,2x, 6,25 μ l) und dem TATAA PreAmp Grandmaster Mix 2x (12,5 μ l) gemischt und nach dem folgenden Programm amplifiziert:

	Enzym Aktivierung /	Denaturierung	Anlagerung	Expansion
	1. Denaturierung	18 Zyklen		
Temperatur [°C]	95	95	60	72
Zeit	1,5 min	20 s	2,5 min	1,5 min

Direkt nach Beendigung des Programmes wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert. Vor der ersten Verwendung für die qPCR wurden die Proben mit TE-Puffer 1:5 verdünnt.

4.3.6 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die relative Quantifizierung der Gene wurde mit dem TaqMan Gene Expression Master Mix und der TaqMan Gene Expression Assays durchgeführt. Jeweils 2 µl der präamplifizierten Proben wurden nach Herstellerangaben mit dem Master Mix und den Oligonukleotiden gemischt. Das Amplifikationsprogramm ist in Tabelle 4.07 aufgeführt.

	UDG Aktivierung	Polymerase Aktivierung	Denaturierung	Anlagern / Polymerisation
			40 Zyklen	
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Dauer	2 min	10 min	15 s	1 min

Tab. 4.07: Amplifikationsprogramm für die qPCR

Die Analyse der Daten erfolgte nach der effizienzkorrigierten $\Delta\Delta C_{T}$ -Methode nach Pfaffl (Gl. 4.01-4.03, [148]).

$$\Delta C_{T}(Gapdh) = C_{T}(Gapdh_{uninfiziert}) - C_{T}(Gapdh_{infiziert})$$
(Gl. 4.01)

$$\Delta C_{T}(Zielgen) = C_{T}(Zielgen_{uninfiziert}) - C_{T}(Zielgen_{infiziert})$$
(Gl. 4.02)

$$\Delta\Delta C_{\rm T} = \frac{E^{\Delta C_{\rm T}(Gapdh)}}{E^{\Delta C_{\rm T}(Zielgen)}} \tag{G1. 4.03}$$

 C_T = Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen des definierten Fluoreszenzgrenzwertes (*threshold cycle*), E = Effizienz.

4.3.7 Microarray

Die RNA von uninfizierten und infizierten WT und PGLYRP4-KO AEC wurden wie oben beschrieben mit der TriFast-Methode isoliert. Jeweils drei Proben je Gruppe wurden zu einer Probe vereint und anschließend in Kooperation mit Prof. Dr. B. Schmeck (Deutsches Zentrum für Lungenforschung, Universität Gießen) bearbeitet. Hierfür wurden 200 ng RNA mit dem Superscript II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben, durch Verwendung von Cy3- oder Cy5-dCTP gefärbt und mit dem PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben gereinigt. Anschließend wurde die gefärbte cDNA auf einen Agilent SurePrint G3 Mouse Gene Expression v2 8x60k Microarray gegeben und über Nacht in der GeneTAC Hybridization Station (PerkinElmer, Waltham, MA, US) hybridisiert. Die Datenauswertung erfolge mit dem limma Paket in R und die Gene wurden mit den Datenbanken Ensembl (http://www.ensembl.org), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, http://www.kegg.jp) und Gene Ontology Consortium (GO, http://www.geneontology.org) annotiert.

4.3.8 Eliminierung von Pneumokokken durch PMN

Für die Stimulation der PMN wurden AEC von WT und PGLYRP4-KO Mäusen isoliert und wie unter Punkt 4.1 und 4.3.2 beschrieben mit *S. pneumoniae* (D39, MOI = 1, 16 h) infiziert. Die Überstände wurden abgenommen und filtriert (0,22 μ m) um Zellen und Bakterien zu entfernen. PMN wurden von denselben Tieren wie beschrieben isoliert und in PBS aufgenommen. Außerdem wurde das Blut der Tiere abgenommen und das Serum durch Koagulation des Blutes (30 min, RT) und Zentrifugation (1.300 xg, 10 min, 4 °C) gewonnen. Für die Infektionsversuche mit PMN wurden jeweils 10 μ l (10⁶ CFU) *S. pneumoniae* D39 mit 40 μ l WT oder PGLYRP4-KO Serum opsonisiert (1 h, 37 °C). Anschließend wurde zu den opsonisierten Pneumokokken entweder 10⁴ PMN in 100 μ l PBS oder, nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C, 10⁴ PMN in 10 μ l PBS und 90 μ l AEC-Überstand gegeben. Nach der Inkubation (1 h, 37 °C) wurden die Zellen lysiert (50 μ l 1% Triton X) und die Überstände auf Columbia Blutagar Platten mit 5% Schafsblut ausgestrichen. Zusätzlich wurden Kontrollen mit opsonisierten Pneumokokken mit und ohne AEC Überstand, aber ohne PMN, als Negativkontrollen inkubiert.



Abb. 4.02: Aufbau des Eliminierungsversuches durch PMN. Nach Isolierung von AEC von WT und PGLYRP4-KO Mäusen (Tag 1) und Infektion mit *S. pneumoniae* (Tag 2) wurden am 3. Tag PMN Isolierung und mit dem filtrierten, zellfreien Überstand der AEC stimuliert und anschließend mit *S. pneumoniae* infiziert. Die Überstände wurden auf Columbia Agar Platten mit 5% Schafsblut ausgestrichen um die verbliebene Bakterienlast zu ermitteln.

4.3.9 ECIS

Für die Messung der epithelialen Barriere wurde die elektrische Zell-Substrat Widerstandsmessungs- (*electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) Methode verwendet. Hierfür wurden ECIS-Platten mit Fibronektin behandelt (1 h, 100 μ l, 10 μ g) und 1-mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden AEC von WT und PGLYRP4-KO Mäusen isoliert und $4 \cdot 10^5$ Zellen je Vertiefung in AEC-Isolationsmedium II ausgesät und inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Am nächsten Tag wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und für weitere vier Tage inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Zwei Stunden vor der Infektion wurden die Zellen auf AEC-Infektionsmedium umgestellt, die Zellen mit *S. pneumoniae* D39 (5 · 10⁵ CFU) infiziert und sofort im ECIS-Gerät gemessen (24 h, 400 Hz, 37 °C, 5% CO₂). Die Daten wurden relativ zum Anfangswert des relativen Widerstandes normalisiert. Da sich der Zellwiderstand nach dem Mediumwechsel für die Infektion zunächst stabilisieren muss, wurde für die Normalisierung

der Daten der Mittelwert des relativen Widerstandes in der Zeit von 2-4 h nach der Infektion verwendet.

4.3.10 rPGLYRP4 Degradation

Für die Detektion von rPGLYRP4 und die Analyse des Abbaus durch *S. pneumoniae* wurde 2,5 μ g rPGLYRP4 alleine, mit 5 · 10⁴ CFU D39, oder mit derselben Menge D39 und 5 μ l Proteaseinhibitor für 24 h in einem Gesamtvolumen von 50 μ l RPMI (+Zn/Ca/Cu) inkubiert (37 °C, 5% CO₂). Als Kontrollen wurden zusätzlich nur *S. pneumoniae*, Medium alleine, Proteaseinhibitor alleine und *S. pneumoniae* + Proteaseinhibitor unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben 2-mal zentrifugiert (2.000 xg, 10 min, 4 °C und 14.000 xg, 15 min, 4 °C) und der Überstand zur Detektion in nicht-reduzierendem PAGE-Probenpuffer inkubiert (10 min, 90 °C). Die Proben wurden in die Taschen eines 13,5% SDS-PAGE-Gel appliziert und bei 120 V aufgetrennt. Die Banden wurden in Coomassie-Färbelösung gefärbt (1 h, schütteln) und solange mit Coomassie-Entfärber behandelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Aufnahme und die relative Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imager und der Image Studio Software v5.2 relativ zur Bandenstärke von rPGLYRP4 alleine.

4.4 Statistik

Die Statistische Auswertung wurde mit Prism 6 durchgeführt. Alle Daten wurden visuell und zusätzlich mit statistischen Tests auf eine normal- oder eine logarithmisch-normal Verteilung untersucht. Je nach Probengröße wurde der Kolmogorov-Smirnov, der Shapiro-Wilk oder der D'Agostino-Pearson Test verwendet. Normalverteilte Proben wurden mit dem zweiseitigen, ungepaarten *t*-Test (*t*-Test) oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*, ANOVA) mit Korrektur für multiples Testen durch den Holm-Sidak oder Fischers LSD post-hoc Test untersucht. Für logarithmisch-normalverteilte Proben wurden dieselben Tests verwendet, jedoch die Daten vorher logarithmiert. Die Ergebnisse der approximativen Sterblichkeit wurden mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon Test untersucht. Das Signifikanzlevel wurde mit $p \le 0,05$ festgelegt. Für p-Werte zwischen 0,1 und 0,05 wurden, um die Nähe zum Signifikanzlevel anzuzeigen, die exakten Werte in den Abbildungen angegeben und p-Werte $\ge 0,1$ wurden in den Abbildungen als nicht signifikant (ns) angezeigt. Die verwendeten statistischen Tests sind unter den jeweiligen Abbildungen angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von PGLYRP2 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie

5.1.1 Pglyrp2 wird durch Pneumokokken in phagozytischen Zellen induziert

Zunächst wurde die relative Genexpression von Pglyrp2 in verschiedenen primären Zelltypen *in vitro* untersucht, um zu prüfen, ob die Infektion mit *S. pneumoniae* einen Einfluss auf die Expression von Pglyrp2 hat. Hierfür wurden in der Lunge residierende Zellen (AEC und AM Φ), sowie während einer Infektion in die Lunge rekrutierte Zellen (PMN und BMM Φ) verwendet.

Die relative Expression von Pglyrp2 Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) von *in vitro* infizierten BALB/c WT Primärzellen aus der Lunge war signifikant auf das 4,1 bzw. 3,7-fache in PMN bzw. BMM Φ erhöht. Für AM Φ wurde im Mittel eine höhere relative Genexpression festgestellt (20,3-fach). In AEC war die Expression vergleichbar mit der unbehandelten Kontrolle (Abb. 5.02). Diese Daten zeigen eine erhöhte Expression von Pglyrp2 in phagozytierenden Zellen, aber nicht in AEC.



Abb. 5.01: *Pglyrp2* wird durch Stimulation mit Pneumokokken in phagozytischen Zellen induziert. Die Genexpression wurde nach Stimulation mit *S. pneumoniae* (6 h, D39, MOI = 1) mittels $\Delta\Delta C_T$ Methode relativ zur unbehandelten Kontrolle und *Gapdh* ermittelt. Die gestrichelte Linie entspricht der Expression von *Pglyrp2* in der unbehandelten Kontrolle relativ zu *Gapdh*. Mittelwerte + SEM für 4 (AEC, PMN und BMMΦ) bzw. 3 (AMΦ) Proben. Statistik: *t*-Test mit logarithmierten Werten. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, ns = nicht signifikant.

5.1.2 Höhere Bakterienlast in der Milz von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 48 hpi

Da die *in vitro* Infektion mit Pneumokokken zu einer Induktion von *Pglyrp2* in lokalen (AM Φ) und in die Lunge rekrutierten und phagozytierenden Zellen (PMN, BMM Φ) führt, wurde der Einfluss von PGLYRP2 durch eine *in vivo* Infektion von BALB/c WT und PGLYRP2-KO Mäusen untersucht.

Es zeigte sich, dass sowohl im frühen (12 hpi) als auch im fortgeschrittenen Verlauf (48 hpi) der Infektion WT und PGLYRP2-KO Mäuse eine ähnlich hohe Belastung mit Pneumokokken in der Lunge aufwiesen (Abb. 5.02A und D). Nach 12 h lag die Belastung im Mittel bei $1-2 \cdot 10^6$ CFU in der Lunge (Abb. 5.02A). In der Milz konnte jeweils bei einer WT und

PGLYRP2-KO Maus Pneumokokken nachgewiesen werden (Abb. 5.02B). Im Blut waren keine Pneumokokken nachweisbar (Abb. 5.02C). Nach 48 h war die mittlere Belastung in der Lunge höher als nach 12 h und lag bei $7,2 \cdot 10^6$ CFU für die WT und $5,6 \cdot 10^6$ CFU für die PGLYRP2-KO Mäuse. In den Milzen der PGLYRP2-KO Tiere wurden signifikant mehr Bakterien festgestellt ($7,6 \cdot 10^4$), als bei den WT ($9,2 \cdot 10^3$) Tieren (Abb. 5.02E). Im Blut wurden im Mittel 100-mal mehr Bakterien in den PGLYRP2-KO gegenüber den WT Tieren gefunden (Abb. 5.02F).



Abb. 5.02: Erhöhte bakterielle Belastung in der Milz von PGLYRP2-KO Mäusen 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae*. WT und PGLYRP2-KO Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* (A66, 10⁵ CFU) infiziert und die bakterielle Belastung nach 12 (A-C) bzw. 48 h (D-F) der Lunge (A, D), Milz (B, E) und im Blut (C, F) ermittelt. Die horizontale, durchgezogene Linie zeigt den Mittelwert von 11 Tieren. Die horizontale, gestrichelte Linie zeigt die untere Detektionsgrenze. Für die statistische Auswertung wurden die nicht detektierten Proben auf die Hälfte der Detektionsgrenze angepasst. Statistik: *t*-Test mit logarithmierten Werten. ** $p \le 0,01$, ns = nicht signifikant. Die Experimente wurden von U. Behrendt durchgeführt.

5.1.3 PGLYRP2-KO Mäuse erreichen früher die Abbruchkriterien nach Infektion mit S. pneumoniae als WT Mäuse

Aufgrund der höheren systemischen Belastung mit Pneumokokken von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen (Abb. 5.02) wurde untersucht, ob sich dies auf die Sterblichkeit der Tiere durch eine Pneumokokkeninfektion auswirkt.

In der approximativen Überlebensrate nach 10 Tagen konnte kein Unterschied zwischen WT und PGLYRP2-KO Tieren festgestellt werden (Abb. 5.03A). Es mussten jeweils ca. 50% der WT und PGLYRP2-KO Tiere aufgrund des Erreichens der humanen Endpunkte euthanasiert werden. Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied in der Mortalität nach 3,5-5 Tagen (Abb. 5.03A und B). Dies wurde ebenfalls bei der Ermittlung des medianen Euthanasiezeitpunktes deutlich. PGLYRP2-KO Mäuse mussten im Schnitt nach 3,5 Tagen (IQR: 3,25–4,0 Tage) und WT Mäuse nach 5 Tagen (IQR: 4,0–5,5 Tage) euthanasiert werden. Somit erreichten PGLYRP2-KO Mäuse signifikant früher als WT Mäuse die vorher definierten Abbruchkriterien durch eine Infektion mit Pneumokokken.



Abb. 5.03: PGLYRP2-KO Mäusen sind anfälliger für eine Pneumokokkeninfektion und müssen früher als WT Mäuse euthanasiert werden. Nach einer transnasalen Infektion mit *S. pneumoniae* (A66, $5 \cdot 10^4$ CFU) wurden PGLYRP2-KO und WT Mäuse über einen Zeitraum von 10 Tagen überwacht. Dabei wurden die klinischen Parameter alle 12 h kontrolliert und beim Erreichen der humanen Endpunkte die Tiere in Narkose erlöst. A) Die approximative Überlebensrate wird als Kaplan-Mayer Kurve mit 25 (WT) bzw. 24 (PGLYRP2-KO) Versuchstieren dargestellt. B) Der Zeitpunkt der medianen Euthanasie wurde anhand der euthanasierten Tiere ermittelt (WT: 11, PGLYRP2-KO: 13). Die horizontale Line stellt den Median dar. Statistik: A) Gehan-Breslow-Wilcoxon Test, B) *t*-Test mit logarithmierten Werten. * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, ns: nicht signifikant.

5.1.4 Beschleunigter Krankheitsverlauf in PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen

Die Schwere und der Verlauf der Pneumonie wurden anhand der klinischen Parameter untersucht (Abb. 5.04). Sowohl WT als auch PGLYRP2-KO Mäuse zeigten im Median nach 2 Tagen erste Anzeichen einer Infektion (Abb. 5.04A). Nach 2,5 Tagen gab es erste Anzeichen, dass die PGLYRP2-KO Tiere stärker erkrankten als die WT Mäuse und nach 3 Tagen war der Schweregrad der Erkrankung signifikant höher als bei den WT Mäusen (Abb. 5.04B). Bereits einen Tag später, an Tag 4 nach der Infektion, waren nur noch sehr wenige PGLYRP2-KO Mäuse erkrankt und wiesen im Durchschnitt weniger Symptome auf als die WT Tieren (Abb. 5.04B-C). Dies korreliert mit der Notwendigkeit einer früheren Euthanasie der PGLYRP2-KO Tiere (vgl. Abb. 5.03A), wohingegen die WT Mäuse einen gleichbleibenden Schweregrad der Erkrankung bis ca. 5-5,5 Tage nach der Infektion aufzeigten. Dies ist ebenfalls ersichtlich, bei Betrachtung der Anzahl an kranken Tieren (Abb. 5.04C) und des Gewichtsverlaufes (Abb. 5.04D). Sowohl WT als auch PGLYRP2-KO Tiere verloren ab Tag 2,5 an Gewicht. Dies blieb bei den WT bis ca. 5,5 Tage nach der Infektion, wohingegen das mittlere Gewicht der PGLYRP2-KO Gruppe bereits nach 4 Tagen wieder auf dem Normalniveau lag. Die Auswertung der klinischen Parameter lässt auf einen beschleunigten Krankheitsverlauf in den PGLYRP2-KO Mäusen schließen.



Abb. 5.04: PGLYRP2-KO Mäuse zeigen einen beschleunigten Krankheitsverlauf ermittelt anhand klinischer Parameter. WT und PGLYRP2-KO Mäuse wurden nach der Infektion mit *S. pneumoniae* (A66, $5 \cdot 10^4$ CFU) alle 12 h über 10 Tage überwacht und klinische Anzeichen einer Erkrankung notiert. Bei Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Tiere unter Narkose euthanasiert. A) Der erste Tag für klinische Krankheitsanzeichen wird als Box-Whisker-Diagramm mit 95% CI dargestellt. B) Die Summe der klinischen Krankheitsanzeichen (min. 1, max. 24) ist ohne euthanasierte Tiere dargestellt (gewichteter Mittelwert + SEM). C) Die Anzahl an sichtbar erkrankten (ohne euthanasierte) Tiere und das 95% CI des log(Gauß)-Kurven-Fit werden dargestellt. Insgesamt wurden 17 WT und 20 PGLYRP2-KO Tiere in die Analysen eingeschlossen. Ausgeschlossen wurden 8 WT und 4 PGLYRP2-KO Tiere, da diese keine Anzeichen einer Erkrankung zeigten. D) Das Körpergewicht ist als Mittelwert \pm SEM von 25 (WT) bzw. 24 (PGLYRP2-KO) Tieren dargestellt. Statistik: A, D) *t*-Test mit logarithmierten Werten, B) One-way ANOVA mit Fischers LSD post-hoc Analyse, C) log(Gauß) Kurven-Analyse. * $p \le 0,05$, ** $p \le 0,01$.

5.1.5 Rekombinantes PGLYRP2 wirkt nicht antibakteriell in vitro

Aufgrund des schnelleren Verlaufes der Pneumonie in den PGLYRP2-KO Tieren und der bekannten Funktion als antibakterielles Protein [104] wurde die antibakteriellen Eigenschaften von PGLYRP2 gegenüber *S. pneumoniae* (D39) *in vitro* untersucht. Das Bakterienwachstum war vergleichbar zwischen unbehandelten und mit 90 µg/ml rPGLYRP2 behandelten Pneumokokken, die Positivkontrolle Gentamycin eliminierte jedoch alle Bakterien innerhalb

von 6 h (Abb. 5.05A). Da Pneumokokken eine schützende PSK besitzen, wurde untersucht, ob diese ein Schutzfaktor der Pneumokokken gegen PGLYRP2 darstellt und PGLYRP2 daher nicht antibakteriell wirken konnte. Daher wurde der Versuch mit einer unbekapselten D39 Mutante (D39ΔCps) wiederholt. Auch in diesem Versuch zeigte sich keine antibakterielle Wirkung von rPGLYRP2 auf die Pneumokokken (Abb. 5.05B). Daher kann geschlussfolgert werden, dass das rPGLYRP2 keinen antibakteriellen Effekt gegenüber Pneumokokken aufweist.



Abb. 5.05: rPGLYRP2 ist nicht antibakteriell gegen *S. pneumoniae in vitro. S. pneumoniae* D39 (A) bzw. D39 Δ Cps (B) wurde mit oder ohne 90 µg/ml rPGLYRP2 oder 1 µg/ml Gentamycin als Positivkontrolle für 6 bzw. 24 h inkubiert. Die Anzahl an Kolonien wird prozentual zur Anfangskontrolle angegeben. Es wurden je drei Versuche durchgeführt. Statistik: *t*-Test, ns: nicht signifikant.

5.1.6 Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine KC, IL-6 und TNF-α sind in PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen in der Lunge verringert

Eine weitere Ursache, neben einer direkten, antibakteriellen Wirkung von PGLYRP2, könnten indirekte immunmodulatorische Effekte sein. Es ist bekannt, dass PGLYRP pro- bzw. antiinflammatorische Eigenschaften besitzen [100,111] und einen Einfluss auf die Zytokinausschüttung haben [114,115].

Daher wurden die proinflammatorischen Zytokine KC, IL-6, IFN- γ und TNF- α in der Lunge untersucht (Abb. 5.06A-D). Im Vergleich zwischen WT und PGLYRP2-KO Mäusen war das basale Level für alle Zytokine vergleichbar. KC wurde mit 9 bzw. 7 pg/mg in uninfizierten WT und PGLYRP2-KO Lungen festgestellt (Abb. 5.06A), IL-6 (Abb. 5.06B), IFN- γ (Abb. 5.06C) und TNF- α (Abb. 5.06D) waren in keiner der unstimulierten Proben detektierbar. Nach 48 h Infektion zeigte sich, dass KC (Abb. 5.06A), IFN- γ (Abb. 5.06C) und TNF- α (Abb. 5.06D) tendenziell in den Lungen der PGLYRP2-KO Mäusen reduziert und dass dies für IL-6 (Abb. 5.06B) statistisch signifikant war. Für KC wurden Werte von 273 bzw. 43 pg/mg Lunge, für IL-6 von 265 bzw. 4 pg/m Lunge, für IFN- γ von 15 bzw. 4 pg/mg Lunge und für TNF- α von 26 bzw. 2 pg/mg Lunge ermittelt.

Zusätzlich wurden die Mengen der proinflammatorischen Zytokine im Blut analysiert. Es zeigte sich, dass es keine Unterschiede in dem basalen Level der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α , KC und IFN- γ (Abb. 5.06E-H) gab. Es wurden leicht erhöhte Mengen der untersuchten Zytokine in den mit Pneumokokken infizierten gegenüber den uninfizierten Mäusen gefunden, jedoch gab es keine Unterschiede in den Zytokinlevel im Blut zwischen den infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen. Im Pneumokokken-induzierten Pneumonie-Modell waren proinflammatorische Zytokine in der Lunge, aber nicht im Blut, von PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen verringert.



Abb. 5.06: Geringere Zytokinlevel in den Lungen aber nicht im Blut von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 48 hpi. Die Zytokine KC (A, E), IL-6 (B, F), IFN- γ (C, G) und TNF- α (D, H) wurden mittels ProcartaPlex Multiplex System in Lungenhomogenat (A-D) bzw. im Blutplasma (E-H) von infizierten (*S. pneumoniae*, A66, 10⁵ CFU) bzw. PBS-Kontrolltieren (uninfiziert) 48 hpi untersucht. Für die Lungenanalysen wurden Homogenate von 8 (WT) bzw. 7 (PGLYRP2-KO) und für die Blutanalysen wurde Plasma von 6 (WT uninfiziert und PGLYRP2-KO infiziert/uninfiziert) bzw. 7 (WT infiziert) Mäusen verwendet (Mittelwert + SEM). Für die statistische Auswertung wurden die nicht detektierten Proben auf die Hälfte des Quantifizierungslimits angepasst. Die horizontale, gestrichelte Linie in F-H entspricht dem unteren Quantifizierungslimit. In A-D konnte diese aufgrund der Berechnung der Zytokinwerte pro mg Lunge nicht angezeigt werden. Statistik: One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test mit den logarithmierten Daten. # $p \le 0,06$, * $p \le 0,05$, ** $p \le 0,01$, *** $p \le 0,001$, ns = nicht signifikant, KO2 = PGLYRP2-KO.
5.1.7 Geringere Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Lunge von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen

Da eine Reduktion an proinflammatorischen Zytokinen in den Lungen von PGLYRP2-KO Mäusen festgestellt wurde, könnte dies eine veränderte Rekrutierung von wichtigen Immunzellen an den Ort der Infektion, die Lunge, nach sich ziehen. Dies würde unter Umständen den unterschiedlich starken Verlauf der Pneumonie in den PGLYRP2-KO und WT Mäusen erklären. Daher wurden die Lungen von PBS-stimulierten und *S. pneumoniae*infizierten Mäusen 48 hpi für eine Quantifizierung von Zellen des angeborenen Immunsystems mittels Durchflusszytometrie verwendet.

Zunächst wurde die Gesamtzellzahl an CD45⁺ Leukozyten in den Lungen von uninfizierten und infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen analysiert und verglichen. Beim Vorliegen einer verringerten Anzahl an Leukozyten in einer der Gruppen würden ebenfalls Unterschiede in den Subpopulationen auftreten, welche die nachfolgenden Analysen verzerren könnten. Die Quantifizierung der CD45⁺ Zellen ergab, dass alle Proben vergleichbar waren und keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt wurden (Abb. 5.07A). Somit konnten die folgenden Analysen als relativer Anteil der CD45⁺ Zellen dargestellt werden.

Es zeigte sich, dass durch die Infektion mit S. pneumoniae, gegenüber den PBS-behandelten Tieren, nach 48 h vermehrt PMN in der Lunge der WT Mäuse vorlagen (7,9% gegenüber 3,8% in infizierten bzw. unifizierten WT Mäusen, Abb. 5.07B). Im Gegensatz hierzu, wurde in den PGLYRP2-KO Lungen kein Unterschied in der Menge an PMN zwischen uninfizierten und infizierten Tieren festgestellt (4,8% gegenüber 4,0% in infizierten bzw. unifizierten PGLYRP2-KO Mäusen, Abb. 5.07B). In den Lungen der WT Mäuse lagen demnach signifikant mehr PMN vor, als in den Lungen der PGLYRP2-KO Tiere (7,9% in WT und 4,8% in PGLYRP2-KO). Der Anteil an anderen wichtigen Zellen des angeborenen Immunsystems blieb unverändert (Abb. 5.07C-F). Es gab weder Unterschiede zwischen WT und PGLYRP2-KO Mäusen bei AMΦ (Abb. 5.07C), DC (Abb. 5.07D), T γδ (Abb. 5.07E) und NK Zellen (Abb. 5.07F), noch einen Unterschied durch die Infektion mit S. pneumoniae. T γδ-Zellen zeigten einen Trend zu einem höheren Zellanteil 48 hpi in den Lungen von infizierten WT und PGLYRP2-KO gegenüber uninfizierten Tieren (Abb. 5.07E). Die durchflusszytometrische Analyse 48 hpi mit S. pneumoniae ergab, dass der Anteil an PMN in der Lunge, aber keiner der anderen analysierten Zellpopulationen, in PGLYRP2-KO gegenüber WT Tieren verringert waren.



Abb. 5.07: PGLYRP2-KO Mäuse rekrutieren weniger PMN in die Lunge als WT Mäuse 48 hpi. *S. pneumoniae*-infizierte (A66, 10⁵ CFU) und PBS-behandelte WT und PGLYRP2-KO Mäusen wurden 48 hpi euthanasiert und die Lungen entnommen. Der Anteil an CD45⁺ Leukozyten an Gesamtzellen (A), sowie PMN (B), AM Φ (C), DC (D), T $\gamma\delta$ (E) und NK Zellen (F) an CD45⁺ Leukozyten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht (PBS WT und PGLYRP2-KO: n = 6, infizierte WT: n = 8 und PGLYRP2-KO: n = 8). Die horizontale Linie stellt den Mittelwert dar. Statistik: One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test. * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, ns = nicht signifikant, KO = PGLYRP2-KO.

5.1.8 PGLYRP2 reguliert nicht den Transkriptionsfaktor IkBa

Die Erkennung von Pneumokokken erfolgt vor allem über den TLR2- und den NOD2-Rezeptor [53]. Diese Rezeptoren modulieren die Zytokinsekretion u. a. über den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Dieser liegt zytosolisch konstitutiv exprimiert vor und wird durch I κ B α inhibiert. Damit NF- κ B in den Zellkern translozieren, die Gen- und sukzessive die Proteinexpression induzieren kann, muss I κ B α , durch Phosphorylierung und Ubiquitinylierung, abgebaut werden [49,149]. Unterschiede in der Menge von I κ B α können daher einen Einfluss auf die Menge an sekretierten Zytokinen haben. Zenhom *et al.* haben gezeigt, dass PGLYRP3 die Genexpression von I κ B α beeinflussen kann und damit einen möglichen Mechanismus für dessen anti-inflammatorische Eigenschaften gegeben [115]. Da in den vorliegenden Versuchen zum PGLYRP2-KO eine Regulierung der Zytokinexpression (Abb. 5.06) und damit einhergehend eine Reduzierung der PMN Rekrutierung in die Lunge (Abb. 5.07) festgestellt werden konnte, wurde dieser Mechanismus für PGLYRP2 überprüft. Lungenhomogenate wurden 24 und 48 hpi auf die Proteinexpression von I κ B α hin untersucht. Hierfür wurden WT und PGLYRP2-KO Mäuse entweder mit *S. pneumoniae* infiziert oder als Kontrolle mit PBS behandelt und die relative Menge an I κ B α per Western Blot ermittelt. Die Analysen zeigen, dass durch die Infektion 24 hpi (Abb. 5.08A), aber nicht 48 hpi (Abb. 5.08B) tendenziell weniger I κ B α in der Lunge zu finden war als in den PBS-behandelten Tieren. WT und PGLYRP2-KO Mäusen zeigten sowohl 24 hpi, wie auch 48 hpi eine vergleichbare Expression von I κ B α in der Lunge (Abb. 5.08A) und B).



Abb. 5.08: I κ Ba ist nicht differentiell in PGLYRP2-KO vs. WT Mauslungen 24 und 48 hpi reguliert. Die Menge an I κ Ba wurde in Lungenhomogenaten von PBS-Kontrolltieren (uninfiziert) bzw. *S. pneumoniae*-infizierten (A66, 10⁵ CFU) WT und PGLYRP2-KO Mäusen 24 hpi (A) und 48 hpi (B) mittels Western Blot analysiert. Die Quantifizierung der I κ Ba Banden wurde relativ zu Aktin mit der Image Studio Software berechnet. Repräsentative Western Blot Banden und die Mittelwerte + SEM der quantifizierten Banden aus den Homogenaten sind dargestellt: A) 3 uninfizierte bzw. 8 infizierte Mäuse und B) je 3 Mäuse pro Gruppe. Statistik: One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test mit den logarithmierten Werten, ns = nicht signifikant.

5.1.9 Vergleichbares Mikrobiom in WT und PGLYRP2-KO Mäusen

Das Immunsystem kann ebenfalls durch die in uns lebenden Mikrobiota beeinflusst werden. So ist bekannt, dass SCFA von im Darm lebenden Bakterien produziert, über das Blut transportiert und in anderen Organen inflammatorische Prozesse beeinflussen können [133,134]. Des Weiteren wurde aus der Gruppe um R. Dziarski berichtet, dass das Darmmikrobiom in allen PGLYRP-KO Linien verändert ist [111]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das Darmmikrobiom von PBS-Kontrolltieren und Pneumokokken-infizierten Tieren analysiert und miteinander vergleichen.

Zunächst wurde die α -Diversität, als Maß der Artenvielfalt, anhand der Anzahl an OTU ermittelt (Abb. 5.09A). Es zeigte sich, dass alle Tiere zwischen ca. 222 und 369 annotierbare OTU enthielten. Für die uninfizierten WT bzw. PGLYRP2-KO Tiere wurden im Mittel 284

bzw. 316 OTU und für die infizierten WT bzw. PGLYRP2-KO Tiere wurden im Mittel 298 bzw. 347 OTU im *Caecum* annotiert. Die Anzahl der OTU war in allen Gruppen gleich.

Des Weiteren wurde die β -Diversität (das Maß für Unterschiede in der Artenvielfalt) anhand einer multidimensionalen Skalierung anhand ihrer Unähnlichkeit aufgetragen (Abb. 5.09B). Es zeigte sich, dass die Datenpunkte in allen Gruppen stark streuten und sich die einzelnen Datenwolken zu großen Teilen überlagern.



Abb. 5.09: Das Mikrobiom im *Caecum* von WT und PGLYRP2-KO Mäusen weisen eine vergleichbare α - und β -Diversität auf. Für die Analyse des Mikrobioms wurde die V4-Region der 16S rRNA sequenziert und mit Hilfe der SILVA-Datenbank [144] annotiert. A) Die Anzahl der OTU als Maß der α -Diversität wurde ermittelt. Die horizontale Linie gibt den Mittelwert wieder. B) Die β -Diversität wurde mit Hilfe einer multidimensionalen Skalierung (*thetaYC* Funktion von *Mothur* [142]) anhand ihrer Unähnlichkeit verglichen. Gezeigt werden die drei Achsen (*principal coordinate*, PC), welche die größten Variationen zwischen den Proben erklären. Die Zahlen an den Achsen weisen den Anteil an Variation aus, welcher durch diese Achse erklärt wird. Es wurden jeweils 6 Proben pro Gruppe analysiert. Statistik: A) One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test. KO2 = PGLYRP2-KO, uninfiziert = PBS-Kontrolltiere, infiziert = A66, 10⁵ CFU, 48 h, ns = nicht signifikant.

Da manchmal auch kleine Unterschiede einen großen Einfluss haben können, wurde die β -Diversität ebenbfalls auf Ebene der Phyla und Familien untersucht. Auf Ebene der Phyla (Abb. 5.10A) machten die *Firmicutes* vor den *Bacteroidetes* mit einem Anteil von ca. 58-71% bzw. 21-33% den weitaus größten Anteil der detektierten Bakterien aus. Zusätzlich wurden noch *Proteobacteria* mit einem Anteil von ca. 3-5% detektiert. Auf Ebene der Familien (Abb. 5.10B) waren die *Lachnispiraceae* mit einem Anteil von 40-55% die bei weitem häufigsten Bakterien in den untersuchten Proben.

Auch in der feineren Untersuchung der Zusammensetzung des Mikrobioms glichen sich die WT und PGLYRP2-KO Tieren sehr. Lediglich die *Bacteroidetes* auf Ebene der Phyla (Abb. 5.10A) und die *Bacteroidales* (S24-7 Gruppe) auf Ebene der Familien (Abb. 5.10B) sind im Mittel in den infizierten gegenüber den uninfizierten WT erhöht. Diese Erhöhung des

Mittelwertes ist jedoch durch einzelne Ausreißer begründet und zeigt daher keinen Effekt der Infektion an.

Zusammenfassend wurden keine Unterschiede im Vergleich des Mikrobioms im Ceacum von WT und PGLYRP2-KO Mäusen festgestellt und auch durch die Infektion mit *S. pneumoniae* für 48 h wurden keine signifikanten Veränderungen des Mikrobioms gegenüber den uninfizierten Gruppen hervorgerufen.



Abb. 5.10: Auf Phylum- und Familien-Ebene wurden vergleichbare Mikrobiome im *Caecum* von uninfizierten, wie auch von infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen ermittelt. Das Mikrobiom wurden anhand der SILVA-Datenbank annotiert und den einzelnen Phyla (A) und Familien (B) zugeordnet. Phyla bzw. Familien, die einen relativen Anteil von weniger als 1% aufwiesen wurden als "Andere" definiert. Insgesamt wurden jeweils sechs Proben verwendet und die Mittelwerte dargestellt. KO2 = PGLYRP2-KO, uninfiziert = PBS-Kontrolltiere, infiziert = A66, 10⁵ CFU, 48 h.

5.2 Einfluss von PGLYRP4 in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie

5.2.1 Geringere Pneumokokkenlast in PGLYRP4-KO vs. WT Mäuse 48 hpi

In der Promotionsarbeit von A. Shrivastav wurde gezeigt, dass PGLYRP4-KO Mäuse eine geringere Belastung mit S. pneumoniae in der Lunge und im Blut 48 hpi aufweisen [139]. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit qualitativ und quantitativ reproduziert. Die gemeinsame Auswertung beider Datensätze zeigt, dass die bakterielle Belastung in den PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen, sowohl in den Lungen von $6.8 \cdot 10^6$ auf $2.0 \cdot 10^5$ CFU (Abb. 5.11A), als auch im Blut von $6.0 \cdot 10^3$ auf $1.1 \cdot 10^1$ CFU/ml (Abb. 5.11B) signifikant reduziert ist. Des Weiteren wurden keine Unterschiede in den Milzen beobachtet $(1,3 \cdot 10^4 \text{ auf})$ 3,6 · 10³ CFU in WT bzw. PGLYRP4-KO, Abb. 5.11C). Zusätzlich wurde die Schwere der Erkrankung anhand der Anzahl an bakteriämischen Tieren (Abb. 5.11D) und klinischer Parameter (Abb. 5.11E) bestimmt. Diese Auswertungen wurden zuvor von A. Shrivastav nicht durchgeführt [139]. In den Versuchen wiesen jeweils 3-mal mehr WT als PGLYRP4-KO Tiere eine Bakteriämie 48 hpi auf (neun WT vs. drei PGLYRP4-KO in Abb. 5.11D). Anhand sichtbarer Symptome (inkl. Körpertemperatur und -Gewicht) waren alle Tiere nur gering bis mittelgradig erkrankt (maximal 4 von 12 möglichen Punkten bei einer Skala von 1-12). Im Mittel zeigten PGLYRP4-KO Tiere signifikant weniger Symptome als WT Tiere (1,7 Punkte in PGLYRP4-KO gegenüber 2,0 Punkte in WT, Abb. 5.11E). Zusammengefasst wiesen PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen 48 hpi eine geringere Bakterienlast in der Lunge und im Blut auf, wurden seltener bakteriämisch und zeigten weniger klinische Anzeichen einer Erkrankung.



Abb. 5.11: Geringere Bakterienlast in PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen 48 h nach Infektion mit *S. pneumoniae*. WT und PGLYRP4-KO Mäuse wurden mit *S. pneumoniae* (A66, 10⁵ CFU) infiziert und die bakterielle Belastung nach 48 h in der Lunge (A), im Blut (B) und der Milz (C) ermittelt. Die Tiere wurden anhand einer vorliegenden Bakteriämie (D) eingeteilt, sowie die Anzeichen einer Erkrankung (1 = keine Anzeichen, max. 12) anhand des klinischen Monitorings (E) ermittelt. Die horizontale, durchgezogene Linie in A-C zeigt den Mittelwert. Die horizontale, gestrichelte Linie zeigt die untere Detektionsgrenze. Es wurden von 19 (A-D), bzw. 23 (E) Tiere je Gruppe verwendet. In E) sind zusätzlich je 4 Tiere pro Gruppe aus der histologischen Analyse enthalten. Statistik: A-C, E) *t*-Test mit den logarithmierten Werten, D) Chi²-test, * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, ns = nicht signifikant.

5.2.2 Erhöhter Entzündungsgrad und vermehrte Zellinfiltration in den Lungen von PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen

Aufgrund der verringerten Bakterienlast in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen (Abb. 5.11) sind Unterschiede in der Lunge auf morphologischer und zellulärer Ebene denkbar. Aus diesem Grund wurde die Lunge zunächst histopathologisch untersucht. Dabei wiesen die Lungen der PGLYRP4-KO gegenüber den WT Mäusen vermehrt nekrotisches Gewebe, Blutungen, sowie perivaskuläre Ödeme auf. Des Weiteren zeigte sich eine vermehrte Einwanderung von Immunzellen in den Lungen der PGLYRP4-KO Mäuse (Abb. 5.12).



Abb. 5.12: Mehr Zellinfiltration und stärkere Entzündung in den Lungen von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Zur Analyse wurden die Lungen infizierter Mäuse (*S. pneumoniae*, A66, 10⁵ CFU, 48 h) in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 2 μm Schnitte angefertigt und diese mit HE gefärbt. Gezeigt werden repräsentative Bilder von drei PGLYRP4-KO bzw. vier WT Tieren. Die Balken in den Abbildungen entsprechen 100 μm (Links) bzw. 50 μm (Mitte und Rechts).

Anschließend wurden genauere Analysen mittels digitaler histologischer Untersuchung durchgeführt. Dabei wurde ein größerer Anteil an entzündetem Gewebe (Abb. 5.13A) und mehr Zellen (Abb. 5.13B) in den Lungen der PGLYRP4-KO gegenüber der WT Mäuse festgestellt. Der Anteil an entzündetem Gewebe beträgt in den Lungen der infizierten PGLYRP4-KO Mäuse ca. 23% und ist damit ca. 3-mal größer als in den Lungen der WT Mäuse (7%). Nach der Infektion mit *S. pneumoniae* ist die Zellzahl in den Lungen der PGLYRP4-KO Mäuse um ca. 55% höher als in denen der WT Mäuse (ca. 6.900 Zellen in PGLYRP4-KO gegenüber ca. 4.500 Zellen in WT).

Die IHC-Auswertung zeigte, dass die Anzahl an MΦ gleich hoch in den WT und PGLYRP4-KO Lungen war (Abb. 5.13C). Es infiltrierten jedoch tendenziell mehr PMN (Abb. 5.13D) und B-Zellen (Abb. 5.13E) und signifikant mehr T-Zellen (Abb. 5.13F) in die Lungen der PGLYRP4-KO Mäuse. Es wurden ca. 85% mehr PMN (296 und 549 PMN/mm² Lunge in WT bzw. PGLYRP4-KO), 89% mehr B-Zellen (336 und 635 B-Zellen/mm² Lunge in WT bzw. PGLYRP4-KO), und 130% mehr T-Zellen (403 und 926 T-Zellen/mm² Lunge in WT bzw. PGLYRP4-KO) ermittelt. Die digitale Auswertung der histologischen Schnitte ergab, dass mehr B-Zellen, PMN und signifikant mehr T-Zellen in die Lungen der PGLYRP4-KO gegenüber den WT Mäusen einwanderten.



Abb. 5.13: Mehr Entzündung und Zellinflux von Immunzellen in den Lungen der mit *S. pneumoniae* infizierten PGLYRP4-KO vs. WT Mäuse. Die HE-gefärbten Lungenschnitte infizierter (A66, 10⁵ CFU, 48 h) WT und PGLYRP4-KO Mäuse wurde digital ausgewertet und der Anteil an entzündetem Gewebe in der Lunge (A) und die Gesamtanzahl an Zellen (B) ermittelt. Immunzellen wurden mit anti-CD68 (Makrophagen/Monozyten, Abb. C), anti-NE (PMN, Abb. D), anti-CD45R (B-Zellen, Abb. E) oder anti-CD3 (T-Zellen, Abb. F) gefärbt und die Zellzahl pro mm² an Lungengewebe in 3 PGLYRP4-KO (KO4) bzw. 4 Wildtyp (WT) Tieren ermittelt (Mittelwert + SEM). Statistik: *t*-Test, ** $p \le 0,01$.

Sowohl die mikroskopische Analyse der histologischen Lungenschnitte durch trainierte Veterinärpathologen, als auch die digitale Analyse ergaben in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen größere Bereiche von Entzündungsreaktionen mit einer vermehrten Infiltration von Immunzellen.

5.2.3 Reduzierte Expression von Pglyrp4 in Alveolarepithelzellen und Induktion in $M\Phi$

Da Veränderungen in der Rekrutierung von Immunzellen (Abb. 5.13) und der Stärke der Entzündungsprozesse in der Lunge (Abb. 5.12 und 5.13) von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen auftraten, wurde untersucht, ob in der Lunge vorzugsweise residente oder rekrutierte Zellen des angeborenen Immunsystems durch *Pglyrp4* beeinflusst sind. Hierfür wurde zunächst die differenzielle Regulation der relativen Genexpression von *Pglyrp4* nach *in vitro* Infektion mit *S. pneumoniae* in ausgewählten Zellentypen analysiert.

Es zeigte sich, dass Pglyrp4 in AEC signifikant auf das ca. 0,4-fache des Kontrollwertes reduziert war, wohingegen die relative Expression von Pglyrp4 in AM Φ signifikant auf das

5,2-fache und im Mittel in BMM Φ auf das 3,0-fache des Kontrollwertes erhöht war (Abb. 5.14). In PMN konnte kein Einfluss der Pneumokokken auf die mRNA Menge an *Pglyrp4* festgestellt werden (0,9-fache der Kontrolle). Diese Daten implizieren, dass die Infektion mit *S. pneumoniae* vornehmlich einen Einfluss auf die Genexpression von *Pglyrp4* in AEC und AM Φ ausübt.



Abb. 5.14: Geringere relative Genexpression von *Pglyrp4* in primären AEC von WT Mäusen nach *in vitro* Infektion mit *S. pneumoniae*. AEC, AMΦ, BMMΦ und PMN wurden isoliert und mit *S. pneumoniae* (D39, MOI = 1, 6 h) stimuliert. Die Genexpression wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ Methode relativ zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, sowie zu *Gapdh* ermittelt. Die gestrichelte Linie entspricht der Expression von *Pglyrp4* in der unbehandelten Kontrolle relativ zu *Gapdh*. Mittelwerte + SEM für 4 (AEC und BMMΦ), 3 (AMΦ), bzw. 6 (PMN) Proben. Statistik: *t*-Test mit logarithmierten Werten. * $p \le 0,05$, ns = nicht signifikant.

5.2.4 Höhere Expression von Komplement-Faktoren und IFN-assoziierten Genen in AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen

Um einen Hinweis auf den Mechanismus der veränderten Immunregulation in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie zu ermitteln, wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse in uninfizierten und mit *S. pneumoniae* infizierten AEC durchgeführt. Die Auswahl der AEC für diese Analyse erfolgte aus den folgenden Gründen:

- Sowohl in AMΦ, als auch in AEC war die relative Expression von *Pglyrp4* signifikant durch die Infektion mit *S. pneumoniae* verändert (Abb. 5.14).
- (ii) In Vorarbeiten wurde bereits eine genomweite Genexpressionsanalyse mit AMΦ durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass für einen Großteil der am stärksten regulierten Gene (80% der Top 100 hoch- bzw. runterregulierten Gene) keine Genfunktion bekannt war und die Analyse der verblieben Gene keinen Aufschluss über einen potentiellen Mechanismus ergab [139].
- (iii) AEC bilden den größten Anteil der Lungenoberfläche und sind zahlenmäßig eine der häufigsten Zellen der Lunge [25,26].
- (iv) Sie sind mit den AM Φ die ersten Zellen, die mit eindringende Pathogenen in Kontakt treten [25,26].

Die KEGG-Signalweganalyse ergab, dass Proteine des Herpes-Simplex Infektions (HSI)-Signalwegs und Zelladhäsionsmoleküle zu den am stärksten veränderten Genen im Vergleich von sowohl uninfizierten, als auch infizierten WT vs. PGLYRP4-KO AEC gehören (Abb. 5.15). Insbesondere die Komplementfaktoren *C3* und *Hc*, sowie *Ifng* und der *Ifngr1* sind Gene, die im HSI-Signalweg auftreten und in PGLYRP4-KO AEC stärker exprimiert werden als in WT AEC (Abb. Anhang 1). Für Gene im Zusammenhang mit der Zelladhäsion wurde ebenfalls eine höhere Expression in PGLYRP4-KO vs. WT AEC festgestellt (Abb. Anhang 2).

Durch die Infektion der WT AEC werden insbesondere Gene in Bezug auf das Phagosom und Lysosom und in PGLYRP4-KO AEC zusätzlich Gene in Bezug auf Zytokin-Zytokin-Rezeptor Interaktionen differenziell exprimiert (Abb. 5.15).

Die 50 am stärksten hochregulierten Gene im Vergleich nicht-infizierte bzw. mit Pneumokokken infizierte PGLYRP4-KO vs. WT AEC wurden analysiert (Abb. Anhang 3). Vier der oberen 10 hochregulierten Gene wurden als Hämoglobin-Gene annotiert. Diese waren *Hbb-b2, -bt, -a1* und *-a2*. Des Weiteren wurden in den Top 50 regulierten Genen 19 IFNregulierte und -assoziierte Gene im Vergleich der uninfizierte PGLYRP4-KO vs. WT AEC ermittelt. Im Vergleich zwischen den infizierten PGLYRP4-KO und WT AEC wurden 16 IFNregulierte und -assoziierte Gene gefunden (Abb. Anhang 3). Hierzu gehörten *Slfn4, Ifit1*, Mx2, *Themis2, BC094916, Gbp5* und *Pyhin1* in den unifizierten PGLYRP4-KO vs. WT AEC und *Sldn4, Sldfn5, Batf2, Isg15* und *Ly6c1* in den infizierten PGLYRP4-KO vs. WT AEC. Weitere IFN-regulierte und -assoziierte Gene sind sowohl in uninfizierten, wie auch in infizierten PGLYRP4-KO AEC höher exprimiert als in WT AEC. Dazu gehören *Cxcl10, Fcgr1, Ifi205, Ifi44* und *Ifi441, Ifit2* und *3, Iigp1*, Mm.*33996, Oasl1* und *Rsad2* (Abb. Anhang 3).



Abb. 5.15: Zelladhäsionsmoleküle sind differentiell exprimiert in AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Es wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse mit infizierten (D39, MOI = 1, 6 h) und uninfizierten WT und PGLYRP4-KO AEC durchgeführt. Anschließend wurde ein hierarchisches Signalweg-Clustering anhand der KEGG-Signalwege durchgeführt. Die Signifikanz wurde anhand der Anzahl an unterschiedlich exprimierten Genen innerhalb eines Signalweges ermittelt. Es wurde eine gepoolte Analyse aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Aus dem HSI-Signalweg wurden der Komplementfaktor C3, sowie *Ifng* und sein Rezeptor *Ifngr1* (Abb. Anhang 1) für eine Verifizierung ausgewählt und dessen Expression in AEC, sowie in AM Φ und PMN untersucht.

Für *C3* konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der mittleren Expression auf das 6,9-fache des Kontrollwertes in AEC festgestellt werden (Abb. 5.16A), wohingegen keine signifikanten Änderungen in AM Φ (0,7-fach vs. Kontrolle, Abb. 5.16B) und PMN (1,2-fach vs. Kontrolle, Abb. 5.16C) ermittelt wurden.

Die Genexpression von *Ifng* und *Ifngr1* wurde ebenfalls in AEC (Abb. 5.16D), AM Φ (Abb. 5.16E) und PMN (Abb. 5.16F) untersucht.

Das *Ifng* zeigte in AEC eine signifikante Induktion der mittleren releativen Genexpression auf das 13,4-fache des Kontrollwertes. In AMΦ und PMN zeigte sich keine Änderung der relativen Expression von *Ifng* (0,8- bzw. 0,7-fache der Kontrolle in AMΦ und PMN).

Im Falle des *Ifngr1* konnte eine signifikante Erhöhung der relativen Genexpression in AEC (Abb. 5.16D), aber nicht in AM Φ (Abb. 5.16E) oder PMN (Abb. 5.16F) ermittelt werden. In AEC lag die relative Genexpression beim 3,5-fachen der Kontrolle, wohingegen in AM Φ das 0,5-fache und PMN 1,2-fache gegenüber der Kontrolle berechnet wurden.

Mit Hilfe der qPCR konnten die höheren Expressionslevel für *C3* und *Ifng* aus der genomweiten Genexpressionsanalyse bestätigt werden. Im Gegensatz hierzu war die Expression des *Ifngr1* in der qPCR-Analyse ebenfalls erhöht und zeigt somit die Notwendigkeit zur Verifizierung der genomweiten Genexpressionsanalyse. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Gene in AMΦ und PMN von PGLYRP4-KO Mäusen nicht stärker induziert werden als in WT Mäusen.



Abb. 5.16: Induktion von *C3*, *Ifng* und *Ifngr1* in AEC, aber nicht AM Φ und PMN von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Die Genexpression in den infizierten (D39, MOI = 1, 6 h) Zellen wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ Methode relativ zur jeweiligen, uninfizierten WT-Kontrolle, sowie zu *Gapdh* ermittelt. Die gestrichelte, horizontale Linie entspricht dem Expressionslevel in der infizierten Kontrolle. Mittelwerte + SEM für zwei (AM Φ), drei (AEC), bzw. vier (PMN) Proben. Statistik: *t*-Test mit logarithmierten Werten, * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001, **** p ≤ 0,0001, ns = nicht signifikant.

Zusammengefasst exprimieren AEC von PGLYRP4-KO Mäusen vermehrt den Komplementfaktor *C3* und die IFN- γ -assoziierte Gene *Ifng* und *Ifngr1*. Diese Effekte sind spezifisch für die AEC, da AM Φ und PMN diese Gene nicht differenziell exprimieren.

5.2.5 Höhere Expression der Tight Juntion Gene Cldh18, F11r und Cdh1 und verlängerte Barriereintegrität von PGLYRP4-KO gegenüber WT AEC in vitro

Unter den veränderten Zelladhäsionsmolekülen aus der genomweiten Genexpressionsanalyse wurden die drei am stärksten in PGLYRP4-KO vs. WT AEC hochregulierten Gene zur Verifizierung mittels qPCR ausgewählt. Dies waren *Cldn18*, *F11r* und *Cdh1* (Abb. Anhang 2). Ihre relative Genexpression wurde in AEC von PGLYRP4-KO im Mittel auf das 9,0-fache (*Cldn18* und *F11r*) bzw. 7,0-fache (*Cdh1*) im Vergleich zu den infizierten WT AEC induziert (Abb. 5.17).



Abb. 5.17: Höhere Expression von Zelladhäsionsmolekülen in PGLYRP4-KO vs. WT AEC. Die Genexpression in den infizierten (D39, MOI = 1, 6 h) Zellen wurde mittels $\Delta\Delta C_T$ Methode relativ zur jeweiligen, unbehandelten Kontrolle, sowie zu *Gapdh* ermittelt. Mittelwerte + SEM aus drei WT bzw. vier PGLYRP4-KO Proben. Statistik: *t*-Test mit den logarithmierten Werten. ** $p \le 0.01$.

Durch die höhere Expression von *Tight Junction* Genen (Abb. 5.17 und Abb. Anhang 2) könnte die epitheliale Lungenbarriere widerstandsfähiger gegenüber Pathogen-induzierter Schädigung sein. Dadurch könnte die Epithelintegrität länger aufrechterhalten und möglicherweise die Ausbreitung der Pneumokokken in die Peripherie (Abb. 5.11B) verringert werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Barrierefunktion von *S. pneumoniae*-infizierten AEC mit Hilfe des ECIS-Systems funktional untersucht.

Nach ca. 6,5 hpi nahm der Widerstand der infizierten WT AEC in der ECIS-Messung ab, wodurch eine Auflösung der Zell-Zell-Kontakte angezeigt wurde (Abb. 5.18). Die PGLYRP4-KO AEC zeigen nach ca. 9,5 h erste Anzeichen eines verringerten Widerstandes der Zellschicht. Insgesamt dauerte es ca. 14 h, bis der Widerstand der infizierten PGLYRP4-KO Zellschicht auf demselben Niveau der infizierten WT Zellen lag. Der Unterschied zwischen den WT und PGLYRP4-KO Zellen, in der 50% der Barriere durchbrochen war, betrug ca. 3,5 h und bis die Barriere vollständig durchbrochen wurde, ca. 4 h. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die AEC von PGLYRP4-KO Mäusen die Zell-Zell-Kontakte und somit die

Barrierefunktion in einer Pneumokokkeninfektion länger aufrechterhalten als die AEC von WT Mäusen.



Abb. 5.18: Stärkere alveoläre Barriere von PGLYRP4-KO vs. WT Epithelzellen. AEC von WT und PGLYRP4-KO Mäusen wurden isoliert und für 5 Tage in ECIS-Platten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit *S. pneumoniae* (D39, 10⁶ CFU/ml) infiziert oder nicht. Der Widerstand wurde bei 400 Hz gemessen und auf den Widerstand zwischen 2-4 h normalisiert. WT AEC sind in Rot und PGLYRP4-KO AEC in Blau dargestellt. Mittelwert ± SD von einem Versuch mit 1-2 technischen Replikaten.

Zusammengefasst konnte ermittelt werden, dass AEC von PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen vermehrt die *Tight Junction* Gene *Cldn18*, *F11r* und *Cdh1* exprimieren. Des Weiteren wurde in einem initialen Experiment festgestellt, dass AEC von PGLYRP4-KO Mäusen die Barriereintegrität nach Infektion mit Pneumokokken länger aufrechterhalten als die AEC von WT Mäusen.

5.2.6 Erhöhte Aktivierung von PMN durch den Überstand von AEC von PGLYRP4-KO Mäusen

Eine geringere Bakterienlast in den PGLYRP4-KO gegenüber den WT Mäusen *in vivo* (Abb. 5.11) könnte unter anderem durch mehr Phagozyten (Abb. 5.13D) oder eine stärkere Aktivierung dieser hervorgerufen werden. A. Shrivastav konnte bereits zeigen, dass PMN von PGLYRP4-KO Mäusen durch den Überstand von vorher *in vitro* mit *S. pneumoniae*-infizierten AEC mehr Pneumokokken eliminieren können als PMN von WT Mäusen (Abb. 5.19B, Gruppe 1-4 und [139]). Es blieb die Frage, ob es sich bei diesem Effekt um eine phänotypische Eigenschaft der PMN handelt, oder ob der AEC-Überstand der PGLYRP4-KO Zellen verantwortlich für die erhöhte Eliminierung der PMN war. Zu diesem Zweck wurden ergänzende Untersuchungen durchgeführt und zusammen mit den Daten von A. Shrivastav (A. Shrivastav: n = 3 für die Gruppen 1-4 aus Abb. 5.19B bzw. [139]) dargestellt.

Nicht-aktivierte PMN von WT und PGLYRP4-KO Mäusen zeigen mit 3,7 und $3,2 \cdot 10^6$ verbliebende CFU/ml die gleiche Kapazität zur Eliminierung von *S. pneumoniae* (Abb. 5.19B, Gruppe 1-2 und [139]).

Durch die Aktivierung der PMN mit dem jeweiligen Überstand von infizierten WT bzw. PGLYRP4-KO AEC wurden die PMN von PGLYRP4-KO Mäusen signifikant stärker aktiviert als die PMN von WT Mäusen $(3,3 \cdot 10^5$ bzw. $1,2 \cdot 10^4$ verbliebende CFU/ml durch die PMN von WT bzw. PGLYRP4-KO Mäusen, Abb. 5.19B, Gruppe 3-4 und [139]).

Die PMN von PGLYRP4-KO Tieren, stimuliert mit dem Überstand von WT AEC eliminierten im Mittel etwas weniger Pneumokokken als die WT PMN mit dem Überstand von PGLYRP4-KO AEC ($8,6 \cdot 10^5$ bzw. $9,8 \cdot 10^3$ verbliebende CFU/ml durch die PMN von PGLYRP4-KO bzw. WT Mäusen, Abb. 5.19B, Gruppen 5-6).

Es zeigte sich, dass durch die Stimulation von PMN von WT Mäusen mit dem Überstand von AEC aus PGLYRP4-KO Tieren diese in der Lage waren gleich viele Pneumokokken zu eliminieren, wie die PMN von PGLYRP4-KO Tieren, die mit dem Überstand von AEC aus PGLYRP4-KO Tieren aktiviert wurden. Unter beiden Bedingungen verblieben ca. 10⁴ CFU/ml reproduzierbarer Pneumokokken zum Versuchsende (Abb. 5.19B, Gruppen 4-5).



Abb. 5.19: Der zellfreie AEC-Überstand von PGLYRP4-KO Mäusen aktiviert PMN zu einer besseren Eliminierung von Pneumokokken als der AEC-Überstand von WT Mäusen. Für die Eliminierung von *S. pneumoniae* (D39, MOI = 100, 1 h) wurden PMN und AEC von WT und PGLYRP4-KO (KO4) Mäusen isoliert. Für den Eliminierungsversuch wurden die Pneumokokken mit Serum opsonisiert und (i) zu den WT oder PGLYRP4-KO PMN, (ii) zu den WT oder PGLYRP4-KO PMN die vorher für 30 min mit dem Überstand der entsprechenden AEC vorinkubiert wurden oder (iii) zu den WT oder PGLYRP4-KO PMN die vorher für 30 min mit dem AEC Überstand des jeweils anderen Phänotyps vorinkubiert wurden gegeben. Die AEC wurden mit *S. pneumoniae* (D39, MOI = 1, 16 h) stimuliert, der Überstand wurde abgenommen und filtriert (0,22 μ m). Die Werte sind die Mittelwerte + SEM von 3 (Gruppe 1-2), bzw. 5-6 (Gruppe 3-6) Versuchen. Die gestrichelte Linie zeigt die Anfangsmenge an *S. pneumoniae*. Statistik: One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test mit den logarithmierten Daten: p * \leq 0,05, p *** \leq 0,001.

5.2.7 Proteolytischer Abbau von PGLYRP4 durch Pneumokokken

Das PGLYRP4 gilt im Allgemeinen als antibakteriell [93,103], was jedoch im Kontrast zu den vorliegenden Daten einer verringerten Bakterienlast in PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen steht (Abb. 5.11). Zudem wurde bereits gezeigt, dass rPGLYRP4 keinen direkten antibakteriellen Effekt gegenüber Pneumokokken hat [139]. Dies deutet darauf hin, dass PGLYRP4 nicht maßgeblich an der direkten Eliminierung von Pneumokokken beteiligt ist. Möglicherweise besitzen Pneumokokken bestimmten Virulenzfaktoren zum Schutz vor den PGLYRP. Pneumokokken besitzen mindestens drei Serin- und vier Metalloproteasen, welche einerseits an der Oberfläche verankert sind [47,150] und im Falle der IgA1 Protease, zusätzlich sekretiert werden [48]. Ein potentieller Mechanismus könnte sein, dass *S. pneumoniae* gebundenes oder in der Nähe vorliegendes PGLYRP proteolytisch abbaut.

Eine Inkubation von rPGLYRP4 mit Pneumokokken zeigte, über die Detektion der Proteine mittels einer Coomassie-Brillant-Blau Färbung, dass Pneumokokken in der Lage sind, rPGLYRP4 abzubauen (Abb. 5.20). Dieser Effekt konnte durch den zusätzlichen Einsatz eines Proteaseinhibitors (spezifisch für Serin-, Cystein- und Metalloproteasen) inhibiert werden.



Abb. 5.20: Rekombinantes PGLYRP4 wird durch Pneumokokken-Proteasen abgebaut. S. pneumoniae (D39, $5 \cdot 10^4$ CFU) wurden mit rPGLYRP4 (2,5-5 µg) mit und ohne Proteaseinhibitor für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die relative Proteinmenge über eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung ermittelt. Mittelwert + SEM von vier Versuchen. Statistik: one-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test, *** p ≤ 0,001, **** p ≤ 0,001, ns = nicht signifikant.

5.2.8 Größere Artenvielfalt und β-Diversität im Caecum von uninfizierten PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen

Es konnte gezeigt werden, dass sich *S. pneumoniae* u. a. durch Proteasen vor einer möglichen direkten antibakteriellen Wirkung von rPGLYRP4 schützen kann (Abb. 5.20). Des Weiteren weißt der PGLYRP4-KO eine Verbesserung der klinischen Symptome und eine geringere

Bakterienlast auf (Abb. 5.11). Demnach scheinen indirekte immunmodulatorische Effekte ursächlich für den Phänotyp zu sein. Hierzu zählen u. a. erhöhte Inflammation (Abb. 5.12 und 5.13) und vermehrt und stärker aktivierte PMN in der Lunge (Abb. 5.13 und 5.19). Des Weiteren ist bekannt, dass das Darmmikrobiom nicht nur einen Einfluss auf Erkrankungen des Darmes, sondern auch auf z. B. Lungenerkrankungen wie die Pneumonie haben kann [130,132]. In PGLYRP4-KO Mäusen wurden bereits Veränderungen des Mikrobioms nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Schwere von DSS-induzierter Kolitis in Verbindung gebracht [111,117]. Metabolite der Mikrobiota, wie die SCFA können einen Einfluss auf Entzündungsprozesse und Zytokinausschüttung haben [133,134] und somit möglicherweise einen Beitrag zum Phänotyp der PGLYRP4-KO Maus in der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie leisten. Daher wurde überprüft, ob das Mikrobiom der PGLYRP4-KO Mäuse auch im verwendeten Krankheitsmodell verändert ist. Zu diesem Zweck wurde das *Caecum*-Mikrobiom von uninfizierten und für 48 h mit Pneumokokken infizierte WT und PGLYRP4-KO Mäuse auf verschiedenen taxonomischen Ebenen untersucht.

Zunächst wurden die Bakterien anhand ihrer Ähnlichkeit in OTU eingeordnet. Die Analyse für die *Caecum*-Proben von den uninfizierten Tieren ergaben im Mittel 385 (WT) bzw. 528 (PGLYRP4-KO) verschiedene OTU und die Artenvielfalt im *Caecum* der PGLYRP4-KO Mäuse war signifikant größer als bei den WT Mäusen (Abb. 5.21). Dahingegen wurde kein Unterschied im *Caecum* 48 h nach der Infektion gefunden. Hier lag die mittlere Anzahl an OTU bei 422 (WT) und 370 (OTU). Des Weiteren gab es keine signifikante Änderung durch die Infektion in WT, aber eine signifikante Reduktion der Artenvielfalt in PGLYRP4-KO Mäusen. Somit zeigen PGLYRP4-KO Mäuse eine höhere Artenvielfalt im *Caecum* gegenüber WT Mäusen im uninfizierten, aber nicht im infizierten Status.



Abb. 5.21: Höhere α -Diversität des *Caecum*-Mikrobioms in uninfizierten PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Für die Analyse der OTU im *Caecum* von uninfizierten und infizierten (A66, 10⁵ CFU, 48 h) WT und PGLYRP4-KO Mäusen wurde die V4 Region der 16S rRNA sequenziert, anhand der SILVA-Datenbank [144] annotiert und mit dem Programm *Mothur* [142] ausgewertet. Insgesamt wurden Proben von 19 uninfizierten WT, 11 uninfizierten PGLYRP4-KO, 20 infizierten WT und 9 infizierten PGLYRP4-KO Mäusen verwendet. Die horizontalen Linien geben die Mittelwerte wieder. Statistik: One-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test: *** p \leq 0,001, ns = nicht signifikant, KO4 = PGLYRP4-KO.

Die Artenvielfalt der Mikrobiota ist ein wichtiges Maß für die Gesundheit [126,127], doch zeigt sie nicht an, welche Bakterienarten oder in welchem Mengenverhältnis sie vorhanden sind. Daher können sich auch Mikrobiome mit unterschiedlich vielen OTU stark ähneln, bzw. bei einer gleichen Anzahl an OTU voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurde als nächstes die β -Diversität untersucht. Wie bereits für die α -Diversität gesehen (Abb. 5.21), zeigte sich nur eine geringe Überlappung der Datenpunkte für die uninfizierten Proben, wodurch eine Unähnlichkeit der Proben angezeigt wird (Abb. 5.22A). Dahingegen unterscheiden sich die *Caecum*proben in der Infektion kaum voneinander (Abb. 5.22B).



Abb. 5.22: Unterschiede in der β-Diversität der Mikrobiome im *Caecum* zwischen uninfizierten, aber nicht zwischen infizierten WT und PGLYRP4-KO Mäusen. Die Mikrobiomdaten wurden mit Hilfe einer multidimensionalen Skalierung (*thetaYC* Funktion von *Mothur* [142]) anhand ihrer Unähnlichkeit verglichen. Gezeigt werden die zwei Achsen (*principal coordinate*, PC), welche die größten Variationen zwischen den Proben erklären. Die Zahlen an den Achsen weisen den Anteil an Variation aus, welcher durch diese Achse erklärt wird. A) Uninfizierte *Caecum*proben von WT (19 Proben, Blau) und PGLYRP4-KO (11 Proben, Grün) und B) infizierte *Caecum*proben (A66, 10⁵ CFU, 48 h) von WT (20 Proben, Lila) und PGLYRP4-KO (9 Proben, Rot).

Für die genauere Analyse der β-Diversität wurde eine Untersuchung auf Ebene des Phylums durchgeführt (Abb. 5.23). Im *Caecum* wurden Unterschiede zwischen uninfizierten WT und PGLYRP4-KO, jedoch nicht zwischen infizierten WT und PGLYRP4-KO Mäusen festgestellt. Der Anteil an *Bacteroidetes* in *Caeca* von uninfizierten PGLYRP4-KO Mäusen ist mit 36% größer als im WT, in denen 21% diesem Phylum zugeordnet werden können. Damit einhergehend sind *Firmicutes* geringer in den PGLYRP4-KO Mäusen vertreten (48% in PGLYRP4-KO vs. 69% in WT). Des Weiteren sind *Proteobacteria* ebenfalls häufiger in PGLYRP4-KO vs. WT *Caeca* gefunden worden (5,8% vs. 3,5% in PGLYRP4-KO vs. WT).



Abb. 5.23: Mehr *Bacteroidetes* und *Proteobacteria* im *Caecum* von uninfizierten PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Die Mikrobiome wurden anhand der SILVA-Datenbank annotiert und den einzelnen Phyla zugeordnet. Phyla, die einen relativen Anteil von weniger als 2% aufwiesen wurden als "Andere" definiert. Insgesamt wurden Proben von 19 uninfizierten WT, 11 uninfizierten PGLYRP4-KO, 20 infizierten (A66, 10⁵ CFU, 48 h) WT und 9 infizierten PGLYRP4-KO Mäusen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte der Analysen. KO4 = PGLYRP4-KO.

Des Weiteren wurden die Mikrobiome auf der Ebene der Bakterien-Familien analysiert (Abb. 5.24). In dieser Analyse wurden die *Lachnospiraceae* als größte Gruppe ermittelt und waren in uninfizierten PGLYRP4-KO gegenüber WT *Caeca* reduziert. In PGLYRP4-KO *Caeca* machten sie nur 25% alle Bakterien-Familien aus, wohingegen sie in uninfizierten WT, infizierten WT bzw. infizierten PGLYRP4-KO 53%, 54%, bzw. 48% ausmachten. In uninfizierten PGLYRP4-KO *Caeca* wurden jedoch mehr *Bacteroidales* (S24-7 Gruppe) und mehr *Prevotellaceae* (15% bzw. 1,33%) detektiert, als in den *Caeca* von uninfizierten WT (7,1% bzw. 0,35%). In den infizierten WT und PGLYRP4-KO Proben waren die Anteile an diesen beiden Gruppen mit 11,5% und 8,6% für *Bacteroidales* in WT und PGLYRP4-KO bzw. 0,87% und 2,41% für *Prevotellaceae* in WT und PGLYRP4-KO vergleichbar. Der größere Mittelwert für die Familie der *Prevotellaceae* in infizierten PGLYRP4-KO vs. WT *Caeca* kann mit einem einzelnen Ausreißer begründet werden.



Abb. 5.24: Weniger Lachnospiraceae und mehr Bacteroidales und Prevotellaceae in uninfizierten, aber nicht in infizierten PGLYRP4-KO vs. WT Caeca. Die Caecum-Mikrobiome von uninfizierten und infizierten (A66, 10⁵ CFU, 48 h) WT und PGLYRP4-KO Mäusen wurden mit Hilfe der SILVA-Datenbank annotiert und den Bakterien-Familien zugeordnet. Familien, die eine relativen Anteil von weniger als 2% aufwiesen wurden als "Andere" definiert. Insgesamt wurden Proben von 19 uninfizierten WT, 11 uninfizierten PGLYRP4-KO, 20 infizierten WT und 9 infizierten PGLYRP4-KO Mäusen verwendet. Die Mittelwerte der Analysen werden dargestellt. KO4 = PGLYRP4-KO.

Somit zeichnen sich PGLYRP4-KO Tiere in ihrem basalen Mikrobiom im *Caecum* durch eine höhere Artenvielfalt, mit mehr *Bacteroidetes*, insbesondere der Familien *Bacteroidales* und *Prevotellaceae*, sowie weniger *Firmicutes*, insbesondere der Familie *Lachnospiraceae*, aus. In der Infektion von *S. pneumoniae* gleichen sich die Mikrobiome der beiden Gruppen einander an, sodass 48 hpi keine Unterschiede zwischen den infizierten WT und PGLYRP4-KO Tieren in den Mikrobiomen im *Caecum* bestanden.

5.2.9 Die Vergesellschaftung von WT bzw. PGLYRP4-KO Tieren mit keimfreien WT Mäusen ist ausreichend für die Übertragung der Mikrobiota

Auf Grundlage der Unterschiede der Mikrobiome in WT und PGLYRP4-KO Mäusen, sowie der Assoziationen zwischen (Darm-)Mikrobiota und Gesundheit (u. a. [126,127,130]) wurde überprüft, ob die Mikrobiota von PGLYRP4-KO einen protektiven Effekt auf die Pneumokokken-induzierte Pneumonie ausübt. Hierfür wurden keimfreie BALB/c WT Weibchen mit den konventionell, SPF gehaltenen BALB/c WT oder PGLYRP4-KO Weibchen für 5-6 Wochen vergesellschaftet.

Zur Überprüfung der Mikrobiota-Übertragung wurden im Anschluss Proben entnommen und mit Hilfe der 16S rRNA Sequenzierung analysiert. Zwischen den WT und den ehemaligen keimfreien WT Mäusen mit WT Mikrobiota (WT-Gnoto), als auch zwischen PGLYRP4-KO und den ehemaligen keimfreien WT Mäusen mit PGLYRP4-KO Mikrobiota (KO4-Gnoto) Tieren, wurden keine signifikanten Unterschiede in der β -Diversität der Mikrobiome festgestellt (Abb. 5.25).



Abb. 5.25: Das Mikrobiom von WT bzw. PGLYRP4-KO Mäusen konnte durch Vergesellschaftung erfolgreich auf keimfreie WT Mäuse übertragen werden. Die *Caecum*-Mikrobiome von uninfizierten WT und PGLYRP4-KO Mäusen wurden mit Hilfe der SILVA-Datenbank annotiert und den Bakterien-Familien zugeordnet. Familien, die eine relativen Anteil von weniger als 1% aufwiesen wurden als "Andere" definiert Insgesamt wurden 5-6 Proben pro Gruppe verwendet und die Mittelwerte der Auswertung dargestellt. KO4 = PGLYRP4-KO

5.2.10 Induktion des PGLYRP4-KO Phänotyps in keimfreien WT Mäusen durch Übertragung der Mikrobiota

Nachdem festgestellt wurde, dass nach der Übertragung der Mikrobiota keine Unterschiede in der β-Diversität der Mikrobiome zwischen Donor- und Akzeptor-Mäusen auftraten, sollte der Phänotyp der vergesellschafteten Tiere untersucht werden. Hierfür wurden die Tiere mit

S. pneumoniae infiziert und die Bakterienlast nach 48 h in der Lunge, der Milz und dem Blut analysiert.

Die mittlere bakterielle Belastung in den Lungen von PGLYRP4-KO Mäusen war ca. 1,5-log geringer als in WT Tieren $(8,2 \cdot 10^6 \text{ in WT vs. } 1,9 \cdot 10^5 \text{ CFU}$ in PGLYRP4-KO, Abb. 5.26A). In den kolonisierten keimfreien Mäusen wurden jeweils mehr Pneumokokken nachgewiesen als in den konventionell geborenen Mäusen. Zusätzlich wiesen die WT-Gnoto mehr Bakterien in den Lungen als die KO4-Gnoto Mäuse auf $(1,8 \cdot 10^8 \text{ in WT-Gnoto vs. } 2,6 \cdot 10^7 \text{ in KO4-Gnoto}).$

Im Blut zeigten sich ähnliche Trends wie bereits in den vorangegangenen Versuchen mit WT und PGLYRP4-KO Mäusen, obgleich die Unterschiede leicht oberhalb des Signifikanzniveaus von p = 0,05 lagen. In den WT Mäusen, im Vergleich zu den PGLYRP4-KO Mäusen, wurden im Mittel 0,5 log mehr Bakterien und in den WT-Gnoto vs. KO4-Gnoto fast 1-log mehr Bakterien festgestellt (WT: $7,7 \cdot 10^3$ CFU/ml, PGLYRP4-KO: $3,5 \cdot 10^3$ CFU/ml, WT-Gnoto: $1,1 \cdot 10^5$ CFU/ml, KO4-Gnoto: $2,0 \cdot 10^4$ CFU/ml, Abb. 5.26B). Im Vergleich der bakteriämischen und nicht-bakteriämischen Tiere zeigt sich jedoch eine signifikante Reduktion an bakteriämischen Tieren im PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen (15 von 29 Tieren, bzw. 52% in WT gegenüber 6 von 29 Tieren, bzw. 21% in PGLYRP4-KO, Abb. 5.26E). Ein ähnlicher Trend konnte auch bei den kolonisierten, ehemaligen keimfreien Tieren beobachtet werden. Hier waren 7 von 10 (70%) WT-Gnoto Tieren bakteriämisch, aber nur 4 von 10 (40%) KO4-Gnoto Tiere.

In der Milz wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der bakteriellen Belastung um 1,5-log in PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen $(1,3 \cdot 10^5 \text{ in WT vs. } 7,9 \cdot 10^3 \text{ CFU}$ in PGLYRP4-KO, Abb. 5.26C) und im Mittel eine Reduktion um 1,5-log in WT-Gnoto gegenüber KO4-Gnoto festgestellt $(1,4 \cdot 10^6 \text{ in WT-Gnoto vs. } 8,7 \cdot 10^4 \text{ CFU}$ in KO4-Gnoto).

Vom Grad der Erkrankung zeigten sowohl die PGLYRP4-KO Mäuse, wie auch die WT Mäuse nur geringe Anzeichen. Die WT Mäuse erreichten mit 2,1 Punkten einen etwas höheren Erkrankungsgrad als die PGLYRP4-KO Mäuse mit 1,6 Punkte auf einer Skala von mindestens 1 (keine Anzeichen) und maximal 12 Punkten (Abb. 5.26D). Die ehemaligen keimfreien WT Tiere zeigten jeweils einen höheren Erkrankungsgrad als die entsprechenden WT (2,1 für WT bzw. 5,6 für WT-Gnoto) und PGLYRP4-KO Tiere (1,6 für PGLYRP4-KO bzw. 2,8 für die KO4-Gnoto). Zusätzlich wiesen die WT-Gnoto Tiere einen signifikant höheren Krankheitsgrad auf als die KO4-Gnoto Tiere. Somit wurde die geringere bakterielle Belastung, die geringere Bakteriämie und das bessere klinische Erscheinungsbild der PGLYRP4-KO gegenüber den WT Mäusen ebenfalls in den ehemaligen keimfreien Tieren ermittelt.



Abb. 5.26: Die Mikrobiota von PGLYRP4-KO Tieren sind protektiv gegenüber einer *S. pneumoniae*induzierten Pneumonie. WT und WT-Gnoto, sowie PGLYRP4-KO und KO4-Gnoto Tiere wurden während des Versuches weiter vergesellschaftet und mit *S. pneumoniae* (A66, 10⁵ CFU) infiziert. Nach 48 h wurde die bakterielle Belastung A) in der Lunge, B) im Blut und C) in der Milz ermittelt. Die horizontale, gestrichelte Linie zeigt die untere Detektionsgrenze. Zusätzlich wurden D) die Anzeichen einer Erkrankung (1 = keine Anzeichen, max. 12) anhand des klinischen Monitorings ermittelt und E) die Tiere anhand einer vorliegenden Bakteriämie eingeteilt. Für die bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Gruppen wurden die bakteriämischen und nicht bakteriämischen Tiere in % dargestellt, wohingegen die Statistik mit der genauen Anzahl durchgeführt wurde. Es wurden 29 (WT und PGLYRP4-KO) bzw. 10 (WT-Gnoto und KO4-Gnoto) Tiere je Gruppe verwendet. In D) sind zusätzlich 4 WT und PGLYRP4-KO Tiere aus der histologischen Analyse enthalten. Es werden A-C) die Mittelwerte bzw. D) die Mittelwerte + SEM dargestellt. Für die statistische Auswertung wurden die nicht detektierten Proben auf die Hälfte der Detektionsgrenze angepasst. Statistik: A-D) one-way ANOVA mit Holm-Sidak post-hoc Test und den logarithmierten Werten, E) Chi²-test, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, **** p ≤ 0,0001, ns = nicht signifikant.

6 Diskussion

Aufgrund der stetigen Zunahme von Antibiotika-resistenten Bakterienstämmen und der Stagnation in der Neuentwicklung von Antibiotika besteht dringender Bedarf an neuen Therapiekonzepten [22,151]. Insbesondere bei einer Pneumokokkeninfektion, welche trotz guter Wirksamkeit von Antibiotika lebensbedrohlich sein kann und weltweit zu den häufigsten Todesursachen zählt, sind zwingend innovative Behandlungsmöglichkeiten gefragt [3,4,9]. Die Aufklärung hochkonservierter Abwehrmechanismen, wie z. B. Wirts-Abwehrproteine des angeborenen Immunsystems, bietet ein großes Potential diese Mechanismen für innovative Therapieansätze nutzbar zu machen.

Die PGLYRP gehören zur körpereigenen, angeborenen Immunabwehr und weisen zum einen direkte antibakterielle Eigenschaften gegenüber einer Vielzahl an Bakterien und zum anderen immunmodulatorische Funktionen auf [93,103,104,106,114,115,152]. Für das PGLYRP2 wurde zudem nachgewiesen, dass es PGN hydrolysiert und somit potentiell die Erkennung von Bakterien durch Immunrezeptoren, wie NOD2 und NLRP3, verändern kann [94,153,154]. Bislang sind nur zwei Studien zur Wechselwirkung von Pneumokokken und PGLYRP in der Literatur veröffentlicht [139,155]. Um weitere Interaktionen und mögliche Mechanismen von PGLYRP zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss von den Peptidoglykanerkennenden Proteinen PGLYRP2 und PGLYRP4 in einem Modell der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie untersucht.

6.1 Der PGLYRP2-KO führt zu einer verringerten Immunabwehr in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie

In Mäusen führt der Verlust des PGLYRP2 zu einem beschleunigten Verlauf der Pneumonie aufgrund eines früheren Eintretens einer Bakteriämie. Diese Effekte beruhen auf einer indirekten Immunmodulation der proinflammatorischen Zytokinausschüttung in der Lunge, infolgedessen weniger PMN in die Lungen der PGLYRP2-KO gegenüber der WT Mäuse infiltrieren. Dies führt dazu, dass die PGLYRP2-KO Tiere früher euthanasiert werden mussten, als die WT Mäuse.

6.1.1 Erhöhte Expression von Pglyrp2 in Phagozyten, aber nicht in Lungenepithelzellen nach Infektion mit S. pneumoniae

Um das Zusammenspiel des angeborenen Immunsystems mit einer pulmonalen Pneumokokkeninfektion zu untersuchen, wurde zunächst die Induzierbarkeit des Pglyrp2 in residenten Lungenzellen (AEC und AM Φ), sowie in die Lungen rekrutierter Immunzellen (PMN und BMM Φ) von WT Mäusen untersucht. Die Analyse zeigte, dass *Pglyrp2* durch die Infektion mit *S. pneumoniae* in PMN und BMM Φ signifikant induziert werden konnte. In AM Φ wurde ebenfalls eine Erhöhung der mittleren Expression festgestellt, jedoch variieren die Messwerte zwischen den einzelnen Proben stark, sodass diese Erhöhung nicht signifikant war. Die Expressionsdaten für AEC waren vergleichbar zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen.

Es ist bekannt, dass PGLYRP2 hauptsächlich in der Leber produziert und anschließend ins Blut sekretiert wird [92]. Als weitere Expressionsorte sind u. a. die Haut und der GI-Trakt beschrieben [97,156]. Weitere Studien konnten keine oder eine sehr geringe Menge an *Pglyrp2* in Organen wie der Lunge detektieren [99,156]. Auch in dieser Arbeit war eine Detektion von *Pglyrp2* zunächst nur in einzelnen Proben möglich. Erst durch die Präamplifikation konnte eine stabil detektierbare Expression von *Pglyrp2* ermittelt werden. Somit ist es nicht verwunderlich, dass in anderen Arbeiten, die Expression in der Lunge und im speziellen PMN, BMM Φ und AM Φ nicht beschrieben wurde.

Des Weiteren zeigte Maniar-Hew und Kollegen, dass *Pglyrp2* im Lungenepithel von Rhesusaffen exprimiert wird und dass eine Stimulation mit LPS zu einer Induktion im Epithel von juvenilen, aber nicht von adulten Affen führt [99]. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde keine Induktion von *Pglyrp2* in den AEC von adulten Mäusen durch Stimulation mit *S. pneumoniae* festgestellt. Dies lässt auf vergleichbare Mechanismen in der Induktion von *Pglyrp2* zwischen Affen und Mäusen schließen. Zusätzlich legen diese Daten nahe, dass das PGLYRP2 in unterschiedlichen Zellen, zu unterschiedlichen Zeiten der Entwicklung, einen Einfluss ausüben könnte. Entwicklungs- und Verhaltensstudien von Arentsen und Kollegen unterstützten diese Hypothese. Sie zeigten Unterschiede im Sozialverhalten von Mäusen, die auf den PGLYRP2-KO zurückzuführen waren [113,157]. Die Induktion von *Pglyrp2* in phagozytierenden Zellen, aber nicht in AEC, lässt zudem auf eine spezifische Immunreaktion in ausgewählten Zelltypen schließen. Insbesondere die phagozytierenden Zellen sind essenziell zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen [25,26,158] und die veränderte *Pglyrp2* Expression könnte auf eine veränderte Erkennung von Pathogenen oder Aktivierung der Phagozyten hindeuten.

6.1.2 Höhere bakterielle Belastung in der Peripherie und weniger PMN-Infiltration in die Lungen von PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen

Um den Einfluss von PGLYRP2 auf den Verlauf und die Schwere der Pneumokokkeninfektion in Mäusen zu untersuchen, wurden WT und PGLYRP2-KO Mäuse mit *S. pneumoniae* transnasal infiziert. Anschließend wurde die bakterielle Belastung nach 12 und 48 h lokal in der Lunge und peripher im Blut und der Milz untersucht. Im frühen Verlauf der Erkrankung waren keine Unterschiede zwischen den WT und PGLYRP2-KO Mäusen feststellbar. Klinische Symptome, wie ungepflegtes Fell, Gewichts- oder Temperaturverlust, waren nicht vorhanden. Nach 48 h wiesen PGLYRP2-KO Mäuse eine erhöhte Bakterienbelastung in der Milz auf. Im Blut war die Belastung tendenziell erhöht, nicht jedoch in der Lunge. Diese Effekte könnten verschiedenen Ursprungs sein. Die erhöhte bakterielle Belastung in der Milz könnte darauf schließen lassen, dass vermehrt Bakterien aus der Lunge in die Peripherie disseminieren und auf Grund der Filterleistung in der Milz akkumulieren. Dies erklärt ebenfalls, warum die bakterielle Belastung im Blut nicht eindeutig erhöht ist.

PGLYRP2 ist sowohl als pro- als auch anti-inflammatorisch wirkendes Protein beschrieben und inflammatorische Prozesse sind eng mit der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen, der direkten Eliminierung von Pathogenen, sowie der Erneuerung, aber auch Schädigung von körpereigenem Gewebe verknüpft [95,100,110,111,159–161]. Eine veränderte. inflammatorische Immunantwort in der Lunge könnte eine Erklärung für eine erhöhte Dissemination von Bakterien aus den Lungen von PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen sein. Um diese Hypothese genauer zu analysieren, wurden proinflammatorische Zytokine in den Lungen von WT und PGLYRP2-KO Mäusen quantifiziert. IL-6, KC, IFN-γ und TNF-α waren in den PGLYRP2-KO Mäusen gegenüber den WT Mäusen reduziert. Daher scheint die höhere Dissemination der Bakterien aus der Lunge nicht durch eine inflammatorische Schädigung der Lungenbarriere hervorgerufen zu sein.

Durch durchflusszytometrische Untersuchungen wurde ein signifikant reduzierter Anteil an PMN in PGLYRP2-KO im Vergleich zu WT Mäusen festgestellt. Diese Zellen sind essenziell für die Kontrolle und Eliminierung von bakteriellen Infektionen [161,162]. Zytokine wie IL-6, KC, IFN- γ und TNF- α , spielen eine wichtige Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung von phagozytischen PMN [55,58,59,163]. Dies lässt darauf schließen, dass es durch die Reduktion proinflammatorischer Zytokine zu einer verringerten Rekrutierung von PMN kommt. Infolgedessen erfolgt ein schnellerer oder vermehrter Durchbruch von Bakterien aus der Lunge in die Peripherie auf Grund einer reduzierten Erregerkontrolle und -eliminierung.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Rekrutierung von PMN in die Milz ebenfalls beeinträchtigt sein könnte. Die PGLYRP2-KO Mäuse weisen in der Milz, jedoch nicht im Blut, eine erhöhte Erregerlast gegenüber WT Mäusen auf. Folglich könnte die Eliminierung innerhalb der Milz beeinträchtigt sein. Unterstützt wird diese Hypothese durch einer Studie zur chemischinduzierter Arthritis [100], in der WT und PGLYRP2-KO Mäusen MDP bzw. PGN intravenös appliziert und die Entwicklung einer Arthritis in den hinteren Läufen analysiert wurde. Die PGLYRP2-KO wiesen einer Reduktion der relativen mRNA Expression von proinflammatorischen Zytokinen und einer verringerten Infiltration von PMN in die hinteren Extremitäten auf. Dadurch waren die PGLYRP2-KO Mäuse nahezu komplett von der Entwicklung der Arthritis geschützt [100]. Folglich könnte die reduzierte Infiltration von PMN ein genereller Mechanismus sein und ebenfalls in der Milz stattfinden.

Daher ist die reduzierte proinflammatorische Zytokinexpression, mit einer Reduktion an phagozytischen PMN in den Lungen und ggf. Milz von PGLYRP2-KO Mäusen eine plausible Erklärung für die Erhöhte bakterielle Belastung in der Peripherie gegenüber WT Mäusen.

6.1.3 Beschleunigter Verlauf der Pneumonie und früheres Erreichen der Abbruchkriterien in PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen

In der approximativen Sterblichkeitsuntersuchung erreichten die PGLYRP2-KO Mäuse früher die vordefinierten Abbruchkriterien und zeigten nach 3 Tagen einen höheren Krankheitsgrad als die WT Mäuse. Interessanterweise war die approximative Gesamtüberlebensrate zwischen PGLYRP2-KO und WT Mäusen gleich hoch. Für diese Beobachtung kann es verschiedene Begründungen geben: i) Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, dass PMN in die Lungen der PGLYRP2-KO Mäuse infiltrierten. Möglicherweise werden im Verlauf der Erkrankung genügend PMN rekrutiert, sodass die Pathogene nach einer längeren Krankheitsphase eliminiert wurden. ii) Es zeigte sich eine Reduktion von PMN, aber nicht von anderen Immunzellen wie AMΦ, DC und NK-Zellen. Diese könnten die reduzierte Pathogeneliminierung durch andere, nicht-phagozytische Mechanismen kompensieren. (iii) Nach ca. fünf Tagen mussten kaum noch Tiere euthanasiert werden. Dies fällt in etwa in den Zeitraum, in dem spezifische Antikörper gebildet werden [164,165]. Demnach könnte das Versagen des angeborenen Immunsystems durch das erworbene Immunsystem ausgeglichen werden und eine weitere Verschlechterung der Überlebensrate verhindern.

Das frühe Erreichen der Abbruchkriterien deckt sich mit einer verringerten Immunantwort und der reduzierten Infiltration an PMN 48 hpi, welche vermutlich zu einem beschleunigten Krankheitsverlauf führt. Dieser Nachteil in der Erregerkontrolle wird nach 4-5 Tagen von anderen, bislang unbekannten Mechanismen ausgeglichen, wodurch eine weitere Krankheitsprogredienz verhindert wird.

6.1.4 Implikationen des schnelleren Krankheitsverlaufes in PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen für den Menschen

Obwohl die Gesamtüberlebensrate in WT und PGLYRP2-KO Mäusen keine Unterschiede aufzeigt, kann der schnellere Verlauf der Erkrankung von klinischer Bedeutung sein. So ist bekannt, dass es verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) im Gen von PGLYRP2 gibt. Diese könnten zu einer Reduktion oder dem Verlust der Aktivität von PGLYRP2 führen. Eine Untersuchung zum Zusammenhang von SNP im PGLYRP2 und Lungenerkrankungen oder *S. pneumoniae*-Infektionen sind bislang nicht bekannt, jedoch sind SNP mit der Parkinson-Krankheit oder mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert worden [112,166]. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist es durchaus denkbar, dass SNP im PGLYRP2-Gen den klinischen Verlauf von Krankheiten wie der Pneumonie beeinflussen können. Durch einen schnelleren Verlauf der Pneumonie würde weniger Zeit für die Therapie verbleiben. Insbesondere bei Komorbiditäten oder einem allgemein geschwächten Immunsystem durch das Alter, könnte das Überleben von Patienten signifikant beeinflussen werden.

6.1.5 Die verringerte Abwehrleistung in PGLYRP2-KO Mäusen ist nicht abhängig von direkten antibakteriellen Effekten, IκBα oder der Darmmikrobiota

Ein zusätzlicher Mechanismus für den schlechteren Verlauf der Pneumonie in PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen könnte ein direkter antibakterieller Effekt von PGLYRP2 sein. Dieses liegt hauptsächlich als freies Protein im Blut vor und könnte dort und in stark durchbluteten Organen wie der Milz direkt antibakteriell wirken [167].

In dieser Studie zeigte rPGLYRP2 keinen antibakteriellen Effekt auf die bekapselten und kapseldefizienten *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39 Δ Cps. Dies steht im Gegensatz zu aktuellen Studien, welche für humanes rPGLYRP2 direkte antibakterielle Wirkung gegen intraund extrazelluläre grampositive und –negative Bakterien *in vitro* nachgewiesen haben [104,152]. Eine antibakterielle Wirkung von PGLYRP gegen *S. pneumoniae* ist in der Literatur allerdings nicht beschrieben. Andererseits ist bekannt, dass die PGLYRP nur antibakteriell wirken, wenn diese *N*-glykolysiert sind [93] und Pneumokokken *N*-Glykosidasen, sowie Proteasen exprimieren [17,42] und somit möglicherweise die antibakterielle Wirkung der PGLYRP inhibieren können.

Der Transkriptionsfaktor NF-kB steuert u. a. die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und es ist bekannt, dass dieser durch andere PGLYRP beeinflusst wird. So konnte

Zenhom *et al.* zeigen, dass PGLYRP3 die Expression von I κ B α , welcher NF- κ B inhibiert, induziert und somit zu einer verringerten Transkriptionsleistung von NF- κ B-abhängigen Genen führt [115]. Unter Vorrausetzung einer vergleichbaren Wirkung von PGLYRP2, aufgrund der starken Ähnlichkeit der Moleküle, würde der PGLYRP2-KO zu einer erhöhten Expression von I κ B α und somit einer Unterdrückung von NF- κ B und der Zytokinausschüttung führen. Allerdings wurden keine Unterschiede zwischen der relativen Proteinmenge von I κ B α in den Lungen von infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen gefunden. Dies schließt jedoch die Regulierung des NF- κ B Signalweges durch PGLYRP2 nicht ganz aus. Andere Faktoren oberhalb von NF- κ B, oder auch NF- κ B selbst, könnten differenziell reguliert sein. Des Weiteren haben Zenhom *et al.* die Regulation von I κ B α auf Genebene gezeigt [115], sodass durchaus eine Diskrepanz zwischen Gen- und Proteinlevel vorhanden sein könnte.

PGLYRP2 kann durch seine Amidase-Funktion die Erkennung von PGN und PGN-Fragmenten beeinflussen und somit möglicherweise die Erkennung von Bakterien durch Immunrezeptoren wie NOD2 und NLRP3 verringern [154]. Dadurch kann es zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Mikrobiota in PGLYRP2-KO gegenüber WT Mäusen kommen. Dies wiederum beeinflusst die Zusammensetzung von Stoffwechselprodukten wie z. B. die SCFA Acetat, Propionat und Butyrat, welche das Immunsystem beeinflussen können [133,134]. Im Rahmen dieser Studie konnten allerdings keine Unterschiede in der Anzahl von OTU, der α-Diversität oder der Zusammensetzung der Bakterien auf Phylum und Familien-Ebene festgestellt werden. Diese Ergebnisse wiedersprechen zum Teil publizierten Ergebnissen [111,117]. Es muss jedoch bedacht werden, dass es deutliche Unterschiede im Aufbau und in der Auswertung der Experimente, sowie in der verwendeten 16S rRNA Sequenzierung zwischen den Studien gibt. So wurden unter anderem unterschiedliche 16S rRNA Regionen betrachtet (V4 in dieser bzw. V4-V6 Region in [117]) und die Amplifikate waren unterschiedlich lang. Dadurch kommt es u. a. zu Unterschieden in der Sequenzierungsgenauigkeit, Hintergrundamplifikation und dem Endergebnis [168]. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass in dieser Studie das Mikrobiom im Caecum und nicht im Faeces analysiert wurde. Die Analyse des Mikrobioms im Faeces und somit der direkte Vergleich zwischen den Ergebnissen der Studien aus der Gruppe von R. Dziarski, war in dieser Arbeit nicht möglich. Aufgrund der Infektion und des Gesundheitszustandes der Tiere war die erhaltene Menge an Faeces ungleichmäßig und reichte bei vielen Tieren nicht für eine stabile Sequenzierung aus. Des Weiteren kann es bei der Entnahme vom Faeces unter Umständen zu einer Kontamination

der Proben durch Berührung des Felles und der Haut kommen, sodass insbesondere bei kleinen Probenmengen eine weitere Fehlerquelle in die Analyse eingetragen wird.

Als weiterer Punkt sind die Unterschiede in den betrachteten Bakterienebenen und -anteilen in dieser Studie und der Publikation von Dziarski und Kollegen [117]. Sowohl die Anzahl an OTU in WT und PGLYRP2-KO Mäusen wie auch auf Ebene der Phyla und Klassen wurden in dieser Studie und bei Dziarski und Kollegen keine Unterschiede beobachtet. Auf Ebene der Familien gab es signifikante Unterschiede bei zwei Gruppen, welche einen Anteil von weniger als 1% aufwiesen [117]. Auch auf anderen Ebenen wurden Unterschiede in Gruppen beobachtet, die einen geringen Anteil der Gesamtmasse an Bakterien ausmachen. Diese kleinen Gruppen wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Zusammenfassend ist eine indirekte Beeinflussung der Zytokinexpression über TLR- und NOD Signalwege und möglicherweise über den Transkriptionsfaktor NF-KB wahrscheinlich. Eine direkte, antibakterielle Wirkung des PGLYRP2, sowie eine Beeinflussung der Mikrobiota scheinen dahingegen unwahrscheinlich.

6.2 Der PGLYRP4-KO führt zu einem proinflammatorischen Phänotyp und einer besseren Pathogeneliminierung in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie

Aus den Vorarbeiten von A. Shrivastav ist bekannt, dass PGLYRP4-KO Mäuse eine geringere Bakterienlast in der Lunge und im Blut 48 hpi mit *S. pneumoniae* aufweisen als entsprechende WT Mäuse. Die vorrangige Hypothese ist, dass PGLYRP4 nicht direkt antibakteriell gegen *S. pneumoniae* wirkt und dass PGLYRP4-KO Mäuse auf Grund eines indirekten immunmodulatorischen Effekts des PGLYRP4 vermehrt proinflammatorische Zytokine ausschütten. Infolgedessen werden PMN von PGLYRP4-KO Mäusen stärker aktiviert, sodass die Pneumokokken effizienter eliminiert werden als in WT Mäusen [139].

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die PGLYRP4-KO Mäuse eine geringere bakterielle Belastung in der Lunge und der Milz 48 hpi, eine stärkere Entzündungsreaktion in der Lunge aufweisen und vermehrt Immunzellen wie PMN, B- und T-Zellen in die Lunge rekrutieren. Zudem ist die epitheliale Lungenbarriere, durch eine höhere Expression von *Tight Junction* Proteinen, gestärkt. Durch Genexpressionsanalysen und eine Erweiterung der Untersuchung zur Eliminierung von Pneumokokken durch PMN konnte gezeigt werden, dass nicht der Phänotyp der PMN entscheidend für die bessere Eliminierung von Pneumokokken ist, sondern das lösliche Faktoren von PGLYRP4-KO AEC sowohl WT wie auch PGLYRP4-KO PMN gleichermaßen zu einer besseren Eliminierung verhelfen

können. Diese Effekte werden durch eine Veränderung des Mikrobioms im GI-Trakt begleitet und konnten in dieser Arbeit als ursächlich für die geringere bakterielle Belastung in PGLYRP4-KO Tieren bestätigt werden.

6.2.1 Effizientere Eliminierung von Pneumokokken und stärkere Entzündungsreaktionen in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen

Diese Studie konnte die bereits von A. Shrivastav beobachtete verringerte bakterielle Belastung in den Lungen und Milzen von PGLYRP4-KO gegenüber den WT Mäuse 48 hpi mit *S. pneumoniae* bestätigen. Diese Beobachtung ist zunächst unerwartet, da das Fehlen eines bekannten antibakteriellen Proteins mit einer breiten *in vitro* Wirksamkeit gegen grampositive und gramnegative Bakterien [93,103] eher zu einer Erhöhung der Bakterienlast führen sollte.

Allerdings sind bislang keine Studien veröffentlich, die einen antibakteriellen Effekt von PGLYRP4 gegenüber *S. pneumoniae* beschreiben. Zusätzlich wurde die *in vivo* Wirksamkeit von PGLYRP4 gegenüber anderen Bakterien noch nicht eindeutig bewiesen. Eine Studie untersuchte eine *P. aeruginosa*-induzierte Augeninfektion in PGLYRP4-KO Mäusen. Eindeutige Unterschiede zwischen PGLYRP4-KO und WT Mäusen wurden jedoch nicht beschrieben [110]. In einer weiteren Studie wurde humanes rPGLYRP4 intranasal in WT Mäuse appliziert und die Tiere 15 min später über dieselbe Route mit *S. aureus* infiziert. Hier konnte nach Aussage der Autoren ein geringer, antibakterieller Effekt 4 hpi ermittelt werden. Allerdings waren die Daten weder signifikant, noch wurden Langzeiteffekte analysiert [93].

Auf Grundlage der Daten aus der Dissertation von A. Shrivastav und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann darauf geschlossen werden, dass PGLYRP4 vermutlich weniger direkt antibakteriell gegenüber *S. pneumoniae* wirkt, sondern vielmehr indirekte immunmodulatorische Eigenschaften aufweist und dadurch Bakterien beeinflusst.

Die digitale quantitative Analyse von histologischen und immunhistologischen Daten ergab, dass in den Lungen von PGLYRP4-KO Mäusen vermehrt Blutungen, perivaskuläre Ödeme und nekrotisches Gewebe auftraten, sowie mehr Immunzellen rekrutiert wurden. Dies lässt auf eine erhöhte Entzündungsreaktion schließen. Ein höherer Grad an Entzündung kann einerseits durch eine erhöhte Bakterienzahl, welche das Gewebe vermehrt schädigt, oder durch eine übersteigerte Immunabwehr hervorgerufen werden [4,17,42]. Im Falle der PGLYRP4-KO Mäuse liegen zum Zeitpunkt der Analysen weniger Bakterien in der Lunge vor als in WT Mäusen. Die IHC ergab ebenfalls eine erhöhte Infiltration des Gewebes durch Granulozyten, B- und T-Zellen. Diese Daten werden durch die Daten aus der Arbeit von A. Shrivastav unterstützt, die mit semi-quantitativen histologischen Untersuchungen ebenfalls eine tendenziell erhöhte Infiltration von Immunzellen im Allgemeinen und einen tendenziell höheren Entzündungsgrad aufzeigte [139]. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die infiltrierten Immunzellen in PGLYRP4-KO Mäusen eine höhere Anzahl an Granulozyten, T- und B-Zellen aufwiesen. Dies ist durch die Verwendung unterschiedlicher Methoden und Zelloberflächenmarker zu erklären. In der Arbeit von A. Shrivastav wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und in der vorliegenden Arbeit wurden mittels IHC untersucht. So kann die Aktivierung von PMN, infolge der Infektion, zur Freisetzung der Granula und NET führen [162]. Im Generellen ist die Freisetzung von NET in der Durchflusszytometrie detektierbar [169]. Jedoch löst sich hierbei ebenfalls die Plasmamembran der PMN langsam auf, sodass die Möglichkeit besteht, dass im späteren Verlauf die aktivierten PMN nicht mehr durchflusszytometrisch detektiert werden könnten. In der IHC verbleiben diese Zellen jedoch durch die direkte Fixierung im Gewebe und können weiterhin detektiert werden [169–171]. Daher lassen die vorliegenden Daten die Schlussfolgerung zu, dass eine stärkere Entzündungsreaktion mit Infiltration von Immunzellen wie PMN zu einer gesteigerten Eliminierung von Pneumokokken in der Lunge führt.

6.2.2 Dichtere epitheliale Lungenbarriere und erhöhte Aktivierung von PMN durch AEC von PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen

Um zu untersuchen, wie es zu der erhöhten Entzündungsreaktion in der Lunge kommt, wurde zunächst die mRNA Expression von Pglyrp4 in residenten Lungenzellen und in die Lunge rekrutierten Phagozyten untersucht. Die konstitutive Genexpression von Pglyrp4 konnte in Übereinstimmung mit der Literatur in den untersuchten epithelialen und hämatopoetischen Zellen ermittelt werden [172]. Zusätzlich wurde die Expression von Pglyrp4 in der Lunge nicht nur in Epithelzellen, sondern auch in AMO festgestellt. Durch die *in vitro* Infektion primärer Zellen von WT Mäusen mit S. pneumoniae wurde die Genexpression in AEC reduziert und in AMΦ induziert. Um Hinweise auf lungenspezifische Regulationsmechanismen durch den PGLYRP4-KO zu erhalten, wurde eine genomweite mRNA Genexpressionsanalyse mit den AEC durchgeführt. Diese Zellen stellen, neben den AM Φ , die erste Barriere für eindringende Pathogene dar, erkennen diese und initiieren die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen [161]. Zu den am stärksten induzierten Genen zählten neben Interferonassoziierten und -regulierten Genen auch Hämoglobin-Gene. Des Weiteren wurde eine Induktion von Tight Junction Genen und Komplementfaktoren ermittelt. Durch qPCR Analysen konnten die Effekte auf den Komplementfaktor C3, auf Ifng und auf die Tight Junction Proteine Cldn18, F11r und Cdh1 bestätigt werden.

Hämoglobin wird im Allgemeinen mit dem Sauerstofftransport und der Stickstoffmonoxid-Bindung durch Erythrozyten in Verbindung gebracht. Jedoch produzieren viele pro- und eukaryotische Zellen wie AEC Häm-bindende Proteine. In diesen Zellen werden sie u. a. mit dem Schutz der Zelle vor hypoxischem Stress, wie er durch Entzündungen hervorgerufen werden kann, in Zusammenhang gebracht [173,174]. Dies könnte, im Zusammenhang mit einer Hochregulation von *Tight Junction* Genen zu einer dichteren epithelialen Barriere führen.

Ein *in vitro* Versuch mit isolierten AEC hat eine erhöhte Barrieredichte nach Infektion mit *S. pneumoniae* in PGLYRP4-KO gegenüber WT AEC ergeben, was auf eine Stärkung der Barrierefunktion schließen lässt.

Der Einfluss von IFN- γ in der Pneumokokken-induzierten Pneumonie ist weniger gut untersucht. Bekannt ist, dass CAP-Patienten erhöhte Level von IFN- γ aufweisen [161] und dass IFN- γ die epitheliale Lungenbarriere positiv beeinflussen kann [175]. Andererseits gibt es auch gegenteilige Berichte zur Lungenbarriere [176] und geringere bakterielle Belastung in einem IFN γ R-KO Mausmodell [177]. Aus diesen Gründen ist die Beurteilung der Ergebnisse zu den IFN-assoziierten und -regulierten Genen in Bezug auf die Barrierefunktion schwierig. Die Stärkung der Barrierefunktion durch IFN- γ [175] unterstützt jedoch den Phänotyp der PGLYRP4-KO Maus und die *in vitro S*tärkung der Epithelbarriere.

Zusätzlich zu der gestärkten Lungenepithelbarriere werden PMN durch den zellfreien Überstand von zuvor in vitro mit S. pneumoniae-infizierten AEC aktiviert. Es wurde bereits gezeigt, dass der Überstand von Pneumokokken-stimulierten AEC von PGLYRP4-KO Mäusen die PMN derselben Tiere stärker aktivieren konnte als der AEC-Überstand von WT Mäusen die PMN von WT Mäusen [139]. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die erhöhte Eliminierung durch den Phänotyp der AEC und nicht durch den Genotyp der PMN bestimmt wird. Hierfür wurden, ergänzend zu den Versuchen von A. Shrivastav, PMN von WT und PGLYRP4-KO Mäusen mit den zellfreien Überständen Pneumokokken-infizierter AEC des jeweils anderen Genotyps stimuliert und die Eliminierung von Pneumokokken analysiert. Die Eliminierung der Pneumokokken durch PMN von WT und PGLYRP4-KO Mäusen nach der Stimulation mit den Überständen von zuvor mit S. pneumoniae-infizierten PGLYRP4-KO AEC war vergleichbar hoch. Lösliche Faktoren aus den AEC von PGLYRP4-KO Mäusen sind daher wahrscheinlich für eine gesteigerte Eliminierung der Pneumokokken verantwortlich. Unklar ist, wie viele und welche löslichen Komponenten hierfür verantwortlich sind. Eine Möglichkeit ist eine höhere Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF-α, IL-6 und KC durch AEC von PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen [139]. Diese Zytokine können PMN rekrutieren und aktivieren [58,59,163]. Zusätzlich wurden in dieser Arbeit höhere Expressionen von *Ifng* und Komplementfaktoren wie *C3* und *Hc* ermittelt. Wie TNF- α , IL-6 und KC ist auch IFN- γ ein bekannter Aktivator von PMN [55]. Des Weiteren ist Komplement essentiell für die Eliminierung von *S. pneumoniae* und anderen pathogenen Erregern und der Verlust von z. B. den Komplementfaktoren C3 oder HC führt zu invasiven und wiederkehrenden Infektionen [178,179]. Andererseits werden Pneumokokken durch Ihre Kapsel und durch degradierende Proteine vor der Bindung und Wirkung von Komplementfaktoren geschützt [179–181]. Vermutlich ist eine Kombination der erhöhten proinflammatorischen Zytokine und Komplementfaktoren für die gesteigerte Aktivierung von PMN und Eliminierung der Pneumokokken verantwortlich. Im Zusammenspiel mit einer dichteren Epithelbarriere führt dieser Mechanismus zu einer verringerten Bakterienlast in der Lunge und geringeren Dissemination in die Peripherie.

6.2.3 S. pneumoniae schützt sich vor einer direkten antibakteriellen Wirkung von PGLYRP4 durch seine Kapsel, Proteasen und N-Glykosidasen

Bislang sind keine direkten antibakteriellen Eigenschaften von PGLYRP4 gegenüber S. pneumoniae bekannt und Vorarbeiten haben keine Wirksamkeit von rPGLYRP4 gegen bekapselten und unbekapselten S. pneumoniae gezeigt [139]. Unklar ist, warum PGLYRP4 ineffektiv gegen S. pneumoniae ist, da PGLYRP generell ein sehr breites Wirkungsspektrum in vitro aufweisen [93,103]. Ein Faktor zum Schutz der Pneumokokken ist deren Kapsel. Diese verhindert u. a. die Bindung von Komplementfaktoren und Antikörpern gegen Oberflächenproteine [17,42]. Die Bindung von PGLYRP an die Bakterien ist jedoch essenziell für deren direkte antibakterielle Wirkung über die Induktion von oxidativen, Thiol- und Metallstress [105,182]. Eigene unveröffentlichte Beobachtungen in Kooperation mit Prof. S. Hammerschmidt legen nahe, dass rPGLYRP4 in Abhängigkeit der Kapseldicke an Pneumokokken binden kann und somit potentiell in der Lage ist, direkt, antimikrobiell zu wirken. Daher sind weitere Schutzmechanismen von Pneumokokken sehr wahrscheinlich. Einer dieser weiteren möglichen Mechanismen konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Dabei wird rPGLYRP4 von Pneumokokken durch Serin-, Cystein-, und/oder Metalloproteasen abgebaut. Da diese Proteasen möglicherweise auch sekretiert werden, könnte eine Inaktivierung der PGLYRP bereits vor der Bindung an die Pneumokokken erfolgen. Neben Pneumokokken exprimieren auch viele weitere Bakterien spezifisch- und unspezifisch-wirkende Proteasen und schützen sich dadurch vor Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems [183].

Zusätzlich zu der Kapsel und Proteasen könnten sich Pneumokokken durch *N*-Glykosidasen vor der Wirkung von PGLYRP4 schützen. Es ist bekannt, dass PGLYRP durch *N*-Deglykolysierung ihre antibakteriellen Eigenschaften verlieren [103] und Pneumokokken über solche Enzyme verfügen [184,185]. Diese These wird dadurch unterstützt, dass PGLYRP4 ebenfalls keine antibakteriellen Eigenschaften gegenüber Bakterien wie *Enterococcus faecalis*, *S. pyogenes* und *P. aeruginosa* aufweist [93,103] und diese Bakterien ebenfalls über Glykosidasen verfügen [185]. Diese Mechanismen konnten in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht abschließend geklärt werden. Sicher sind jedoch die schützenden Eigenschaften der Proteasen von *S. pneumoniae* vor der Wirkung von PGLYRP4.

6.2.4 Ein vermehrt proinflammatorisches Mikrobiom in PGLYRP4-KO Mäusen ist für die geringere Bakterienlast gegenüber WT Mäusen verantwortlich

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen Unterschiede in der α- und β-Diversität des Mikrobioms in uninfizierten PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen. Durch die Infektion mit *S. pneumoniae* gleichen sich die Mikrobiome von WT und PGLYRP4-KO Mäusen an. Veränderungen des Mikrobioms in PGLYRP4-KO Mäusen wurden auch von Saha und Kollegen berichtet [111] und Veränderungen des Mikrobioms des Wirtes sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert [128,129]. Der kausale Zusammenhang ist jedoch zumeist unklar. Interessanterweise sind Effekte durch das Mikrobiom nicht lokal begrenzt, sondern können z. B. durch die Produktion von SCFA auf distale Organe wie die Lunge einen Einfluss nehmen [130,133,134,186]. In dieser Arbeit war das Verhältnis von *Firmicutes zu Bacteroidetes* in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen hin zu mehr *Bacteroidetes* verschoben. Dieses Verhältnis kann direkt mit der Produktion von SCFA korreliert werden und lässt daher auf eine geringere Produktion von SCFA in den PGLYRP4-KO Mäusen schließen [134].

Auf Familien-Ebene zeigte sich eine Reduktion an Lachnospiraceae in PGLYRP4-KO Mäusen. Innerhalb dieser Gruppe sind mehrere Bakterien, inkl. Roseburia spp., als starke Butyrat Produzenten bekannt [187]. SCFA sind dafür bekannt u. a. die Zytokinexpression, Zellmigration und -adhäsion zu modulieren [188]. Unter den SCFA gilt insbesondere Butyrat als anti-inflammatorisch [134]. So kann auch auf dieser Ebene, durch einen verringerten Anteil Lachnospiraceae, eine Reduktion Butyrat vorliegen an an und somit einen proinflammatorischen Phänotyp unterstützen. Die Mikrobiota könnten daher einen Einfluss auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, aber auch auf die epitheliale Barriere und PMN Aktivierung haben. Aus diesen Gründen ist es denkbar, dass das veränderte Mikrobiom der PGLYRP4-KO Mäuse kausal im Zusammenhang mit der geringeren Bakterienbelastung
gegenüber den WT Mäusen stehen. Andererseits könnten Unterschiede im Mikrobiom auch durch den proinflammatorischen Phänotyp, welcher durch den PGLYRP4-KO ausgelöst ist, bedingt sein.

Um herauszufinden, ob die Mikrobiota einen Einfluss auf den Phänotyp in der PGLYRP4-KO Maus haben, wurden keimfreie WT Mäuse entweder mit SPF WT oder SPF PGLYRP4-KO Tieren vergesellschaftet. Da der Genotyp bei den Akzeptor-Mäusen identisch ist, sollten Effekte allein durch die übertragenen Mikrobiota verursacht sein.

Ein ähnliches Experiment in der DSS-induzierten Kolitis wurde von einer anderen Forschungsgruppe durchgeführt. Dabei wurde durch den Transfer von PGLYRP4-KO Mikrobiota aus dem Faeces die Entwicklung einer DSS-induzierte Kolitis in WT Mäusen begünstigt [111,117].

Die erfolgreiche Übertragung der Mikrobiota wurde überprüft und zeigte nur minimale, nicht signifikante Unterschiede zwischen den Donor- und Akzeptor-Mäusen. Eine genaue Analyse des Mikrobioms wurde bislang nicht vorgenommen.

Im Anschluss wurden WT bzw. PGLYRP4-KO Tiere mit keimfreien WT Tieren vergesellschaftet und im Versuch infiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass die bakterielle Belastung in den ehemaligen keimfreien Tieren den gleichen Trend folgte, wie in den WT und PGLYRP4-KO Mäusen. Lediglich die Höhe der Bakterienlast war in den WT-Gnoto und KO4-Gnoto Mäusen höher als in den konventionellen WT und PGLYRP4-KO Mäusen. Zusätzlich zeigte sich in der Schwere der Erkrankung und in der Anzahl bakteriämischer Tiere der gleiche Trend mit einem besseren Gesundheitszustand in KO4-Gnoto gegenüber WT-Gnoto Mäusen. Die generell höhere bakterielle Belastung in den ehemaligen keimfreien Tieren ist durch ein weniger trainiertes Immunsystem auf Grund der keimfreien Haltung zurückzuführen [189]. Demzufolge ist auch der Erhöhte Krankheitsgrad und die größere Anzahl an bakteriämischen Tieren bei den ehemaligen keimfreien Tieren erklärbar. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass die Mikrobiota und von ihnen produzierte Metabolite, ursächlich für die bessere Eliminierung von *S. pneumoniae* in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen sind.

6.2.5 Implikationen PGLYRP4 und Human

Unterschiede im Mikrobiom von gesunden Menschen und Patienten sind für verschiedene Erkrankungen beschrieben [128,129]. Es konnte gezeigt werden, dass PGLYRP4-KO Mäuse eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms im Darm aufweisen und dieses die Bakterienbelastung und den Verlauf der Pneumonie nach einer Pneumokokkeninfektion beeinflusst. Jedoch gleicht sich die Zusammensetzung des PGLYRP4-KO Mikrobioms im Verlauf der Erkrankung denen des WT Mikrobioms an. Die Unterstützung und Aufrechterhaltung der PGLYRP4-KO Mikrobiota, bzw. der immunmodulatorischen Mediatoren SCFA könnte auch in der humanen Situation einen Vorteil im Verlauf der Erkrankung bringen. Der Effekt von Probiotika ist jedoch zumeist unklar und die dauerhafte Etablierung einer proinflammatorischen Mikrobiota könnte negative Auswirkungen auf die Entwicklung von z. B. chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben [111,190]. Aus diesen Gründen sollten Manipulationen ausgiebig untersucht und im humanen System erst bei ausreichender Datenlage und Indikation erfolgen.

6.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen PGLYRP2 und PGLYRP4

In der vorliegenden Arbeit sind für PGLYRP2 und PGLYRP4 sehr unterschiedliche Phänotypen beschrieben worden. So wurden in PGLYRP2-KO Mäusen u. a. eine Verringerung von proinflammatorischen Zytokinen und PMN in den Lungen und damit eine höhere bakterielle Belastung und ein schneller Verlauf der Pneumonie gegenüber den WT Mäusen festgestellt. Dahingegen wurden in den PGLYRP4-KO Mäusen ein erhöhter Zellinflux von Immunzellen und eine stärkere Entzündungsreaktion in der Lunge mit einer Verringerung der Bakterienlast, sowie eine proinflammatorische Veränderung des Mikrobioms im *Caecum* gegenüber WT Mäusen festgestellt.

Dennoch weisen beide PGLYRP auch ähnliche Eigenschaften auf. So wurde in einer Studie zur DSS-induzierten Kolitis sowohl für PGLYRP2, als auch für PGLYRP4 ein antiinflammatorischer Phänotyp beschrieben [111]. Weitere Studien belegen die antiinflammatorische Wirkung für PGLYRP2 in einer chemisch-induzierten, Psoriasis-ähnlichen Hautentzündung [95] und einer *S. enterica* serovar Typhimurium-induzierten Kolitis [159]. Für PGLYRP4 ist ebenfalls eine weitere Studie zu anti-inflammatorischen Effekten in der atopischen Dermatitis [116] bekannt. Es scheint daher, dass einige der Funktionen von PGLYRP konserviert sind und diese in einigen Erkrankungsmodellen ähnliche antiinflammatorische Wirkungen ausüben.

Zusätzlich konnten für PGLYRP2, wie in dieser Arbeit, proinflammatorische Effekte nachgewiesen werden. Eine Studie beschäftigte sich mit der PGN-induzierten Arthritis [100] und eine weitere mit einer *P. aeruginosa*-induzierten Keratitis im Auge [110]. Diese Funktion könnte über die Hydrolyse von PGN durch die Amidase-Domäne von PGLYRP2 vermittelt sein, die nicht in den anderen Säugetier-PGLYRP aktiv ist. Über diese Funktion könnte z. B. proinflammatorisches PGN neutralisiert bzw. die Erkennung und Eliminierung von Bakterien beeinflusst werden [90,94,153,154].

Welche der Eigenschaften überwiegt und ob die pro- oder eher die anti-inflammatorischen Eigenschaften vorteilhaft sind, hängt jedoch stark vom Erkrankungsmodell ab und ist letztendlich vom Zusammenspiel der PGLYRP untereinander und mit anderen Faktoren des angeborenen und erworbenen Immunsystems abhängig. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sich PGLYRP2 eher proinflammatorisch und der *KO* daher negativ und PGLYRP4 vorzugsweise anti-inflammatorisch und der *KO* positiv auf die *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie auswirkt.

6.4 Ausblick und fortführende Arbeiten

6.4.1 Arbeiten zu PGLYRP2

Zum besseren Verständnis des Einflusses von PGLYRP2 in der Lungenentzündung sollten Schlüsselexperimente mit weiteren bakteriellen Pneumonie-Erregern durchgeführt werden. Hierdurch könnten die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die Zytokinausschüttung und die PMN-Rekrutierung auf ein breiteres Erregerspektrum ausgeweitet und möglicherweise ein allgemeiner Mechanismus für die Wirkung des PGLYRP2 formuliert werden. Mögliche Erreger wären z. B. der grampositive *S. aureus*, welcher ein wichtiger Erreger bei der HAP ist, oder die gramnegativen Bakterien *H. influenzae*, *K. pneumoniae* oder *E. coli* [2,9,19,22]. Mit letzterem könnten ebenfalls ein intravenöses Infektionsmodell und damit eher eine bakteriämischer, anstelle eines lokalen, Pneumonie-Verlaufes untersucht werden. Zudem könnte durch die Untersuchung eines breiteten Erregerspektrums sensible und insensible Erreger in Bezug auf eine mögliche direkte antibakterielle bzw. die immunmodulatorische Wirkung des PGLYRP2 ermittelt werden. Damit würden sich eventuell weitere Aspekte der Funktion der PGLYRP, sowie der Erkennung und Eliminierung von Bakterien im Allgemeinen ergeben.

Zur Verifizierung der *in vitro* Daten in Bezug auf die antibakteriellen Eigenschaften von PGLYRP2 sollten weitere Bakterien getestet werden. Bobrovsky *et al.* haben gezeigt, dass *B. subtilis* und *E. coli* sensibel gegenüber humanes rPGLYRP2 sind [104]. Möglichweise gibt es jedoch Unterschiede in der antibakteriellen Aktivität zwischen murinen und humanem PGLYRP2. Daher könnte ebenfalls die konservierte Amidase-Funktion zur Bestätigung der biologischen Funktionalität des rPGLYRP2 herangezogen werden. Dies könnte z. B. über ein chemisch-photometrischen Test überprüft werden [191].

Bei positiver antibakterieller Wirkung des rPGLYRP2 wäre es von Interesse, ob eine Bindung des rPGLYRP2 an die Bakterien erfolgt und wie die Bindungspartner aussehen. Die Bindung an die Bakterien könnte über eine durchflusszytometrische Messung und der Detektion des gebundenen rPGLYRP2 über dessen His-Tag untersucht werden. Eine spätere Analyse der Bindungspartner könnte z. B. über die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie mit gereinigten Zellwandbestandteilen erfolgen.

Eine weitere interessante Fortführung der Arbeiten liegt in der Aufklärung des Mechanismus, welcher für die verringerten Zytokinsekretion verantwortlich ist. Hierfür könnten weitere wichtige Signalmoleküle des NF-κB Signalweges aus *in vivo* Lungengewebe oder *in vitro* stimulierten Primärzellen im Western-Blot untersucht werden. Interessante Proteine wären z. B. NF-κB, JNK1-3, p38 MAPK als Proteine kurz vor der Gentranskription im Nukleus oder auch MyD88 und RIPK2 als Adapterprotein am TLR2 bzw. NOD2. Eine Alternative zur Untersuchung der Proteinmenge ist die funktionale Aktivierung des NF-κB Signalweges. Hierfür eignet sich z. B. das Luciferase-Reporter-System in HEK293 Zellen. Nach einer Transfektion der HEK293 Zellen mit dem TLR2- oder NOD2-Rezeptor, die in HEK293 Zellen NF-κB Reportergenes, kann eine spezifische Aktivierung von NF-κB über den TLR2 oder NOD2 ermittelt werden. Durch die Stimulation mit *S. pneumoniae*, sowie der Zugabe von rPGLYRP2 kann eine mögliche Beeinflussung der NF-κB-Aktivierung durch rPGLYRP2 untersucht werden.

Letztendlich wäre die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen von großem Interesse. Hierzu können Daten aus der PROGRESS-Kohorte [192] angefragt werden und die Daten des Expressionslevels an PGLYRP2, bzw. SNP im PGLYRP2 z. B. mit dem Überleben oder der Zytokinkonzentrationen im Blut korreliert werden.

6.4.2 Arbeiten zu PGLYRP4

Für die Überprüfung, welche Bakterien der Darmmikrobiota möglicherweise für den beobachteten Phänotyp in den PGLYRP4-KO Mäusen verantwortlich sind, sollte die Zusammensetzung des Darmmikrobioms aus dem Vergesellschaftungsexperiment analysiert werden. Interessant wäre, ob die Übertragung einzelner Bakterienspezies auf z. B. WT Mäuse ausreichend für einen protektiven Effekt in der *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie ist. Dies

könnte unterstützende Behandlung- bzw. Prophylaxe-Möglichkeiten durch die Gabe von Präoder Probiotika ermöglichen.

Sollte sich herausstellen, dass insbesondere Bakterien mit einer hohen Kapazität zur Produktion von SCFA verändert sind, wären eine Analyse der Zusammensetzung und Konzentrationen dieser SCFA angeraten. Eine Applikation dieser Metabolite vor- bzw. nach einer Infektion im Mausmodell könnte ebenfalls als Therapieoption in Betracht gezogen werden.

Im Hinblick auf die Bedeutung der epithelialen Barriere und vom Überstand von AEC auf die Eliminierung von Pneumokokken durch PMN sollten die relevanten Faktoren weiter untersucht werden. Zum einen muss verifiziert werden, ob die Barrierefunktion der Lunge tatsächlich stärker in den PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen ausgeprägt ist. Hierfür könnten einerseits weitere Versuche mit primären AEC im ECIS-System durchgeführt werden. Andererseits kann die Proteinexpression von *Tight Junction* Proteinen wie CLDN18 und CDH1 mit Hilfe der IHC in den vorliegenden, histologischen Schnitten untersucht werden. Des Weiteren wäre der Mechanismus zur besseren Eliminierung von Pneumokokken durch PMN von Interesse. Hierfür könnten die bestehenden Versuche ausgeweitet werden und z. B. die Proteinkonzentrationen an Komplementfaktoren und Interferonen untersucht werden. Zur Verifizierung sollten Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen z. B. TNF- α , IFN- γ oder C3 durchgeführt werden.

Neben den Untersuchungen des Phänotyp der PGLYRP4-KO Maus und des Mechanismuses, welcher für die gesteigerte Erregereliminierung verantwortlich ist, wären Untersuchungen zum Schutzmechanismus der Pneumokokken interessant. Hierfür könnten die Versuche zur Degradation von rPGLYRP4 erweitert werden. Zunächst sollte die Proteaseklasse, welche für den Abbau des rPGLYRP4 verantwortlich ist, ermittelt werden. Hierfür können die Versuche aus Abschnitt 5.2.7 um spezifische Proteaseinhibitoren für z. B. Metalloproteasen (Chelatbildner wie EDTA) erweitert werden. Wenn sich herausstellt, dass die verantwortliche Protease aus der Klasse der Metalloproteasen oder Serinproteasen stammt, könnte über Pneumokokkenmutanten getestet werden, ob eine der bereits bekannten Proteasen, oder bislang unbekannte Proteasen für die Degradation von PGLYRP verantwortlich sind.

Ein weiterer Punkt wäre die Untersuchung von Humandaten, um einen Einfluss von PGLYRP4 und somit die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Aus Daten der PROGRESS-Kohorte [192] könnte untersucht werden, ob SNP oder die Expression von PGLYRP4 ein Risikofaktor für die Entwicklung eines schweren Verlaufs der Pneumonie darstellt.

7 Zusammenfassung

Infektionen der unteren Atemwege zählen zu den häufigsten Todesursachen weltweit und betreffen jährlich mehr als 3 Millionen Menschen [1]. Davon ist ein Großteil jünger als 5 oder älter als 65 Jahre alt. Der häufigste Erreger ist mit 1,5-2 Mio. Todesfällen pro Jahr S. pneumoniae [3,4]. Ein grampositives, kokkoides Bakterium, das zwar allgemein gut antibiotisch behandelbar, jedoch schon lange für seine Resistenzen gegenüber u. a. β-Lactamund Makrolidantibiotika bekannt ist [8,9]. In gesunden Individuen mit einem intakten und potenten Immunsystem, die nicht ins Krankenhaus eingeliefert werden müssen, ist die Sterblichkeit mit ca. 0,1% relativ gering [20,193]. Das Immunsystem verfügt offensichtlich über effektive Abwehrmechanismen [17]. Des Weiteren sorgen kommensale Mikrobiota durch verschiedene Mechanismen dafür, dass es Pathogenen schwerfällt, sich im Wirt zu etablieren. Dies kann u. a. durch Konkurrenz um Nährstoffe, Belegung der Körpernischen oder durch die Ausschüttung von immunmodulatorischen und antibakteriellen Metaboliten geschehen [127,128,134]. Körpereigene Immun-Abwehrproteine können durch direkte antibakterielle oder indirekte immunmodulatorische Wirkungen gegen eindringende Pathogene wirken und sorgen ebenso für ein sogenanntes gesundes Mikrobiom [67,68]. Diese Funktionen sind ebenfalls für die PGLYRP bekannt [50,68,100,104]. Bislang sind jedoch keine Studien zur Wirksamkeit der PGLYRP gegenüber S. pneumoniae veröffentlicht.

Um diese Lücke zu schließen wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Proteine PGLYRP2 und PGLYRP4 auf eine *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie untersucht. Hierfür wurden WT und PGLYRP-KO Mäusen transnasal infiziert und Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem und das Mikrobiom analysiert.

PGLYRP2-KO Mäuse zeigten gegenüber den WT Mäusen eine Verschlechterung des klinischen Verlaufs der Pneumokokken-induzierten Pneumonie. Insbesondere wiesen sie mehr Bakterien in Milz und tendenziell auch im Blut 48 hpi auf. Interessanterweise weist das PGLYRP2 keinen direkten, antibakteriellen Effekt gegenüber *S. pneumoniae* auf und es konnten ebenfalls keine Veränderungen des Darmmikrobioms festgestellt werden. Vielmehr wurden die Effekte durch eine Verringerung an proinflammatorischen Zytokinen und folglich einer geringeren Rekrutierung an PMN in die Lunge der PGLYRP2-KO Mäuse verursacht. Infolgedessen zeigten die PGLYRP2-KO Tiere einen beschleunigten Krankheitsverlauf. Im Gegensatz zu den PGLYRP2-KO Mäusen, wiesen die PGLYRP4-KO Mäuse einen

verbesserten klinischen Verlauf gegenüber WT Mäusen auf. Diese Verbesserung war mit einer signifikant geringeren Bakterienlast sowohl in den Lungen, als auch im Blut der infizierten

Tiere verbunden. Die bessere Eliminierung der Pneumokokken in PGLYRP4-KO gegenüber WT Mäusen wurde von einer stärkeren inflammatorischen Immunantwort, mit einer Infiltration von PMN, T- und B-Zellen in die Lunge, sowie einer stärkeren Aktivierung von PMN durch lösliche Faktoren von AEC ausgelöst. Zusätzlich wurde eine stärkere alveoläre Barriere festgestellt, die eine Dissemination der Bakterien in die Peripherie vermutlich reduziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die PGLYRP4-KO Mäuse über ein vermehrt proinflammatorisches Mikrobiom im Darm verfügen. Durch Übertragung dieser Mikrobiota auf keimfreie WT Mäuse konnte belegt werden, dass die Veränderungen im Mikrobiom keine Folge des proinflammatorischen Phänotyps, sondern ursächlich für den Schutz der PGLYRP4-KO Mäuse vor einer Pneumokokken-induzierten Pneumonie sind.

Zusammenfassend konnte der Einfluss von zwei PGLYRP auf die *S. pneumoniae*-induzierte Pneumonie belegt werden. Dabei nimmt PGLYRP2 in diesem Modell eine proinflammatorische Rolle und PGLYRP4 eine anti-inflammatorische und Mikrobiommodulierende Rolle ein. Fortführende Arbeiten könnten, durch die Aufklärung der genauen Mechanismen und beteiligten Bakterien, möglicherweise neue Behandlungsstrategien für Infektionserkrankungen, insbesondere der Pneumonie, ermöglichen.

8 Summary

Infections of the lower respiratory tract are one of the major burdens of life worldwide. Every year more than three million people, mostly below the age of five or above the age of 65, die on LRTIs. The most causative pathogen for LRTIs is *S. pneumoniae* [1,4]. This Gram-positive, coccoid bacterium kills up to two million people every year even though antibacterial agents are often effective. Nevertheless, there are known resistances against β -lactam and macrolide antibiotics [3,4,8,9]. Young and healthy patients, which do not need to be hospitalized and have a functional immune system generally have a low mortality of approx. 0.1% [20,193]. Therefore, there are some effective, intrinsic host defense mechanisms, which protect against this pathogen [17]. One of these mechanisms are hosts microbiota. They protect the host by e. g. colonizing body niches, using the same nutrition like invading pathogens and secreting immunomodulatory or antibacterial metabolites and proteins [127,128,134].

Furthermore, there are host's own defense proteins which can have direct antibacterial or indirect immunomodulatory functions, which can either directly target pathogens or indirectly support a healthy microbiome [67,68]. These functions are also known for PGLYRPs [50,68,100,104]. However, up to date, there are no studies, which show an effect of these PGLYRPs against *S. pneumoniae*.

Therefore, this work aimed in analyzing the influences of PGLYRP2 and PGLYRP4 in *S. pneumoniae*-induced pneumonia. Hence, WT and PGLYRP-KO mice were transnasally infected with *S. pneumoniae* and effects by these KOs on the innate immunity and microbiota were analyzed.

PGLYRP2-KO mice showed a worsened progression of the infection with slightly elevated bacterial load in the blood and significant higher bacterial load in the spleen 48 hpi compared to the WT mice. Interestingly, this effect was not due to a direct antibacterial effect, as indicated by an *in vitro* antibacterial assay, and there were no effects on the gut-microbiota as published by Saha et al [100]. Instead, PGLYRP2-KO mice had lower levels of proinflammatory cytokines in the lung and recruited less PMN to clear the bacterial infection than WT mice. Thus, these mice had higher clinical scores in early time point and needed to be sacrificed earlier than the corresponding WT mice.

Contrary, PGLYRP4-KO mice did better than WT mice in the pneumococcal infection and they had lower bacterial load in the lungs, as well as in the blood 48 hpi. The PGLYRP4-KO mice cleared the bacteria better due to a higher proinflammatory immune response accompanied by a higher infiltration of PMNs, T and B cells into the lungs. Furthermore, soluble factors of AECs from PGLYRP4-KO mice supported PMNs for better bacterial killing. Additionally,

PGLYRP4-KO mice had a tighter alveolar barrier by up-regulation of tight junction proteins and had a more proinflammatory gut-microbiota. By cohousing and transfer of the microbiota from WT and PGLYRP4-KO mice to germfree WT mice, it could be proven, that the better bacterial clearance of *S. pneumoniae* in PGLYRP4-KO mice was triggered by the altered microbiota.

In summary, this work showed the influence of two PGLYRPs on *S. pneumoniae*-induced pneumonia, whereas PGLYRP2 has a proinflammatory and PGLYRP4 has an antiinflammatory and microbiota-modulating function. By elucidation of the mechanisms and involved bacteria, additional work could lead to new strategies in treatment of infectious diseases like pneumonia.

9 Literatur

- World Health Organization. WHO | The top 10 causes of death [Internet]. World Health Organization;
 2017 [cited 19 Mar 2018]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/. Archived by WebCite® at http://www.webcitation.org/6zPPNqfKs
- 2. Höffken G, Lorenz J, Kern W, Welte T, Bauer T, Dalhoff K, et al. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society of chemotherapy, the German respiratory diseases society, the German infectious diseases society and of the competence network CAPNETZ for the management of lower respiratory tract infections and community-acquired p. Pneumologie. © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York; 2010;64: 149–154. doi:10.1055/s-0029-1243910
- Troeger C, Forouzanfar M, Rao PC, Khalil I, Brown A, Swartz S, et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet Infect Dis. Elsevier; 2017;17: 1133–1161. doi:10.1016/S1473-3099(17)30396-1
- 4. Dockrell DH, Whyte MKB, Mitchell TJ. Pneumococcal pneumonia: Mechanisms of infection and resolution. Chest. 2012;142: 482–491. doi:10.1378/chest.12-0210
- World Health Organization. WHO | HIV/AIDS [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 19 Mar 2018]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/en/. Archived by WebCite® at http://www.webcitation.org/6y2D4XHAr
- Ali M, Nelson AR, Lopez AL, Sack DA. Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries. Remais J V., editor. PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2015;9: e0003832. doi:10.1371/journal.pntd.0003832
- World Health Organization. WHO | Ebola virus disease [Internet]. World Health Organization; 2018 [cited 19 Mar 2018]. Available: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs103/en/. Archived by WebCite at http://www.webcitation.org/6y2CRqiMc
- Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery. Clin Infect Dis. 1993;17: 913–924. doi:10.1093/clinids/17.5.913
- Mandell LA. Community-acquired pneumonia: An overview. Postgrad Med. 2015;127: 607–615. doi:10.1080/00325481.2015.1074030
- Van Bambeke F, Reinert RR, Appelbaum PC, Tulkens PM, Peetermans WE. Multidrug-resistant Streptococcus pneumoniae infections: current and future therapeutic options. Drugs. Springer International Publishing; 2007;67: 2355–82. doi:10.2165/00003495-200767160-00005
- World Health Organization. WHO | Hepatitis [Internet]. World Health Organization; 2018 [cited 14 May 2018]. Available: http://www.who.int/hepatitis/en/. Archived by WebCite® at http://www.webcitation.org/6zPPj5hTQ
- 12. World Health Organization. WHO | Malaria [Internet]. 2018 [cited 14 May 2018]. Available: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria. Archived by WebCite® at http://www.webcitation.org/6zPPTVccu
- 13. World Health Organization. WHO | Measles [Internet]. 2018 [cited 14 May 2018]. Available: http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles. Archived by WebCite® at http://www.webcitation.org/6zPPb9NDg

- Danielle Iuliano A, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. Lancet. Elsevier; 2018;391: 1285–1300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
- Hussain M, Melegaro A, Pebody RG, George R, Edmunds WJ, Talukdar R, et al. A longitudinal household study of Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal carriage in a UK setting. Epidemiol Infect. Cambridge University Press; 2005;133: 891–898. doi:10.1017/S0950268805004012
- 16. Turner P, Turner C, Jankhot A, Helen N, Lee SJ, Day NP, et al. A longitudinal study of streptococcus pneumoniae carriage in a cohort of infants and their mothers on the Thailand-Myanmar border. Beall B, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2012;7: e38271. doi:10.1371/journal.pone.0038271
- van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. Lancet. Elsevier Ltd; 2009;374: 1543–1556. doi:10.1016/S0140-6736(09)61114-4
- Prina E, Ranzani OT, Torres A. Community-acquired pneumonia. Lancet. 2015;386: 1097–1108. doi:10.1016/S0140-6736(15)60733-4
- Anand N, Kollef MH. The alphabet soup of pneumonia: CAP, HAP, HCAP, NHAP, and VAP. Semin Respir Crit Care Med. © Thieme Medical Publishers; 2009;30: 3–9. doi:10.1055/s-0028-1119803
- Pletz MW, Ewig S, Lange C, Welte T, Höffken G. [Update pneumonia 2012]. Dtsch Med Wochenschr. 2012;137: 2265-80–4. doi:10.1055/s-0032-1305297
- 21. Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, et al. Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Adult Patients with Nosocomial Pneumonia - Update 2017: S3 Guideline of the German Society for Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society for Infectious Diseases, the German Society for Hygiene. Pneumologie. © Georg Thieme Verlag KG; 2018;72: 15–63. doi:10.1055/s-0043-121734
- José RJ, Periselneris JN, Brown JS. Community-acquired pneumonia. Curr Opin Pulm Med. 2015;21: 212–218. doi:10.1097/MCP.00000000000150
- Song J-H, Huh K, Chung D. Community-Acquired Pneumonia in the Asia-Pacific Region. Semin Respir Crit Care Med. Thieme Medical Publishers; 2016;37: 839–854. doi:10.1055/s-0036-1592075
- 24. Aston SJ. Pneumonia in the developing world: Characteristic features and approach to management. Respirology. Wiley/Blackwell (10.1111); 2017;22: 1276–1287. doi:10.1111/resp.13112
- 25. Asan E. Taschenlehrbuch Histologie [Internet]. Lüllmann-Rauch R, editor. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2015. doi:10.1055/b-003-124637
- Zilles K, Tillmann BN. Anatomie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. doi:10.1007/978-3-540-69483-0
- 27. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The Number of Alveoli in the Human Lung. Am J Respir Crit Care Med. American Thoracic Society; 2004;169: 120–124. doi:10.1164/rccm.200308-1107OC
- OpenStax. Anatomy & Physiology [Internet]. OpenStax CNX; 2017 [cited 23 Feb 2017]. Available: http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.108
- Bhattacharya J, Westphalen K. Macrophage-epithelial interactions in pulmonary alveoli. Semin Immunopathol. Springer Berlin Heidelberg; 2016;38: 461–469. doi:10.1007/s00281-016-0569-x
- Boneca IG. The role of peptidoglycan in pathogenesis. Curr Opin Microbiol. Elsevier Current Trends; 2005;8: 46–53. doi:10.1016/j.mib.2004.12.008

- Heijenoort J v. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology. Oxford University Press; 2001;11: 25R–36R. doi:10.1093/glycob/11.3.25R
- Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev. Oxford University Press; 2008;32: 149–167. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Humann J, Lenz LL. Bacterial peptidoglycan-degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. J Innate Immun. Karger Publishers; 2009;1: 88–97. doi:10.1159/000181181
- Hoijer MA, Melief MJ, Keck W, Hazenberg MP. Purification and characterization of N-acetylmuramyl-L-alanine amidase from human plasma using monoclonal antibodies. Biochim Biophys Acta - Gen Subj. Elsevier; 1996;1289: 57–64. doi:10.1016/0304-4165(95)00136-0
- 35. De Pauw P, Neyt C, Vanderwinkel E, Wattiez R, Falmagne P. Characterization of human serum nacetylmuramyl-l-alanine amidase purified by affinity chromatography. Protein Expr Purif. Academic Press; 1995;6: 371–378. doi:10.1006/prep.1995.1049
- Sorbara MT, Philpott DJ. Peptidoglycan: A critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. Immunol Rev. Wiley/Blackwell (10.1111); 2011;243: 40–60. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01047.x
- Egan AJF, Vollmer W. The physiology of bacterial cell division. Ann N Y Acad Sci. Wiley/Blackwell (10.1111); 2013;1277: 8–28. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06818.x
- Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. doi:10.1007/978-3-662-48678-8
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal capsules and their types: Past, present, and future. Clin Microbiol Rev. 2015;28: 871–899. doi:10.1128/CMR.00024-15
- 40. Dubos R, Avery OT. Decomposition of the capsular polysaccharide of pneumococcus type III by a bacterial enzyme. J Exp Med. Rockefeller University Press; 1931;54: 51–71. doi:10.1084/jem.54.1.51
- Avery OT. The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcus infection in mice. J Exp Med. Rockefeller University Press; 1931;54: 73–89. doi:10.1084/jem.54.1.73
- 42. Mitchell AM, Mitchell TJ. Streptococcus pneumoniae: Virulence factors and variation. Clin Microbiol Infect. Elsevier; 2010;16: 411–418. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x
- Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. Infect Immun. American Society for Microbiology; 2005;73: 4653–4667. doi:10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005
- McDevitt CA, Ogunniyi AD, Valkov E, Lawrence MC, Kobe B, McEwan AG, et al. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to Zinc. Imlay J, editor. PLoS Pathog. Public Library of Science; 2011;7: e1002357. doi:10.1371/journal.ppat.1002357
- 45. King SJ, Hippe KR, Weiser JN. Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by Streptococcus pneumoniae. Mol Microbiol. Blackwell Science Ltd; 2006;59: 961–974. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04984.x
- King SJ. Pneumococcal modification of host sugars: A major contributor to colonization of the human airway? Mol Oral Microbiol. Blackwell Publishing Ltd; 2010;25: 15–24. doi:10.1111/j.2041-1014.2009.00564.x
- 47. Brown J, Hammerschmidt S, Orihuela C. Streptococcus Pneumoniae: Molecular Mechanisms of Host-

Pathogen Interactions. 2015.

- 48. Chi YC, Rahkola JT, Kendrick AA, Holliday MJ, Paukovich N, Roberts TS, et al. Streptococcus pneumoniae IgA1 protease: A metalloprotease that can catalyze in a split manner in vitro. Protein Sci. Wiley-Blackwell; 2017;26: 600–610. doi:10.1002/pro.3110
- Murphy K (Kenneth M., Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology [Internet]. Garland Science; 2012. Available: http://www.garlandscience.com/product/isbn/9780815342434
- 50. Dziarski R, Gupta D. Mammalian peptidoglycan recognition proteins (PGRPs) in innate immunity. Palaniyar N, editor. Innate Immun. 2010;16: 168–174. doi:10.1177/1753425910366059
- 51. Chaput C, Sander LE, Suttorp N, Opitz B. NOD-Like Receptors in Lung Diseases. Front Immunol. Frontiers; 2013;4: 393. doi:10.3389/fimmu.2013.00393
- Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. Palaniyar N, editor. Innate Immun. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2010;16: 201–210. doi:10.1177/1753425910366058
- Koppe U, Suttorp N, Opitz B. Recognition of Streptococcus pneumoniae by the innate immune system. Cell Microbiol. 2012;14: 460–466. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x
- 54. Biolegend. Innate Immunity [Internet]. [cited 19 Mar 2018]. Available: https://www.biolegend.com/pop_pathway.php?id=98
- 55. Ellis TN, Beaman BL. Interferon-γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. Immunology.
 Wiley-Blackwell; 2004;112: 2–12. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01849.x
- 56. Cakarova L, Marsh LM, Wilhelm J, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, et al. Macrophage tumor necrosis factor-α induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: Impact on alveolar epithelial repair. Am J Respir Crit Care Med. American Thoracic Society; 2009;180: 521–532. doi:10.1164/rccm.200812-1837OC
- 57. Muller-Eberhard HJ. Complement. Annu Rev Biochem. 1975;44: 697–724. doi:10.1146/annurev.bi.44.070175.003405
- Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group; 2013;13: 159–175. doi:10.1038/nri3399
- 59. Rossaint J, Zarbock A. Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney. J Innate Immun. 2013;5: 348–357. doi:10.1159/000345943
- Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, et al. Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection. J Immunol. American Association of Immunologists; 2003;171: 5380–5388. doi:10.4049/jimmunol.171.10.5380
- Anas A, Poll T, de Vos AF. Role of CD14 in lung inflammation and infection. Crit Care. BioMed Central;
 2010;14: 209. doi:10.1186/cc8850
- 62. Paterson GK, Mitchell TJ. Innate immunity and the pneumococcus. Microbiology. Microbiology Society; 2006;152: 285–293. doi:10.1099/mic.0.28551-0
- 63. Dorrington MG, Roche AM, Chauvin SE, Tu Z, Mossman KL, Weiser JN, et al. MARCO Is Required for TLR2- and Nod2-Mediated Responses to Streptococcus pneumoniae and Clearance of Pneumococcal Colonization in the Murine Nasopharynx. J Immunol. American Association of Immunologists; 2013;190: 250–258. doi:10.4049/jimmunol.1202113

- 64. Behler-Janbeck F, Takano T, Maus R, Stolper J, Jonigk D, Tort Tarrés M, et al. C-type Lectin Mincle Recognizes Glucosyl-diacylglycerol of Streptococcus pneumoniae and Plays a Protective Role in Pneumococcal Pneumonia. Orihuela CJ, editor. PLoS Pathog. Public Library of Science; 2016;12: e1006038. doi:10.1371/journal.ppat.1006038
- Cummings RD, McEver RP. C-Type Lectins [Internet]. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. doi:10.1101/GLYCOBIOLOGY.3E.034
- Benko S, Philpott DJ, Girardin SE. The microbial and danger signals that activate Nod-like receptors. Cytokine. Academic Press; 2008;43: 368–373. doi:10.1016/j.cyto.2008.07.013
- Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009;30: 131–141. doi:10.1016/j.it.2008.12.003
- Hancock REW, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: Beyond antimicrobial activity. Nat Rev Immunol. 2016;16: 321–334. doi:10.1038/nri.2016.29
- Wang G, Li X, Wang Z. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. Nucleic Acids Res. Oxford University Press; 2016;44: D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278
- Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. Pharmaceuticals. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2014;7: 545–594. doi:10.3390/ph7050545
- Dziarski R, Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Genome Biol. 2006;7: 232. doi:10.1186/gb-2006-7-8-232
- 72. Yoshida H, Kinoshita K, Ashida M. Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, Bombyx mori. J Biol Chem. 1996;271: 13854–13860. doi:10.1074/jbc.271.23.13854
- 73. Kustikova OS, Kiselev SL, Borodulina OR, Senin VM, Afanas'eva A V, Kabishev AA. [Cloning of the tag7 gene expressed in metastatic mouse tumors]. Genetika. 1996;32: 621–8. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755036
- Kiselev SL, Kustikova OS, Korobko E V., Prokhortchouk EB, Kabishev AA, Lukanidin EM, et al. Molecular cloning and characterization of the mouse tag7 gene encoding a novel cytokine. J Biol Chem. 1998;273: 18633–18639. doi:10.1074/jbc.273.29.18633
- Kang D, Liu G, Lundström A, Gelius E, Steiner H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences; 1998;95: 10078–82. doi:10.1073/PNAS.95.17.10078
- 76. Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences; 2000;97: 13772–7. doi:10.1073/pnas.97.25.13772
- 77. Liu C, Gelius E, Liu G, Steiner H, Dziarski R. Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. J Biol Chem. 2000;275: 24490–24499. doi:10.1074/jbc.M001239200
- Kurata S. Peptidoglycan recognition proteins in Drosophila immunity. Dev Comp Immunol. 2014;42: 36– 41. doi:10.1016/j.dci.2013.06.006
- 79. Guan R, Wang Q, Sundberg EJ, Mariuzza RA. Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. J Mol Biol. Academic Press; 2005;347: 683–691. doi:10.1016/j.jmb.2005.01.070
- 80. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The protein data bank. Nucleic

Acids Res. Oxford University Press; 2000;28: 235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235

- Guan R, Roychowdhury A, Ember B, Kumar S, Boons G-J, Mariuzza RA. Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. Proc Natl Acad Sci. National Academy of Sciences; 2004;101: 17168–17173. doi:10.1073/pnas.0407856101
- Guan R, Malchiodi EL, Wang Q, Schuck P, Mariuzza RA. Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein Iα. J Biol Chem. 2004;279: 31873–31882. doi:10.1074/jbc.M404920200
- 83. Guan R, Roychowdury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ, Mariuzza RA. Crystal structure of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in complex with a muramyl tripeptide from Gram-positive bacteria. J Endotoxin Res. 2005;11: 41–46. doi:10.1179/096805105225006713
- 84. Park J-W, Kim C-H, Kim J-H, Je B-R, Roh K-B, Kim S-J, et al. Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. Proc Natl Acad Sci. National Academy of Sciences; 2007;104: 6602–6607. doi:10.1073/pnas.0610924104
- 85. Lee MH, Osaki T, Lee JY, Baek MJ, Zhang R, Park JW, et al. Peptidoglycan Recognition Proteins Involved in 1,3-β -D-Glucan-dependent Prophenoloxidase Activation System of Insect. J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2004;279: 3218–3227. doi:10.1074/jbc.M309821200
- Tydell CC, Yuan J, Tran P, Selsted ME. Bovine Peptidoglycan Recognition Protein-S: Antimicrobial Activity, Localization, Secretion, and Binding Properties. J Immunol. 2006;176: 1154–1162. doi:10.4049/jimmunol.176.2.1154
- 87. Shatalov Y V, Sashchenko LP, Dukhanina EA, Demin A V, Kiselev SL, Gnuchev N V. HSP70 forms a stable cytotoxic complex with Tag7/PGRP-S. Dokl Biol Sci. 2004;395: 169–72. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15255155
- Sharma P, Dube D, Singh A, Mishra B, Singh N, Sinha M, et al. Structural basis of recognition of pathogen-associated molecular patterns and inhibition of proinflammatory cytokines by camel peptidoglycan recognition protein. J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2011;286: 16208–16217. doi:10.1074/jbc.M111.228163
- Sharma P, Yamini S, Dube D, Singh A, Mal G, Pandey N, et al. Structural basis of the binding of fatty acids to peptidoglycan recognition protein, PGRP-S through second binding site. Arch Biochem Biophys. Academic Press; 2013;529: 1–10. doi:10.1016/j.abb.2012.11.001
- Charroux B, Rival T, Narbonne-Reveau K, Royet J. Bacterial detection by Drosophila peptidoglycan recognition proteins. Microbes Infect. Elsevier Masson; 2009;11: 631–636. doi:10.1016/j.micinf.2009.03.004
- Dziarski R, Gupta D. How innate immunity proteins kill bacteria and why they are not prone to resistance. Curr Genet. 2018;64: 125–129. doi:10.1007/s00294-017-0737-0
- 92. Zhang Y, Van Der Fits L, Voerman JS, Melief MJ, Laman JD, Wang M, et al. Identification of serum N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase as liver peptidoglycan recognition protein 2. Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics. Elsevier; 2005;1752: 34–46. doi:10.1016/j.bbapap.2005.07.001
- 93. Lu X, Wang M, Qi J, Wang H, Li X, Gupta D, et al. Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. J Biol Chem. 2006;281: 5895–5907. doi:10.1074/jbc.M511631200
- 94. Wang ZM, Li X, Cocklin RR, Wang M, Wang M, Fukase K, et al. Human peptidoglycan recognition

protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2003;278: 49044–49052. doi:10.1074/jbc.M307758200

- 95. Park SY, Gupta D, Hurwich R, Kim CH, Dziarski R. Peptidoglycan Recognition Protein Pglyrp2 Protects Mice from Psoriasis-like Skin Inflammation by Promoting Regulatory T Cells and Limiting Th17 Responses. J Immunol. 2011;187: 5813–5823. doi:10.4049/jimmunol.1101068
- 96. Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, et al. Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. Cell Microbiol. 2005;7: 675–686. doi:10.1111/j.1462-5822.2004.00500.x
- 97. Wang H, Gupta D, Li X, Dziarski R. Peptidoglycan recognition protein 2 (N-acetylmuramoyl-L-Ala amidase) is induced in keratinocytes by bacteria through the p38 kinase pathway. Infect Immun. American Society for Microbiology; 2005;73: 7216–7225. doi:10.1128/IAI.73.11.7216-7225.2005
- Ma P, Wang Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Toll-like receptors mediate induction of peptidoglycan recognition proteins in human corneal epithelial cells. Exp Eye Res. 2010;90: 130–136. doi:10.1016/j.exer.2009.09.021
- 99. Maniar-Hew K, Clay CC, Postlethwait EM, Evans MJ, Fontaine JH, Miller LA. Innate immune response to LPS in airway epithelium is dependent on chronological age and antecedent exposures. Am J Respir Cell Mol Biol. American Thoracic Society; 2013;49: 710–720. doi:10.1165/rcmb.2012-0321OC
- 100. Saha S, Qi J, Wang S, Wang M, Li X, Kim YG, et al. PGLYRP-2 and Nod2 Are Both Required for Peptidoglycan-Induced Arthritis and Local Inflammation. Cell Host Microbe. Elsevier; 2009;5: 137–150. doi:10.1016/j.chom.2008.12.010
- 101. Zenhom M, Hyder A, de Vrese M, Heller KJ, Roeder T, Schrezenmeir J. Prebiotic Oligosaccharides Reduce Proinflammatory Cytokines in Intestinal Caco-2 Cells via Activation of PPARγ and Peptidoglycan Recognition Protein 3. J Nutr. Oxford University Press; 2011;141: 971–977. doi:10.3945/jn.110.136176
- Uehara A, Takada H. Synergism between TLRs and NOD1/2 in oral epithelial cells. J Dent Res. SAGE Publications; 2008;87: 682–686. doi:10.1177/154405910808700709
- 103. Wang M, Liu L-H, Wang S, Li X, Lu X, Gupta D, et al. Human Peptidoglycan Recognition Proteins Require Zinc to Kill Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Are Synergistic with Antibacterial Peptides. J Immunol. 2007;178: 3116–3125. doi:10.4049/jimmunol.178.5.3116
- 104. Bobrovsky P, Manuvera V, Polina N, Podgorny O, Prusakov K, Govorun V, et al. Recombinant human peptidoglycan recognition proteins reveal antichlamydial activity. Roy CR, editor. Infect Immun. 2016;84: 2124–2130. doi:10.1128/IAI.01495-15
- 105. Kashyap DR, Kuzma M, Kowalczyk DA, Gupta D, Dziarski R. Bactericidal peptidoglycan recognition protein induces oxidative stress in Escherichia coli through a block in respiratory chain and increase in central carbon catabolism. Mol Microbiol. 2017;105: 755–776. doi:10.1111/mmi.13733
- 106. Sharapova TN, Ivanova OK, Soshnikova N V., Romanova EA, Sashchenko LP, Yashin D V. Innate Immunity Protein Tag7 Induces 3 Distinct Populations of Cytotoxic Cells That Use Different Mechanisms to Exhibit Their Antitumor Activity on Human Leukocyte Antigen-Deficient Cancer Cells. J Innate Immun. 2017;9: 598–608. doi:10.1159/000479382
- 107. Dukhanina EA, Lukyanova TI, Romanova EA, Guerriero V, Gnuchev N V., Georgiev GP, et al. A new role for PGRP-S (Tag7) in immune defense: Lymphocyte migration is induced by a chemoattractant

complex of Tag7 with Mts1. Cell Cycle. 2015;14: 3635-3643. doi:10.1080/15384101.2015.1104440

- 108. Sharapova TN, Ivanova OK, Prasolov VS, Romanova EA, Sashchenko LP, Yashin D V. Innate immunity protein Tag7 (PGRP-S) activates lymphocytes capable of Fasl-Fas-dependent contact killing of virusinfected cells. IUBMB Life. 2017;69: 971–977. doi:10.1002/iub.1688
- 109. Read CB, Kuijper JL, Hjorth SA, Heipel MD, Tang X, Fleetwood AJ, et al. Cutting Edge: Identification of Neutrophil PGLYRP1 as a Ligand for TREM-1. J Immunol. 2015;194: 1417–1421. doi:10.4049/jimmunol.1402303
- 110. Gowda RN, Redfern R, Frikeche J, Pinglay S, Foster JW, Lema C, et al. Functions of peptidoglycan recognition proteins (Pglyrps) at the ocular surface: Bacterial keratitis in gene-targeted mice deficient in Pglyrp-2, -3 and -4. Shukla D, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2015;10: e0137129. doi:10.1371/journal.pone.0137129
- 111. Saha S, Jing X, Park SY, Wang S, Li X, Gupta D, et al. Peptidoglycan recognition proteins protect mice from experimental colitis by promoting normal gut flora and preventing induction of interferon-γ. Cell Host Microbe. 2010;8: 147–162. doi:10.1016/j.chom.2010.07.005
- 112. Goldman SM, Kamel F, Ross GW, Jewell SA, Marras C, Hoppin JA, et al. Peptidoglycan recognition protein genes and risk of Parkinson's disease. Mov Disord. 2014;29: 1171–1180. doi:10.1002/mds.25895
- Arentsen T, Qian Y, Gkotzis S, Femenia T, Wang T, Udekwu K, et al. The bacterial peptidoglycan-sensing molecule Pglyrp2 modulates brain development and behavior. Mol Psychiatry. Nature Publishing Group; 2017;22: 257–266. doi:10.1038/mp.2016.182
- 114. De Marzi MC, Todone M, Ganem MB, Wang Q, Mariuzza RA, Fernández MM, et al. Peptidoglycan recognition protein-peptidoglycan complexes increase monocyte/macrophage activation and enhance the inflammatory response. Immunology. 2015;145: 429–442. doi:10.1111/imm.12460
- 115. Zenhom M, Hyder A, Kraus-Stojanowic I, Auinger A, Roeder T, Schrezenmeir J. PPARγ-dependent peptidoglycan recognition protein 3 (PGlyRP3) expression regulates proinflammatory cytokines by microbial and dietary fatty acids. Immunobiology. 2011;216: 715–724. doi:10.1016/j.imbio.2010.10.008
- 116. Park SY, Gupta D, Kim CH, Dziarski R. Differential effects of peptidoglycan recognition proteins on experimental atopic and contact dermatitis mediated by Treg and Th17 cells. Jeyaseelan S, editor. PLoS One. 2011;6: e24961. doi:10.1371/journal.pone.0024961
- 117. Dziarski R, Park SY, Kashyap DR, Dowd SE, Gupta D. Pglyrp-Regulated gut microflora prevotella falsenii, parabacteroides distasonis and bacteroides eggerthii enhance and alistipes finegoldii attenuates colitis in mice. PLoS One. 2016;11: 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0146162
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. PLoS Biol. Public Library of Science; 2016;14: e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533
- 119. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature. Nature Publishing Group; 2010;464: 59–65. doi:10.1038/nature08821
- 120. Man WH, De Steenhuijsen Piters WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2017;15: 259–270. doi:10.1038/nrmicro.2017.14
- Wirth R. Colonization of Black Smokers by Hyperthermophilic Microorganisms. Trends Microbiol. Elsevier Current Trends; 2017;25: 92–99. doi:10.1016/j.tim.2016.11.002

- Ranawat P, Rawat S. Radiation resistance in thermophiles: mechanisms and applications. World J Microbiol Biotechnol. Springer Netherlands; 2017;33: 112. doi:10.1007/s11274-017-2279-5
- Sarmiento F, Peralta R, Blamey JM. Cold and Hot Extremozymes: Industrial Relevance and Current Trends. Front Bioeng Biotechnol. Frontiers; 2015;3: 148. doi:10.3389/fbioe.2015.00148
- 124. Mykytczuk NCS, Foote SJ, Omelon CR, Southam G, Greer CW, Whyte LG. Bacterial growth at -15 °C; molecular insights from the permafrost bacterium Planococcus halocryophilus Or1. ISME J. Nature Publishing Group; 2013;7: 1211–1226. doi:10.1038/ismej.2013.8
- 125. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. MBio. 2015;6: e00037-15. doi:10.1128/mBio.00037-15
- Marsland BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. Nat Rev Immunol. Nature Publishing Group; 2014;14: 827–835. doi:10.1038/nri3769
- Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. Nature. Nature Publishing Group; 2016;535: 65–74. doi:10.1038/nature18847
- Spasova DS, Surh CD. Blowing on embers: Commensal microbiota and our immune system. Front Immunol. Frontiers; 2014;5: 318. doi:10.3389/fimmu.2014.00318
- 129. Degruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. Inflamm Bowel Dis. 2016;22: 1137–1150. doi:10.1097/MIB.000000000000750
- Schuijt TJ, Lankelma JM, Scicluna BP, De Sousa E Melo F, Roelofs JJTH, De Boer JD, et al. The gut microbiota plays a protective role in the host defence against pneumococcal pneumonia. Gut. 2016;65: 575–583. doi:10.1136/gutjnl-2015-309728
- Brown RL, Sequeira RP, Clarke TB. The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. Nat Commun. Nature Publishing Group; 2017;8: 1512. doi:10.1038/s41467-017-01803-x
- Keely S, Talley NJ, Hansbro PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. Mucosal Immunol. 2012;5: 7–18. doi:10.1038/mi.2011.55
- Ha CWY, Lam YY, Holmes AJ. Mechanistic links between gut microbial community dynamics, microbial functions and metabolic health. World J Gastroenterol. Baishideng Publishing Group Inc.; 2014;20: 16498–16517. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16498
- Samuelson DR, Welsh DA, Shellito JE. Regulation of lung immunity and host defense by the intestinal microbiota. Front Microbiol. Frontiers; 2015;6: 1085. doi:10.3389/fmicb.2015.01085
- 135. Vital M, Howe AC, Tiedje JM. Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data. MBio. American Society for Microbiology; 2014;5: e00889. doi:10.1128/mBio.00889-14
- 136. Salva S, Villena J, Alvarez S. Immunomodulatory activity of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. Int J Food Microbiol. Elsevier; 2010;141: 82–89. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.013
- 137. Zárate G, Santos V, Nader-Macias ME. Protective effect of vaginal Lactobacillus paracasei CRL 1289 against urogenital infection produced by Staphylococcus aureus in a mouse animal model. Infect Dis Obstet Gynecol. 2007;2007: 48358. doi:10.1155/2007/48358
- 138. Jain S, Yadav H, Sinha PR, Naito Y, Marotta F. Dahi containing probiotic Lactobacillus acidophilus and

Lactobacillus casei has a protective effect against Salmonella enteritidis infection in mice. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008;21: 1021–1029. doi:10.1177/039463200802100428

- Shrivastav A. Role and Regulation Mechanisms of Peptidoglycan Recognition Proteins in Pneumococcal Pneumonia. PhD Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany. 2015.
- 140. Orihuela CJ, Gao G, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. Tissue-Specific Contributions of Pneumococcal Virulence Factors to Pathogenesis. J Infect Dis. Oxford University Press; 2004;190: 1661–1669. doi:10.1086/424596
- 141. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci. National Academy of Sciences; 2011;108: 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
- 142. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: Opensource, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology; 2009;75: 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- 143. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology; 2013;79: 5112–5120. doi:10.1128/AEM.01043-13
- 144. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 2013;41: D590– D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Yue JC, Clayton MK. A similarity measure based on species proportions. Commun Stat Theory Methods. Taylor & Francis Group; 2005;34: 2123–2131. doi:10.1080/STA-200066418
- Lozupone C, Knight R. UniFrac: A new phylogenetic method for comparing microbial communities. Appl Environ Microbiol. American Society for Microbiology; 2005;71: 8228–8235. doi:10.1128/AEM.71.12.8228-8235.2005
- 147. Dietert K, Nouailles G, Gutbier B, Reppe K, Berger S, Jiang X, et al. Digital Image Analyses on Whole Lung Slides in Mouse Models of Acute Pneumonia. Am J Respir Cell Mol Biol. 2018; rcmb.2017-0337MA. doi:10.1165/rcmb.2017-0337MA
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Biospektrum. 2004;10: 92–95. doi:10.1007/s12268-013-0292-2
- 149. Balamayooran T, Balamayooran G, Jeyaseelan S. Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. Innate Immun. 2010;16: 201–210. doi:10.1177/1753425910366058
- 150. De Stoppelaar SF, Bootsma HJ, Zomer A, Roelofs JJTH, Hermans PWM, Van 't Veer C, et al. Streptococcus pneumoniae serine protease HtrA, but not SFP or PrtA, is a major virulence factor in pneumonia. Jeyaseelan S, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2013;8: e80062. doi:10.1371/journal.pone.0080062
- 151. Spellberg B, Bartlett J, Wunderink R, Gilbert DN. Novel approaches are needed to develop tomorrow's antibacterial therapies. Am J Respir Crit Care Med. 2015;191: 135–140. doi:10.1164/rccm.201410-1894OE
- 152. Torrens G, Pérez-Gallego M, Moya B, Munar-Bestard M, Zamorano L, Cabot G, et al. Targeting the

114

permeability barrier and peptidoglycan recycling pathways to disarm Pseudomonas aeruginosa against the innate immune system. Lee B-L, editor. PLoS One. 2017;12: e0181932. doi:10.1371/journal.pone.0181932

- 153. Gelius E, Persson C, Karlsson J, Steiner H. A mammalian peptidoglycan recognition protein with Nacetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. Biochem Biophys Res Commun. Academic Press; 2003;306: 988–994. doi:10.1016/S0006-291X(03)01096-9
- 154. Claes A-K, Zhou JY, Philpott DJ. NOD-Like Receptors: Guardians of Intestinal Mucosal Barriers. Physiology. American Physiological Society Bethesda, MD; 2015;30: 241–250. doi:10.1152/physiol.00025.2014
- 155. Shrivastav A, Dabrowski AN, Conrad C, Baal N, Hackstein H, Plog S, et al. Peptidoglycan recognition protein 3 does not alter the outcome of pneumococcal pneumonia in mice. Front Microbiol. Frontiers; 2018;9: 103. doi:10.3389/FMICB.2018.00103
- 156. Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: A novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. J Biol Chem. 2001;276: 34686–34694. doi:10.1074/jbc.M105566200
- 157. Arentsen T, Khalid R, Qian Y, Diaz Heijtz R. Sex-dependent alterations in motor and anxiety-like behavior of aged bacterial peptidoglycan sensing molecule 2 knockout mice. Brain Behav Immun. Academic Press; 2018;67: 345–354. doi:10.1016/j.bbi.2017.09.014
- Sansonetti P. Phagocytosis of bacterial pathogens: Implications in the host response. Semin Immunol. Academic Press; 2001;13: 381–390. doi:10.1006/smim.2001.0335
- 159. Lee J, Geddes K, Streutker C, Philpott DJ, Girardin SE. Role of mouse peptidoglycan recognition protein PGLYRP2 in the Innate immune response to Salmonella enterica serovar typhimurium infection in vivo. Infect Immun. American Society for Microbiology; 2012;80: 2645–2654. doi:10.1128/IAI.00168-12
- Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. Nature. NIH Public Access; 2016;529: 307–15. doi:10.1038/nature17039
- 161. Bordon J, Aliberti S, Fernandez-Botran R, Uriarte SM, Rane MJ, Duvvuri P, et al. Understanding the roles of cytokines and neutrophil activity and neutrophil apoptosis in the protective versus deleterious inflammatory response in pneumonia. Int J Infect Dis. 2013;17: e76–e83. doi:10.1016/j.ijid.2012.06.006
- Pechous RD. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. Front Cell Infect Microbiol. Frontiers; 2017;7: 160. doi:10.3389/fcimb.2017.00160
- Borish L, Rosenbaum R, Albury L, Clark S. Activation of neutrophils by recombinant interleukin 6. Cell Immunol. Academic Press; 1989;121: 280–289. doi:10.1016/0008-8749(89)90026-9
- 164. Baker PJ, Stashak PW, Amsbaugh DF, Prescott B. Characterization of the antibody response to type 3 pneumococcal polysaccharide at the cellular level. I. Dose-response studies and the effect of prior immunization on the magnitude of the antibody response. Immunology. 1971;20: 469–80. Available: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1456005&tool=pmcentrez&rendertype=abstr act
- 165. Baker PH, Stashak PW. Quantitative and qualitative studies on the primary antibody response to pneumococcal polysaccharides at ehe cellular level. J Immunol. 1969;103: 1342–8. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4391281
- 166. Zulfiqar F, Hozo I, Rangarajan S, Mariuzza RA, Dziarski R, Gupta D. Genetic Association of

Peptidoglycan Recognition Protein Variants with Inflammatory Bowel Disease. Lenz LL, editor. PLoS One. Public Library of Science; 2013;8: e67393. doi:10.1371/journal.pone.0067393

- 167. Xu M, Wang Z, Locksley RM. Innate Immune Responses in Peptidoglycan Recognition Protein L-Deficient Mice. Mol Cell Biol. American Society for Microbiology; 2004;24: 7949–7957. doi:10.1128/MCB.24.18.7949-7957.2004
- 168. Rintala A, Pietilä S, Munukka E, Eerola E, Pursiheimo JP, Laiho A, et al. Gut microbiota analysis results are highly dependent on the 16s rRNA gene target region, whereas the impact of DNA extraction is minor. J Biomol Tech. The Association of Biomolecular Resource Facilities; 2017;28: 19–30. doi:10.7171/jbt.17-2801-003
- de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. J Immunol Res. Hindawi Limited; 2016;2016: 4604713. doi:10.1155/2016/4604713
- 170. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol. Rockefeller University Press; 2007;176: 231–241. doi:10.1083/jcb.200606027
- 171. Yousefi S, Simon HU. NETosis does it really represent nature's "suicide bomber"? Front Immunol. Frontiers; 2016;7: 328. doi:10.3389/fimmu.2016.00328
- 172. Mathur P, Murray B, Crowell T, Gardner H, Allaire N, Hsu YM, et al. Murine peptidoglycan recognition proteins PglyrpIα and PglyrpIβ are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues. Genomics. 2004;83: 1151–1163. doi:10.1016/j.ygeno.2004.01.003
- Newton DA, Rao KMK, Dluhy RA, Baatz JE. Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells. J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; 2006;281: 5668–5676. doi:10.1074/jbc.M509314200
- 174. Grek CL, Newton DA, Spyropoulos DD, Baatz JE. Hypoxia up-regulates expression of hemoglobin in alveolar epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol. American Thoracic Society; 2011;44: 439–447. doi:10.1165/rcmb.2009-0307OC
- 175. Ahdieh M, Vandenbos T, Youakim A. Lung epithelial barrier function and wound healing are decreased by IL-4 and IL-13 and enhanced by IFN-gamma. Am J Physiol Cell Physiol. 2001;281: C2029–C2038. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698262
- 176. Hermanns MI, Kasper J, Dubruel P, Pohl C, Uboldi C, Vermeersch V, et al. An impaired alveolar-capillary barrier in vitro: effect of proinflammatory cytokines and consequences on nanocarrier interaction. J R Soc Interface. 2010;7: S41–S54. doi:10.1098/rsif.2009.0288.focus
- 177. Rijneveld AW, Lauw FN, Schultz MJ, Florquin S, Velde AAT, Speelman P, et al. The Role of Interferonγ in Murine Pneumococcal Pneumonia. J Infect Dis. 2002;185: 91–97. doi:10.1086/338122
- 178. Ram S, Lewis LA, Rice PA. Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. Clin Microbiol Rev. American Society for Microbiology; 2010;23: 740–80. doi:10.1128/CMR.00048-09
- 179. van der Maten E, van den Broek B, de Jonge MI, Rensen KJW, Eleveld MJ, Zomer AL, et al. Streptococcus pneumoniae PspC-subgroup prevalence in invasive disease and difference in contribution to complement evasion. Infect Immun. American Society for Microbiology; 2018;86: IAI.00010-18. doi:10.1128/IAI.00010-18
- 180. Jarva H, Jokiranta TS, Würzner R, Meri S. Complement resistance mechanisms of streptococci. Mol

Immunol. 2003;40: 95-107. doi:10.1016/S0161-5890(03)00108-1

- 181. Andre GO, Converso TR, Politano WR, Ferraz LFC, Ribeiro ML, Leite LCC, et al. Role of Streptococcus Pneumoniae proteins in evasion of complement-mediated immunity. Front Microbiol. 2017;8: 1–20. doi:10.3389/fmicb.2017.00224
- 182. Kashyap DR, Rompca A, Gaballa A, Helmann JD, Chan J, Chang CJ, et al. Peptidoglycan Recognition Proteins Kill Bacteria by Inducing Oxidative, Thiol, and Metal Stress. Philpott DJ, editor. PLoS Pathog. 2014;10: e1004280. doi:10.1371/journal.ppat.1004280
- Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. J Innate Immun. Karger Publishers; 2009;1: 70–87. doi:10.1159/000181144
- 184. Glasgow LR, Paulson JC, Hill RL. Systematic purification of five glycosidases from Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae. J Biol Chem. 1977;252: 8615–8623. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21878
- Sjögren J, Collin M. Bacterial glycosidases in pathogenesis and glycoengineering. Future Microbiol. 2014;9: 1039–1051. doi:10.2217/fmb.14.71
- 186. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2017;15: 55–63. doi:10.1038/nrmicro.2016.142
- 187. Louis P, Flint HJ. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. FEMS Microbiol Lett. Oxford University Press; 2009;294: 1–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01514.x
- Vinolo MAR, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. Nutrients. Molecular Diversity Preservation International; 2011;3: 858–876. doi:10.3390/nu3100858
- 189. Fiebiger U, Bereswill S, Heimesaat MM. Dissecting the interplay between intestinal microbiota and host immunity in health and disease: Lessons learned from germfree and gnotobiotic animal models. Eur J Microbiol Immunol. Akadémiai Kiadó; 2016;6: 253–271. doi:10.1556/1886.2016.00036
- 190. Koretz RL. Probiotics in Gastroenterology: How Pro Is the Evidence in Adults? Am J Gastroenterol. Nature Publishing Group; 2018; 1. doi:10.1038/s41395-018-0138-0
- 191. Hazenberg MP, de Visser H. Assay for N-acetylmuramyl-L-alanine amidase in serum by determination of muramic acid released from the peptidoglycan of Brevibacterium divaricatum. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1992;30: 141–144. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350922
- 192. Ahnert P, Creutz P, Scholz M, Schütte H, Engel C, Hossain H, et al. PROGRESS prospective observational study on hospitalized community acquired pneumonia. BMC Pulm Med. BioMed Central; 2016;16: 108. doi:10.1186/s12890-016-0255-8
- 193. Fine MJ, Auble TE, Yealy DM, Hanusa BH, Weissfeld LA, Singer DE, et al. A Prediction Rule to Identify Low-Risk Patients with Community-Acquired Pneumonia. N Engl J Med. Massachusetts Medical Society; 1997;336: 243–250. doi:10.1056/NEJM199701233360402

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.01	Pneumokokken sind die häufigste Todesursache bei Infektionserkrankungen1
Abb. 1.02	Schematische Darstellung des anatomischen Aufbaus der unteren humanen Atemwege4
Abb. 1.03	: Struktur vom Lys-Typ PGN und dessen enzymatische Spaltung6
Abb. 1.04	: Übersicht über einige wichtige Virulenzfaktoren der Pneumokokken
Abb. 1.05	Abwehr von Bakterien an der epithelialen Barriere und Zusammenspiel wichtiger Zellen10
Abb. 1.06	: Wichtige Moleküle für die Pneumokokken-Erkennung11
Abb. 1.07	: C-Terminale PGN-Bindungsdomäne von humanem PGLYRP1 und PGLYRP3 im Komplex mit
	Muramyltripeptid13
Abb. 1.08	Proteinstruktur vom PGLYRP3-Dimer14
Abb. 1.09	Funktionen von Insekten-PGRP16
Abb. 1.10	Mechanismus der antibakteriellen Wirkung der PGLYRP18
Abb. 1.11	: Mikrobiota in Mensch
Abb. 4.01	Schematische Darstellung des Vergesellschaftungs-Experimentes
Abb. 4.02	Aufbau des Eliminierungsversuches durch PMN
Abb. 5.01	: Pglyrp2 wird durch Stimulation mit Pneumokokken in phagozytischen Zellen induziert
Abb. 5.02	Erhöhte bakterielle Belastung in der Milz von PGLYRP2-KO Mäusen 48 h nach Infektion mit
	S. pneumoniae
Abb. 5.03	PGLYRP2-KO Mäusen sind anfälliger für eine Pneumokokkeninfektion und müssen früher als WT
	Mäuse euthanasiert werden
Abb. 5.04	PGLYRP2-KO Mäuse zeigen einen beschleunigten Krankheitsverlauf ermittelt anhand klinischer
	Parameter
Abb. 5.05	rPGLYRP2 ist nicht antibakteriell gegen S. pneumoniae in vitro
Abb. 5.06	: Geringere Zytokinlevel in den Lungen aber nicht im Blut von PGLYRP2-KO vs. WT Mäusen 48 hpi.
Abb. 5.07	: PGLYRP2-KO Mäuse rekrutieren weniger PMN in die Lunge als WT Mäuse 48 hpi60
Abb. 5.08	: ΙκBα ist nicht differentiell in PGLYRP2-KO vs. WT Mauslungen 24 und 48 hpi reguliert61
Abb. 5.09	: Das Mikrobiom im <i>Caecum</i> von WT und PGLYRP4-KO Mäusen weisen eine vergleichbare α - und
	β-Diversität auf
Abb. 5.10	: Auf Phylum- und Familien-Ebene wurden vergleichbare Mikrobiome im Caecum von uninfizierten,
	wie auch von infizierten WT und PGLYRP2-KO Mäusen ermittelt
Abb. 5.11	: Geringere Bakterienlast in PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen 48 h nach Infektion mit S. pneumoniae. 65
Abb. 5.12	: Mehr Zellinfiltration und stärkere Entzündung in den Lungen von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. 66
Abb. 5.13	: Mehr Entzündung und Zellinflux von Immunzellen in den Lungen der mit S. pneumoniae infizierten
	PGLYRP4-KO vs. WT Mäuse67
Abb. 5.14	: Geringere relative Genexpression von Pglyrp4 in primären AEC von WT Mäusen nach in vitro
	Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>
Abb. 5.15	Zelladhäsionsmoleküle sind differentiell exprimiert in AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen70
Abb. 5.16	Induktion von C3, Ifng und Ifngr1 in AEC, aber nicht AMΦ und PMN von PGLYRP4-KO vs. WT
	Mäusen
Abb. 5.17	: Höhere Expression von Zelladhäsionsmolekülen in PGLYRP4-KO vs. WT AEC

Abb. 5.18: Stärkere alveoläre Barriere von PGLYRP4-KO vs. WT Epithelzellen		
Abb. 5.19: Der zellfreie AEC-Überstand von PGLYRP4-KO Mäusen aktiviert PMN zu einer besseren		
Eliminierung von Pneumokokken als der AEC-Überstand von WT Mäusen		
Abb. 5.20: Rekombinantes PGLYRP4 wird durch Pneumokokken-Proteasen abgebaut		
Abb. 5.21: Höhere α-Diversität des <i>Caecum</i> -Mikrobioms in uninfizierten PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen77		
Abb. 5.22: Unterschiede in der β-Diversität der Mikrobiome im Caecum zwischen uninfizierten, aber nicht		
zwischen infizierten WT und PGLYRP4-KO Mäusen78		
Abb. 5.23: Mehr Bacteroidetes und Proteobacteria im Caecum von uninfizierten PGLYRP4-KO vs. WT		
Mäusen		
Abb. 5.24: Weniger Lachnospiraceae und mehr Bacteroidales und Prevotellaceae in uninfizierten, aber nicht in		
infizierten PGLYRP4-KO vs. WT Caeca79		
Abb. 5.25: Das Mikrobiom von WT bzw. PGLYRP4-KO Mäusen konnte durch Vergesellschaftung erfolgreich		
auf keimfreie WT Mäuse übertragen werden		
Abb. 5.26: Die Mikrobiota von PGLYRP4-KO Tieren sind protektiv gegenüber einer S. pneumoniae-induzierten		
Pneumonie		
Abb. Anhang 1: KEGG-Signalweg der "Herpes-Simplex Infektion" XXI		
Abb. Anhang 2: Ausschnitt des KEGG-Signalweges der ZelladhäsionsmoleküleXXII		
Abb. Anhang 3: IFN-assoziierte Gene sind differentiell exprimiert in AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen.		
XXIII		

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.01: Geräte und Instrumente mit Hersteller.	25
Tab. 3.02: Computerprogramme zur Auswertung und Steuerung von Geräten und Instrumenten mit Her-	steller. 25
Tab. 3.03: Verbrauchsmaterialen mit Bestellnummer und Hersteller	26
Tab. 3.04: Chemikalien mit Bestellnummer und Hersteller.	27
Tab. 3.05: Fortsetzung von Tab. 3.4	
Tab. 3.06: Arzneimittel mit Pharmareferenz- oder Zulassungsnummer und Hersteller	
Tab. 3.07: Proteine und Enzyme mit Bestellnummer und Hersteller	29
Tab. 3.08: Verwendete Antibiotika mit Angabe der Bestellnummer und des Herstellers	29
Tab. 3.09: Größenstandards für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Western Blot Ar	alyse mit
Bestellnummer und Hersteller	29
Tab. 3.10: Kommerzielle Kits und gebrauchsfertige Reagenzien mit Bestellnummer und Hersteller	30
Tab. 3.11: Verwendete Bakterienstämme	30
Tab. 3.12: Antikörper mit Antigen, Konjugat, Anwendungsbereich, Bestellnummer und Hersteller	31
Tab. 3.13: Oligonukleotide für die qPCR mit Gennamen und Bestellnummer	32
Tab. 3.14: Medien und Lösungen für die Bakterienkultur mit Substanz- und Mengenangaben	32
Tab. 3.15: Lösungen und Puffer für die in vivo Versuche mit Substanz- und Mengenangabe	33
Tab. 3.16: Benötigte Medien, Lösungen und Puffer für die Kultur und Isolierung von primären Zellen m	nit
Substanz- und Mengenangaben	34
Tab. 3.17: Fortsetzung von Tab. 3.16.	35
Tab. 3.18: Lösungen und Puffer für die Umschreibung und Amplifizierung von cDNA	35
Tab. 3.19: Benötigte Medien, Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE und Western Blot Analyse mit S	ubstanz-
und Mengenangaben	35
Tab. 3.20: Fortsetzung von Tab. 3.19.	36
Tab. 4.01: Definition der Zellpopulation nach Markerexpression.	41
Tab. 4.02: PCR Programm zur Generierung der DNA-Bibliothek	42
Tab. 4.03: PCR Programm für die Adapter- und Barcode-Ligation	42
Tab. 4.04: Antikörper für die immunhistochemische Analyse mit erkanntem Ziel, durch die positive Fär	bung
detektierte Zellen, Bestellnummer und Hersteller	43
Tab. 4.05: PCR Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA	47
Tab. 4.06: Programm für die Präamplifizierung von cDNA für die qPCR	48
Tab. 4.07: Amplifikationsprogramm für die qPCR	48

12 Publikationen, Vorträge und Präsentationen

In Bearbeitung

- Artikel: Dabrowski, AN, Shrivastav, A, Conrad, C, Komma, K, Weigel, M, Dietert, K, Gruber, AD, Bertrams, W, Wilhelm, J, Schmeck, B, Reppe, K, PD, Aly, S, Suttorp, N, Hain, T und Zahlten, J.
 "Peptidoglycan recognition protein 4-deficiency enhances bacterial clearance of *Streptococcus pneumoniae* in mice".
- Artikel: Dabrowski, AN, Conrad, C, Behrendt, U, Shrivastav A, Baal, N, Hackstein, H, N'Guessan, PD, Aly, S, Reppe, K, Suttorp, N, Zahlten, J. "Peptidoglycan recognition protein 2 alters the immune response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice".
- 2018
 - Artikel: Shrivastav, A, Dabrowski, AN, Conrad, C, Baal, N, Hackstein, H, Plog, S, Dietert, K, Gruber, AD, N'Guessan, PD, Aly, S, Suttorp, N, Zahlten, J. "Peptidoglycan Recognition Protein 3 Does Not Alter the Outcome of Pneumococcal Pneumonia in Mice" Front Microbiol 2018. 9:103, doi: 10.3389/fmicb.2018.00103.

2017

- Poster: Dabrowski, AN, Conrad, C, Behrendt, U, Shrivastav, A, Baal, N, Hackstein H, Reppe, K, Aly, S, Suttorp, N, Zahlten, J. "The host defence protein PGLYRP2 alters the innate immune response in mice during pneumococcal pneumonia", 28th European students' conference, Berlin, 27.-30.09.2017
- Poster: Dabrowski, AN, Conrad, C, Behrendt, U, Baal, N, Hackstein, H, Reppe, K, Aly, S, Suttorp, N, Zahlten, J. "PGLYRP2 Knockout Alters the Innate Immune Response in Mice and Cause Early Death in *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection", 47th DGfI Konferenz, Erlangen, 12.-15.09.2017, Abstrakt veröffentlicht: Eur J Immunol 2007, 47(Suppl 2):1-333, doi: 10.1002/eji.201770300

2016

- Poster: Dabrowski, AN, Shrivastav, A, Conrad, C, Behrendt, U, Aly, S, Baal, N, Hackstein, H, Suttorp, N, Zahlten, J. "The Influence of Peptidoglycan Recognition Protein 2 Knockout in *Streptococcus pneumoniae* infection", 2nd International Conference "Innate immunity of the lung Improving pneumonia outcome", Berlin, 15.-17.09.2016
- Vortrag: Dabrowski, AN, Shrivastav, A, Conrad C, Behrendt U, Baal, N, Hackstein H, Suttorp N and Zahlten, J. "Role of Peptidoglycan Recognition Protein 2 in *Streptococcus Pneumoniae* Infection", 20. Symposium "Infektion und Immunabwehr" des AK Infektionsimmunologie der DGfI, Burg Rothenfels, 09.-11.03.2016

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

14 Anhang



Abb. Anhang 1: KEGG-Signalweg der "Herpes-Simplex Infektion". WT und PGLYRP4-KO AEC wurden für 6 h mit (D39, S. pneumoniae MOI = 1) stimuliert. Die Genexpression wurde auf dem Agilent SurePrint G3 *Mouse* Gene Expression v2 Microarray 8x60K analysiert. Der KEGG-Signalweg "Herpes simplex infection" (map05168) wurde für die Visualisierung verwendet. Es wurde eine gepoolte Analyse aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Herpes-Simplex Gene sind weiß hinterlegt. Rot: induziert in PGLYRP4-KO gegenüber WT. Grün: reduziert in PGLYRP4-KO gegenüber WT.



Abb. Anhang 2: Ausschnitt des KEGG-Signalweges der Zelladhäsionsmoleküle. WT und PGLYRP4-KO AEC wurden für 6 h mit *S. pneumoniae* (D39, MOI = 1) stimuliert. Die Genexpression wurde auf dem Agilent SurePrint G3 *Mouse* Gene Expression 8x60K v2 Microarray analysiert. Der Epithelzell-Ausschnitt des KEGG-Signalweges "*Cell adhesion molecules*" (map04514) wurde für die Visualisierung verwendet. Es wurde eine gepoolte Analyse aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Rot: induziert in PGLYRP4-KO gegenüber WT. Grün: reduziert in PGLYRP4-KO gegenüber WT.



Abb. Anhang 3: IFN-assoziierte Gene sind differentiell exprimiert in AEC von PGLYRP4-KO vs. WT Mäusen. Es wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse mit infizierten und uninfizierten WT und PGLYRP4-KO AEC durchgeführt. Die 50 am stärksten hochregulierten Gene in uninfizierten PGLYRP4-KO vs. WT bzw. infizierten (D39, MOI = 1, 6 h) PGLYRP4-KO vs. WT AEC werden dargestellt. Es wurde eine gepoolte Analyse aus drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. IFN-regulierte bzw. –assoziierte Gene sind in Rot und fettgedruckt dargestellt.

XXIII
15 Selbständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, nur die von mir angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet habe und dass diese Arbeit nicht zuvor in einem anderen Prüfungsverfahren eingereicht wurde.

Datum, Ort

Unterschrift