

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und  
Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Inflammatorische Caspasen und ihre Funktion in der Reaktion  
der Immunzellen auf lebende Bakterien**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Julia Halkin

aus Duschanbe

Datum der Promotion: 04.03.2022



# Inhaltverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>ix</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>x</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>1</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	3
1.1.1 Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	3
1.1.1.1 TLRs .....	4
1.1.1.2 NLRs .....	5
1.1.2 Inflammasome.....	6
1.1.2.1 NLRP3-Inflammasom und seine Aktivierung .....	6
1.1.3 Zelltod.....	8
1.1.3.1 Apoptose, Nekrose und Nekroptose.....	8
1.1.3.2 Pyroptose .....	9
1.2 Inflammatorische Caspasen .....	10
1.2.3 Caspase-1.....	10
1.2.4 Caspasen-4 und -5 .....	11
1.3 Die Reaktion der Immunzellen auf gramnegative Bakterien .....	12
1.3.1 <i>Escherichia coli</i> .....	13
1.3.2 Lebende und tote EC: RNA als vita-PAMP .....	14
1.3.3 Sepsis und septischer Schock .....	15
1.3.4 Die Rolle der Caspase-4 in der Sepsis.....	16
1.4 Ziel der Arbeit.....	17

<b>2 Materialien und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1 Zellen .....	18
2.1.1 Humane Monozyten.....	18
2.1.1.1 Die Gewinnung der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) .....	18
2.1.1.2 Die Isolierung der Monozyten aus PBMCs .....	18
2.1.2 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MoDC).....	19
2.1.3 THP-1 Zellen.....	19
2.1.3.1 Caspase-1 defiziente THP-1 Zellen .....	19
2.1.3.2 Stabile THP-1 Zelllinien .....	19
2.2 Bakterien.....	20
2.3 Infektion der Zellen mit Bakterien .....	21
2.4 Caspase-Inhibitoren.....	21
2.5 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms .....	22
2.6 RNA-Transfektion .....	22
2.6.1 Präparation von bakterieller RNA aus EC.....	22
2.6.2 Transfektion der THP-1 Zellen mit der Gesamt-RNA aus EC .....	23
2.7 Lentivirale Gentransduktion .....	23
2.7.1 Allgemeines .....	23
2.7.2 Plasmide .....	23
2.7.3 Plasmidpräparation .....	24
2.7.4 HEK293T-Zellen .....	24
2.7.5 Transfektion der HEK293T-Zellen.....	25
2.7.6 Lentivirale Transduktion von MoDC.....	26
2.7.7 Testung der shRNA-Vektoren.....	26
2.7.8 Etablierung stabiler THP-1 Zelllinien mittels lentiviralen shRNA-Transduktion.....	28
2.7.8.1 Puromycin Kill Curve .....	28
2.7.8.2 Transduktion der THP-1 Zellen mit lentiviralen Vektoren .....	29

2.8 ELISA .....	29
2.9 Zelltod-Messung .....	30
2.9.1 Messung der Laktatdehydrogenase-Freisetzung .....	30
2.9.2 Messung der Adenylat-Kinase-Freisetzung .....	30
2.10 Western Blot .....	31
2.10.1 Probenvorbereitung für Western Blot .....	31
2.10.1.1 Vorbereitung der Lysat-Überstand-Mischungen .....	31
2.10.1.2 Präzipitation von Zellüberständen mittels Methanol-Chloroform-Fällung.....	31
2.10.2 SDS-PAGE Gelelektrophorese.....	32
2.10.3 Immunoblot.....	32
2.11 Statistik .....	34
2.12 Medien.....	34
2.13 Chemikalien und Substanzen .....	36
2.14 Kits .....	39
2.15 Geräte .....	40
2.16 Verbrauchsmaterial .....	41
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1 Initiierung von Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Produktion durch lebende Bakterien in humanen Monozyten .....	43
3.2 Hemmung von Caspase-1 reduziert IL-1 $\beta$ -Produktion, Hemmung von Caspase-4 reduziert Zelltod .....	44
3.3 Andere Caspasen zeigten keinen Einfluss auf die Regulation von IL-1 $\beta$ und Zelltod .....	46
3.4 Infektion mit lebenden Bakterien führte zur Aktivierung von Caspase-1 und -4	
3.5 Transienter Knock-Down von Caspase-4 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion von IL-1 $\beta$ .....	50

3.6 Stabiler Knock-Down von Caspase-1 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion und nicht des Zelltodes.....	52
3.7 Stabiler Knock-Down von Caspase-4 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion der inflammatorischen Zytokine und des Zelltodes .....	56
3.8 Stabiler Knock-Down von ASC führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion von IL-1 $\beta$ und nicht des Zelltodes.....	58
3.9. Die Rolle von Caspase-1 und Caspase-4 bei der Erkennung von EC-RNA.....	61
3.10 Die Immunantwort auf EC-RNA wurde von ASC reguliert .....	64
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>66</b>
4.1 Abschließende Bemerkungen.....	77
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>88</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>89</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>90</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stimulation von Pyroptose und IL1 $\beta$ -Produktion durch lebende und nicht durch tote Bakterien in humanen Monozyten.....	44
Abbildung 2: Hemmung von Caspase-1 reduziert IL-1 $\beta$ -Produktion, Hemmung von Caspase-4 reduziert den Zelltod und beeinflusste weniger die IL-1 $\beta$ -Produktion. ....	45
Abbildung 3: Inhibition weiterer Caspasen zeigte keinen Einfluss auf IL-1 $\beta$ -Produktion und Zelltod.....	47
Abbildung 4: In MoDC führte eine Infektion mit lebenden Bakterien zur Aktivierung von Caspase-1 und -4 und zur Freisetzung von IL-1 $\beta$ in den Überstand.....	48
Abbildung 5: In MoDC führte eine Infektion mit lebenden und nicht mit toten Bakterien zum Zelltod und zur Produktion von IL-1 $\beta$ . ....	49
Abbildung 6: KD-Effizienz für Caspase-4 durch die transiente lentivirale shRNA-Transduktion. ....	50
Abbildung 7: Transienter KD von Caspase-4 in MoDC führte zur spezifischen Reduktion von IL-1 $\beta$ nach einer Infektion mit lebenden Bakterien.. ....	51
Abbildung 8: Der stabile KD von Caspase-1 inhibiert IL-1 $\beta$ -Produktion und zeigte fast keinen Einfluss auf den Zelltod nach Infektion mit lebenden und toten Bakterien. ....	53
Abbildung 9: Der stabile KD von Caspase-1 führte zur nahezu aufgehobenen IL-1 $\beta$ -Freisetzung.....	54
Abbildung 10: Der stabile KD von Caspase-1 in späteren Passagen zeigte unspezifische Effekte auf alle untersuchten inflammatorischen Zytokinen.....	55
Abbildung 11: Stabiler KD von Caspase-4 führte zu einer Reduktion von IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand.. ....	56
Abbildung 12: Stabiler KD von Caspase-4 führte zu einer unspezifischen Reduktion inflammatorischer Zytokine und einer nicht signifikanten Reduktion des Zelltodes.....	57
Abbildung 13: Stabiler KD von ASC führte zur nahezu aufgehobenen IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand nach einer Infektion der Zellen mit lebenden und toten EC. ....	59

Abbildung 14: Stabiler KD von ASC führte zur spezifischen Reduktion von IL-1 $\beta$ und nicht zur Reduktion von Zelltod nach einer Infektion mit lebenden Bakterien.. .....	60
Abbildung 15: Caspase-1-KD führte in der ersten Passage der stabilen Caspase-1-KD Zelllinie zur Reduktion von IL-1 $\beta$ und TNF- $\alpha$ in Reaktion auf EC-RNA. ....	61
Abbildung 16: In späteren Passagen der Caspase-1 defizienten THP-1-Zellen kam es zu einer Reduktion aller untersuchten Zytokine in Reaktion auf intrazelluläre EC-RNA.. .....	62
Abbildung 17: Caspase-4-KD führte nicht zu einer Reduktion des Zelltodes oder der Zytokinsekretion in Reaktion auf EC-RNA.....	63
Abbildung 18: Die Immunantwort auf EC-RNA wurde von ASC reguliert.....	64
Abbildung 19: Unterschiedliche Rollen der Caspasen-1 und-4 bei der Reaktion auf lebende EC.. .....	79



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: die Liste der verwendeten Caspase-Inhibitoren .....	22
Tabelle 2: eingesetzte DNA-Mengen für Transfektion (pro Well), modifiziert nach (103) ...	25
Tabelle 3: die Liste der Plasmide, die bei allen Versuchen eingesetzt wurden (Hilfspartikel und Kontrollvektor).....	27
Tabelle 4: Liste aller getesteten lentiviralen shRNA-Vektoren. ....	28
Tabelle 5: die Liste der für die Versuche eingesetzten lentiviralen shRNA-Vektoren.....	28
Tabelle 6: die Vorbereitung von 2 Trenngelen und 2 Sammelgelen .....	32
Tabelle 7: die Liste der verwendeten primären Antikörper .....	33
Tabelle 8: die Liste der verwendeten sekundären Antikörper .....	34
Tabelle 9: Medien .....	36
Tabelle 10: Chemikalien und Substanzen .....	39
Tabelle 11: Kits .....	40
Tabelle 12: Geräte .....	41
Tabelle 13: Verbrauchsmaterial .....	42

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIM2	absent in melanoma 2
AK	Adenylatkinase
ASC domain	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
ATP	Adenosintriphosphat
BMMs	bone marrow-derived macrophages
CARD	caspase activation and recruitment domain
casp	Caspase
CD	cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CLRs	C-type lectin Rezeptoren
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX2	Zyklooxygenase Typ 2
CRISP/Cas associated protein	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein
DAEC	diffus-haftende <i>EC</i>
DAMPs	danger-associated molecular patterns
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EAEC	enteroaggregative <i>EC</i>
<i>EC, EC</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>EC</i>

EIEC	enteroinvasive <i>EC</i>
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay
EPEC	enteropathogene <i>EC</i>
ETEC	enterotoxische <i>EC</i>
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBP	Guanylat-binding protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HEK	Human-Embryonic-Kidney
HEK293T	Human-Embryonic-Kidney-T-Zellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein B1
HK, HK <i>EC</i>	hitzeinaktivierte <i>EC</i>
HRP	Horseradish-peroxidase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	NO-Synthase
IRAK	Interleukin-receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
KD	Knock-Down
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertania
LBP	LPS-Bindungsprotein
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide

LRR	Leucin-rich repeat
LV	Lentivirus
M	Mol
MAP	Mitogen-activated protein kinase
MDP	Muramyl-Dipeptid
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
mM	Millimol
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NaCl	Natriumchlorid
NEAA	Non-Essential Amino Acid
NFκB	nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
NLRs	NOD-like Rezeptoren
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 3
NLRP10	NOD-like receptor family, pyrin domain containing protein 10
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
NP-40	nonyl phenoxyethoxyethanol
OD	optische Dichte
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PRRs	Pattern recognition receptors

PBMCs	peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate buffered saline
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
poly I:C	polyinosinic:polycytidylic acid
PYD	Pyrin-Domäne
RCF	relative centrifugal force
RIG	retinoic acid-inducible gene
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RLRs	RIG-I-like Rezeptoren
RLU	relative Light Unit
RNA	ribonucleic acid
RPM	Revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAMHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
SARM	sterile $\alpha$ and HEAT-Armadillo motifs-containing protein
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
shRNA	short harpin RNA
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SIV-VLP	Simianes Immundefizienz-Virus-Virus-like-particles
SOFA	Sepsis-related organ failure assessment
TE	Tris + EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll/Interleukin-1 interagierende Domäne
TIRAP	TIR domain-containing adaptor protein
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TMB	3,3',5,5-Tetramethylbenzidin

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRIS-HCL	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Chlorwasserstoff
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## Abstract

The innate immune system detects the constituents of the microbial molecules (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) with pattern recognition receptors (PRRs). The activation of PRRs initiates intracellular signal cascades leading to the induction of proinflammatory cytokines. An appropriate immune response is essential to eliminate bacterial infections, here exemplified by *Escherichia coli* (EC). However, unrestrained immune responses can cause sepsis and a septic shock. Inflammatory caspases are very important for the pathogenesis of sepsis. The mouse has been a useful model to understand the function of caspases. However, this model is limited by incomplete conservation of murine caspases in humans. Human caspase function has been of high interest in recent years. And still the function of human inflammatory caspases, especially caspase-4, is not completely understood.

The empirical results of this paper demonstrate that both caspase -1 and -4 were activated by live but not by dead EC. Caspase-1 and -4 regulated the immune response to live bacteria. Activation of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) was regulated by caspase-1. In contrast, pyroptosis was controlled by caspase-4, in a caspase-1-independent manner. In monocyte-derived-dendritic cells, caspase-4 supported caspase-1 in the activation of IL-1 $\beta$ , which was not observed in monocytes. The inflammasome component 'apoptosis-associated speck line protein containing a caspase recruitment domain' (ASC) was required for the activation of IL-1 $\beta$ , but dispensable for pyroptosis. This effect was observed both after bacterial infection and upon transfection of bacterial-RNA.

In summary, this study demonstrates that caspases-1 and -4 differentially regulate the immune response to live EC. Pyroptosis of human immune cells was regulated by caspase-4, independently of caspase-1 and canonical inflammasomes.

## Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem erkennt Bestandteile von Mikroorganismen wie Bakterien, sogenannte ‚pathogen-associated molecular patterns‘ (PAMPs) durch Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs). Nach der Aktivierung von PRRs kommt es zur Einleitung von intrazellulären Signalkaskaden und als Ergebnis dessen zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Eine robuste Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist für die Bekämpfung von Infektionen, z.B. durch Bakterien wie *Escherichia coli* (EC), essentiell. Eine überschießende Immunantwort kann jedoch zur Sepsis und septischem Schock führen. Inflammatorische Caspasen spielen in der Pathogenese der Sepsis eine wichtige Rolle. Viele Studien zur Funktion von Caspasen wurden in Mausmodellen durchgeführt. Dieses Modell ist sehr hilfreich, hat jedoch Grenzen, weil nicht alle murinen Caspasen im Menschen konserviert sind. Im vergangenen Jahrzehnt wurde daher vermehrt an humanen Caspasen geforscht. Trotzdem sind die genauen Funktionen der inflammatorischen Caspasen des Menschen, vor allem die der Caspase-4, nicht vollständig geklärt.

Die hier vorgelegte Studie zeigt, dass die humanen Caspasen-1 und -4 spezifisch durch lebende *E. coli* und durch bakterielle RNA, nicht jedoch durch tote EC aktiviert werden. Die Funktionen der Caspasen-1 und -4 in der Reaktion auf lebende Bakterien sind verschieden. Die IL-1 $\beta$ -Aktivierung wurde vor allem durch die Caspase-1 vermittelt, während inflammatorischer Zelltod, sogenannte Pyroptose, durch Caspase-4, unabhängig von Caspase-1, vermittelt wird. Die Caspase-4 unterstützt außerdem in MoDC Caspase-1 bei der IL-1 $\beta$ -Aktivierung, jedoch nicht in Monozyten. Der Bestandteil des Inflammasoms ‚Apoptosis-associated speck line protein containing a caspase recruitment domain‘ (ASC) war für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  erforderlich, zeigte aber keinen Einfluss auf die Pyroptose. Dies war sowohl nach einer bakteriellen Infektion der Fall als auch nach der Transfektion von bakterieller RNA.

Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass Caspasen-1 und -4 bei der Reaktion auf lebende EC unterschiedliche Funktionen ausüben. Die Pyroptose funktioniert Caspase-4-abhängig ohne Einfluss von Caspase-1 und des kanonischen Inflammasoms.



# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind zwei lebensnotwendige Säulen der Immunabwehr von Wirbeltieren. Das angeborene Immunsystem bildet die vorderste Front der Abwehr gegen die mikrobiellen Gefahren. Es ist phylogenetisch älter als das adaptive und findet sich in allen Klassen der Pflanzen und Tiere wider (1).

Zum angeborenen Immunsystem zählt ein großes Spektrum an spezialisierten Immunzellen, wie zum Beispiel Monozyten, dendritische Zellen (DC), Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Dies sind phagozytierende Zellen, die Mikroorganismen intrazellulär aufnehmen und zerstören können (2). Außerdem befinden sich auf der Zelloberfläche dieser und anderer Immunzellen verschiedene Erkennungsrezeptoren, die bestimmte, im Laufe der Evolution konservierte Muster von Mikroorganismen und Pathogenen erkennen können – sogenannte PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns). Als Reaktion auf diese Muster erfolgt eine Entzündungsreaktion, die durch inflammatorische Zytokine getragen wird. Diese führen zur Anlockung weiterer Leukozyten und schließlich zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Antigen-präsentierende Zellen (3).

Ist der Zellschaden durch Pathogene zu groß, folgt der Zelltod. Die Freisetzung der Zellbestandteile ist ein weiteres Signal für die Anlockung von Leukozyten (4). Außer der Fähigkeit zur Phagozytose können die Zellen des angeborenen Immunsystems antimikrobiellen Peptide und Enzyme wie das Lysozym, sowie toxisch wirkende reaktive Sauerstoffspezies freisetzen (5, 6). Diese und andere Mechanismen sind für das Abtöten von Pathogene hocheffizient, jedoch kann eine überschießende Immunreaktion einen erheblichen Gewebs- und Organschaden bewirken und so den Wirt selber schädigen oder sogar töten (7).

### 1.1.1 Erkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems können PAMPs durch jeweils für diese Muster bestimmte Rezeptoren erkennen, sogenannte ‚pattern recognition receptors‘ (PRRs). Diese Rezeptoren sind im Laufe der Evolution entstanden und sind bei Tieren wie bei Pflanzen vorhanden. PRRs befinden sich entweder auf der Zelloberfläche oder

im Inneren der Zellen und leiten nach ihrer Aktivierung Signalkaskaden ein, die der Zelle ermöglichen, auf die Mikroben zu reagieren (8). Neben den PAMPs existieren Danger-associated molecular patterns (DAMPs), die bei Zellstress oder -Schädigung gebildet werden. Dazu gehören z.B. Adenosintriphosphat (ATP), Harnsäure, High-Mobility-Group-Protein B1 (HMGB1) sowie viele weitere Moleküle. Auch DAMPs werden von PRRs erkannt, was dem Immunsystem ermöglicht auf Zell- und Gewebsschäden zu reagieren (9).

Zu den beim Menschen beschriebenen Klassen der PRRs zählen die Toll-like Rezeptoren (TLRs), die retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like Rezeptoren (RLRs), die C-type lectin Rezeptoren (CLRs), nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLRs) und die zytosolischen Desoxyribunukleinsäure (Englisch DNA)-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind jeweils auf bestimmte mikrobielle Strukturen spezialisiert und sind in der Lage Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, bzw. Kombinationen (z.B. Lipoproteine, Peptidoglykane etc.) und Nukleinsäuren zu erkennen (10).

#### **1.1.1.1 TLRs**

Die am besten charakterisierte Klasse der PRRs sind die TLRs. Als evolutionäre Vorläufer der TLRs in Wirbeltieren, wurde als erstes in *Drosophila melanogaster* der Rezeptor ‚Toll‘ beschrieben, woraufhin die orthologen Gene in Wirbeltieren ‚Toll-like‘ Rezeptoren genannt wurden (11). Menschen besitzen 10 verschiedene und Mäuse besitzen 12 TLRs. TLR1, 2, 4, 5 und 6 sind auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen z.B. Membranbestandteile verschiedener Pathogene, sowie Flagellin. TLR3, 7, 8, 9 sind im Endosom lokalisiert und erkennen Nukleinsäuren (12). Einige TLRs sind auf die Detektion bakterieller Bestandteile spezialisiert. So erkennt der TLR2 unter anderem Lipoteichonsäure grampositiver Bakterien (13) und Lipoarabinomannan in Mykobakterien (14). Das bekannteste PAMP, Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien, wird u.a. durch TLR4 erkannt (15), was in dieser Arbeit im Folgenden weiter thematisiert wird. TLR5 erkennt monomeres Flagellin verschiedener Bakterien (16).

TLR4 besitzt eine extrazelluläre Domäne, die reich an Leucinmolekülen ist, eine sogenannte ‚Leucin-rich repeat domain‘ (LRR) welche im Verbund mit CD14 und MD2 den LPS Rezeptorkomplex bildet. Die intrazelluläre Domäne von TLR4 enthält die Toll/Interleukin-1 interagierende (TIR) Domäne. Nachdem LPS erkannt und gebunden

wurden, kommt es zur Oligomerisierung von TLR4 und zur Einleitung der intrazellulären Signalkaskade über die TIR-Domäne. Es sind 5 verschiedene Adaptorproteine vom TLR4 bekannt, welche die Signalweiterleitung in der Zelle vermitteln: ‚myeloid differentiation primary response gene 88‘ (MyD88), ‚TIR domain-containing adaptor protein‘ (TIRAP), ‚TIR domain-containing adaptor inducing Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ )‘ (TRIF), ‚TRIF-related adaptor molecule‘ (TRAM) und ‚sterile  $\alpha$  and HEAT-Armadillo motifs-containing protein‘ (SARM) (17).

Der TLR4-Signalweg läuft entweder MyD88-abhängig oder -unabhängig. Der MyD88-abhängige Signalweg führt über TIRAP zuerst zur Aktivierung von interleukin-receptor associated kinase (IRAK) und später der mitogen-activated protein kinase (MAP-Kinase). MAP-Kinasen führen schließlich zur Aktivierung des nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells (NF $\kappa$ B) und damit zur Produktion inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 und pro-IL-1 $\beta$  (18). Der MyD88-unabhängige Signalweg läuft über TRIF und TRAM und führt über die Rekrutierung von weiteren Adaptormolekülen schließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ‚Interferon regulatory factor‘ (IRF)-3, welcher für die Produktion von Typ I Interferon (IFN) zuständig ist (19). Dieses regulierende Protein ist wichtig für die anti-virale und anti-bakterielle Abwehr (20). Außerdem führt auch der MyD88-unabhängige Signalweg zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B (21). SARM hingegen inhibiert den TLR4-Signalweg, indem es den TRIF-Signalweg hemmt (22).

### **1.1.1.2 NLRs**

Die NLRs sind intrazelluläre PRRs, die aus 3 Domänen aufgebaut sind: die NACHT-Domäne, die C-terminale Domäne und die N-terminale Domäne. Alle NLRs besitzen eine identische NACHT-Domäne, die ihre Oligomerisierung vermittelt. Fast alle NLRs mit Ausnahme von NLRP10 besitzen eine leucinreiche C-terminale Domäne zur Liganden-Bindung. Die N-terminale Domäne unterscheidet sich bei verschiedenen NLRs und ist für die Proteininteraktion und damit für die Signalweiterleitung zuständig (23).

Die Subfamilie der NLRs NOD, von denen NOD1 und NOD2 am besten charakterisiert sind, erkennen Peptidoglykan-Bestandteile der bakteriellen Zellwand und führen über die Rekrutierung von MAP-Kinasen zur Aktivierung von NF $\kappa$ B und damit zur Produktion proinflammatorischer Zytokine (24).

Die andere Subfamilie der NLRs, die NLRPs, ist durch eine N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD) oder ‚caspase activation and recruitment domain‘ (CARD) gekennzeichnet, die eine Interaktion mit ASC und Caspase-1 erlaubt. Die bekanntesten Vertreter dieser Subfamilie sind NLRP1 und NLRP3. Die NLRP-Subfamilie ist an der Formation der Inflammasoms beteiligt (25).

### **1.1.2 Inflammasome**

Inflammasome sind große Multiproteinkomplexe, die sich im Zytosol der Zellen des angeborenen Immunsystems bilden und durch verschiedene Stimuli aktiviert werden können. Bisher sind vier Inflammasome beschrieben: NLRP1, NLRP3, NLR family CARD domain-containing protein 4 (NLRC4) und absent in melanoma 2 (AIM2). Diese unterscheiden sich in ihrem Aufbau und reagieren auf unterschiedliche Stimuli. Gemeinsam ist ihnen, dass sie Caspase-1 aktivieren, eine Cysteinprotease, die für die Prozessierung von IL-1 $\beta$  und IL-18 und für die Pyroptose verantwortlich ist. Das NLRC4/Naip5-Inflammasom interagiert direkt mit Caspase-1. NLRP1-, NLRP3- und AIM2-Inflammasome brauchen das Adaptorprotein ASC um Caspase-1 zu aktivieren (26).

Das Adaptorprotein ASC (kodiert durch das Gen PYCARD) besteht aus einer N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD), die mit der PYD der NLRP-Familie und AIM2 interagiert, und einer C-terminalen Caspase activation and recruitment domain (CARD), die die CARD von Caspase-1 bindet (27). Außerdem wurde beschrieben, dass ASC ein vom Inflammasom unterschiedliches Pyroptosom formt und zu einer Caspase-1-abhängigen Pyroptose führt (28).

Es existieren ein bereits länger bekannter „kanonischer“ Weg der NLRP3-Inflammasomaktivierung und ein 2011 beschriebener „nicht-kanonischer“ Weg. Dieser funktioniert Caspase-1- und Inflammasom-unabhängig und führt über Caspase-11 zur Pyroptose (29).

#### **1.1.2.1 NLRP3-Inflammasom und seine Aktivierung**

Der NLRP3-Inflammasom ist von allen Inflammasomen am besten untersucht. Es existiert eine ganze Reihe von PAMPs und DAMPs, die zur Aktivierung von NLRP3 führen. Zu diesen zählen unter anderem LPS, Muramyl-Dipeptid (MDP), das Doppelstrang-RNA-Analog Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), virale DNA und

RNA, ATP, das Toxin Nigericin und viele mehr (30-32). Bei so einer Breite an aktivierenden Liganden ist es unwahrscheinlich, dass NLRP3 direkt an diese Moleküle bindet. Es existieren bestimmte intrazelluläre Signale, die als Reaktion auf verschiedene PAMPs und DAMPs gebildet werden. Eine abschließende Klarheit darüber, was genau der gemeinsame Mechanismus für die NLRP3-Aktivierung ist, besteht noch immer nicht. Eine kürzlich erschienene Studie beschrieb sehr detailliert und überzeugend, dass die Disintegration des trans-Golgi-Netzwerks (TGN) zu einer Rekrutierung von NLRP3 und seine Bindung an Phosphatidylinositol-4-phosphat Resten am TGN und damit zu einer Polymerisierung und Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms führt (33). Prinzipiell ging man bisher davon aus, dass immer zwei Signale notwendig sind für die Aktivierung von NLRP3, die im Folgenden beschrieben werden.

Das erste Signal wird auch „Priming“ genannt und erfolgt über die Bindung von einem PAMP oder DAMP an einen der Erkennungsrezeptoren. Damit wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, was zur Produktion von pro-IL1β und NLRP3-Proteine führt. Diese Proteine akkumulieren in der Zelle bis das zweite „Activation“ Signal zur Inflammasomaktivierung kommt (34). Es ist gut belegt, dass Kalium-Ausstrom zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt (35). Außerdem können reaktive Sauerstoffspezies aus Mitochondrien (36) oder die Freisetzung von lysosomalen Kathepsinen ins Zytosol (37) zur NLRP3-Aktivierung führen.

Im Folgenden wird die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms exemplarisch anhand von zwei Signalen erklärt: das „Priming“ Signal LPS und das „Activation“ Signal Nigericin. Nach Aktivierung von TLR4 durch LPS wird die intrazelluläre Signalkaskade MyD88-abhängig oder -unabhängig eingeleitet, welche in der NFκB-Aktivierung mündet und zur Transkription von pro-IL-1β und NLRP3 führt (18,21,38). Für den Aufbau des Inflammasoms ist, zumindest in den meisten Zellen, z.B. Nigericin als zweites Signal notwendig. Nigericin ist ein mikrobielles Toxin aus *Streptomyces hygroscopicus*, welches porenbildend ist und damit Kaliumausstrom aus der Zelle triggert (39). Das Absinken der Kaliumkonzentration wirkt als Aktivierungssignal für NLRP3 und führt zu dessen Oligomerisierung und Rekrutierung von ASC und Pro-Caspase-1 (35). Dadurch wird pro-Caspase-1 durch autoproteolytische Spaltung aktiviert. Es entsteht die aktive Form der Caspase-1, die das pro-IL-1β und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen spaltet.

Diese können nun aus der Zelle freigesetzt werden und z.B. weitere Immunzellen anlocken (26).

### **1.1.3 Zelltod**

Der programmierte Zelltod ist eine wichtige Reaktion von Zellen auf unterschiedliche Stimuli, der für das Überleben und die Entwicklung des Organismus von enormer Wichtigkeit ist. Lange Zeit wurde lediglich zwischen zwei Formen des Zelltodes unterschieden, Apoptose und Nekrose.

#### ***1.1.3.1 Apoptose, Nekrose und Nekroptose***

Der Begriff „Apoptose“ geht auf John Kerr und seine Kollegen zurück, die 1972 die Apoptose als eine Form des programmierten Zelltodes beschrieben. Diese Form des Zelltodes war ihrer Meinung nach für die embryonale Entwicklung, den normalen Zellumsatz im gesunden erwachsenen Organismus und für die Atrophie im Alter wichtig (40). Die Apoptose wurde als ein aktiv von den Zellen durchgeführter Prozess beschrieben, der im regulierten Zerfall des Zellkerns und des Zytoplasmas mündete. Dies führte zur Freisetzung von sogenannten „apoptotischen Körpern“, die von Phagozyten durch Efferozytose aufgenommen und abgebaut wurden. Die Signalwege der Apoptose sind streng reguliert, denn einmal aktiviert, führt sie dem Paradigma nach unvermeidlich zum Tod der Zelle. Die wichtigsten Beteiligten des apoptotischen Signalweges sind die apoptotischen Caspasen -2, -3, -6, -7, -8 und 9 (41).

Die Nekrose wurde lange Zeit als ein krankhafter, unkontrollierter Prozess des Zelltodes beschrieben, der durch schädigende Einflüsse auf die Zelle ausgelöst wird, zum Beispiel durch den Sauerstoffmangel oder verschiedene Toxine (42). Später wurde jedoch beobachtet, dass auch die Nekrose einige kontrollierte Prozesse enthält, wie die mitochondrielle Dysfunktion, den ATP-Abbau und den frühen Verlust der Integrität der Plasmamembran. Am Ende können auch pro-inflammatorischen Zytokine freigesetzt und eine Entzündungsreaktion im Gewebe eingeleitet werden (43). Im Unterschied zu apoptotischen Zellen, die schrumpfen und vollständig von phagozytierenden Zellen abgebaut werden, schwellen die nekrotischen Zellen an und setzen verschiedene Gefahrensignale (DAMPs) frei (44).

Die Nekroptose ist eine Form des Zelltodes, die durch inflammatorische Stimuli ausgelöst wird und durch Aktivierung der receptor-interacting protein kinase-3 (RIPK3)

geordnet abläuft. Die Zellen schwellen am Ende wie bei der Nekrose an und die Zellbestandteile werden in den Extrazellularraum freigesetzt (45).

Als letzte Form des programmierten Zelltodes wurde die Pyroptose beschrieben. Sie wird häufig als Reaktion auf mikrobielle Stimuli ausgelöst und durch inflammatorischen Caspasen vermittelt (46).

### **1.1.3.2 Pyroptose**

Die Pyroptose wurde zuerst in Makrophagen beobachtet, die mit *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* und *Shigella flexneri* infiziert wurden. Damals wurde dieser Prozess als Apoptose beschrieben (47). 1998 fand man heraus, dass der Zelltod der murinen Makrophagen durch *Shigella flexneri* von Caspase-1 abhängig war (48). Dasselbe wurde 1999 für *Salmonella typhimurium* in murinen Makrophagen beschrieben (49). Diese beiden Studien waren maßgeblich dafür verantwortlich, dass der Begriff „Pyroptosis“ 2001 eingeführt und als eine Form der Caspase-1 abhängigen Zelltodes definiert wurde (50). Diese Definition wurde nun um weitere pro-inflammatorische Caspasen erweitert, die ebenso wie die Caspase-1 Pyroptose auslösen können – Caspasen-4, -5 im Menschen und Caspase-11 in Nagern (51).

Unabhängig davon, ob die Pyroptose Caspase-1 abhängig oder unabhängig verläuft, ist das Ergebnis gleich: die Zellen schwellen an, es kommt zur Kondensation von Chromatin, jedoch nicht zur DNA-Fragmentierung, wie bei der Apoptose (52). Die Aktivierung dieser Caspasen führt zur Spaltung des pro-pyroptotischen Faktors Gasdermin D und zur Freisetzung von dessen N-terminalen Fragment. Dieses ist für die Entstehung der Poren der Zellmembran zuständig, was zur Lyse der Zelle führt (53). Es kommt zu einem schnellen Zerfall der Zellmembran und zur Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 und DAMPs wie HMGB1 und DNA (53-55). Der Signalweg der Pyroptose unterscheidet sich, je nachdem ob es Caspase-1-abhängig oder -unabhängig verläuft. Caspase-1 wird durch die so genannte „kanonische“ Inflammasomaktivierung in ihre aktive Form gespalten. Dieser Weg wurde bereits oben beschrieben. Der Caspase-1-unabhängige, „nicht kanonische“ Weg läuft über Caspasen-4, -5 oder -11. Diese Caspasen können LPS von gramnegativen Bakterien im Zytoplasma erkennen, was zur Caspase-Aktivierung und zur Pyroptose führt. Außerdem wird über das N-terminale Fragment von Gasdermin D das NLRP3-Inflammasom aktiviert und Caspase-1-abhängig IL-1 $\beta$  und IL-18 freigesetzt (57).

## 1.2 Inflammatorische Caspasen

Caspasen sind intrazelluläre Aspartat-spezifische Proteasen mit einem Cysteinrest im aktiven Zentrum. Die Caspasen sind im Laufe der Evolution weitgehend unverändert geblieben und erfüllen wichtige Aufgaben in der Inflammation und Apoptose (58). Alle Caspasen von Säugetieren weisen eine CARD am N-terminale Ende auf. Die Caspasen sind Zymogene, sie werden als inaktive Vorstufen (Pro-Caspasen) gebildet und erst nach proteolytischer Spaltung aktiviert.

Entsprechend ihrer Funktion werden Caspasen in zwei große Gruppen eingeteilt: proapoptotische Caspasen, die die Apoptose einleiten (Caspasen-2, -3, -6, -7, -8, -9, -10) und die inflammatorische Caspasen (Caspasen-1, -4, -5, -11, -12). Mäuse besitzen drei inflammatorische Caspasen (Caspasen-1, -11 und -12) und Mensch vier (-1, -4, -5, -12), wobei die Funktion von Caspase-12 unklar ist. Caspasen-4 und -5 stellen Orthologe der murinen Caspase-11 dar (58,59). Die humane Caspase-12 wurde lange als nicht funktionell eingestuft (60), aber vor kurzem wurde eine Rolle in der Apoptose beschrieben, die durch den Stress im endoplasmatischen Retikulum hervorgerufen wird (61).

Die Geschichte der Caspasen begann mit der Entdeckung der Protease-Aktivität, die das pro-IL-1 $\beta$  in die biologisch aktive Form überführte (62). Drei Jahre später wurde Caspase-1 als die dafür verantwortliche Protease beschrieben (63).

### 1.2.3 Caspase-1

Wie die übrigen Caspasen, wird Caspase-1 als Zymogen synthetisiert (Pro-Caspase-1, 45 Kilodalton (kDa)), welcher proteolytisch in zwei biologisch aktive Formen p20 (20 kDa) und p10 (10 kDa), und weitere wahrscheinlich biologisch inaktive Formen gespalten wird (64). Die CARD von Caspase-1 interagiert mit CARD der anderen Proteine wie ASC zur Formation des Inflammasoms, wodurch die Caspase-1 autoproteolytisch aktiviert wird (65). Die Rolle von Caspase-1 bei der Prozessierung der Zytokine pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen wurde in Mäusen erforscht, bei denen Caspase-1 genetisch ausgeschaltet wurde (knock-out). Die Mäuse hatten außer der Defekte in der IL-1 $\beta$ - und IL-18-Produktion eine Resistenz gegen septischen Schock (54,66). Aufgrund ihrer Funktion in der Spaltung von IL-1 $\beta$  in seine aktive Form wurde die Caspase-1 initial auch als „IL-1 $\beta$ -converting enzyme“ bezeichnet. Die Rolle



von Caspase-1 bei der Pyroptose wurde vor allem im Mausmodell anhand der Infektionen mit *Shigella* und *Salmonella* erforscht (48,49,67,68).

IL-1 $\beta$  ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine und wird v.a. von Makrophagen, dendritischen Zellen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten sezerniert. Es aktiviert das Immunsystem direkt oder über die Aktivierung anderer inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  (69) und IL-6 (70). Es führt neben einer NF $\kappa$ B-Aktivierung in den Zielzellen zur Expression der Zyklooxygenase Typ 2 (COX2), Phospholipase A2 und induzierbarer Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS), die in der Lage ist, NO zu produzieren. Die Folgen sind der Fieberanstieg, eine niedrigere Schmerzschwelle, die Vasodilatation und Blutdruckabfall. Außerdem steigert das IL-1 $\beta$  die Expression der Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen, wodurch die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten auf die Endothelzellen gefördert wird (71).

IL-18 wurde früher als IFN- $\gamma$ -produzierender Faktor beschrieben, der die Produktion von IFN- $\gamma$  in den Splenozyten stimuliert. Später wurden weitere Funktionen von IL-18 entdeckt, wie die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, Aktivierung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (34,72).

Die Caspase-1 abhängige Pyroptose, die über Gasdermin D erfolgt, wurde im vorherigen Kapitel beschrieben (53).

#### **1.2.4 Caspasen-4 und -5**

Einige Zeit lang wurde angenommen, dass die humane Caspase-4 nur für Apoptose, die durch den Stress im endoplasmatischen Retikulum hervorgerufen wird, wichtig ist (73). Jedoch war es auch länger bekannt, dass die humanen Caspasen-4 und -5 funktionelle Orthologe der Caspase-11 der Maus sind. 2011 beschrieben Kayagaki und Kollegen, dass die Caspase-11 für den LPS-vermittelten septischen Schock verantwortlich ist (29). Außerdem wurde 2013 entdeckt, dass die Caspase-11 LPS unabhängig von TLR4 erkennt (74,75). Es ist beschrieben, dass LPS aus phagozytierten Bakterien durch das Guanylat-binding-Protein (GBP) ins Zytosol gelangen und dort die Caspase-11 abhängige Pyroptose einleiten kann (76,77). Es kam die Frage auf, ob die funktionellen Orthologen der Caspase-11 im Menschen die gleichen Funktionen erfüllen, was die Forschung an Caspasen-4 und -5 intensivierte.

So entdeckte man, dass die Caspase-4 in der NLRP3-Inflammasom vermittelten Aktivierung der Caspase-1 eine Rolle spiele. Hierbei kam es Caspase-4-abhängig zur Freisetzung vom aktiven IL-1 $\beta$  in durch UV-B-Strahlen stimulierten humanen Keratinozyten (78). In einer weiteren Studie in Keratinozyten beschrieben die Autoren, dass Caspase-4 TLR3-abhängig zur Pyroptose führt (79). Die Caspase-4-abhängige Pyroptose wurde auch anhand von Epithelzellen und ihrer Infektion mit *Shigella flexneri* beschrieben (80). *Legionella pneumophila* führte in humanen Makrophagen zur Caspase-4-abhängigen Pyroptose und IL-1 $\alpha$ -Produktion, jedoch nicht zur IL-1 $\beta$ -Freisetzung (81). Außerdem wurde in humanen Zellen entdeckt, dass die Caspase-4 eine nicht kanonische Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit IL-1 $\beta$ -Freisetzung auslöst (82).

Für Caspase-5 wurde in einigen Studien eine der Caspase-4 ähnliche Funktion vermutet, da die Synthese der Caspase-5 auf mehrere proinflammatorische Stimuli mit einer erhöhten messenger RNA (mRNA)-Synthese, Proteinexpression und katalytischer Aktivität reagierte (83). Außerdem war Caspase-5 zusammen mit Caspase-4 nach einer LPS-Stimulation für IL-1 $\beta$ - und IL-1 $\alpha$ -Produktion verantwortlich (84). Schließlich wurde 2014 beschrieben, dass die humanen Caspasen-4 und -5 ähnlich der murinen Caspase-11 mit einer hohen Affinität direkt an LPS binden, was zur Caspase-1-unabhängigen Pyroptose führt (57). Die Caspasen-4, -5 und -11 sind genauso wie die Caspase-1 in der Lage, das pro-pyoptotische Protein Gasdermin zu spalten und damit über die Porenbildung in der Zellmembran die Pyroptose einzuleiten (53).

### **1.3 Die Reaktion der Immunzellen auf gramnegative Bakterien**

Das angeborene Immunsystem initiiert eine Vielzahl an Reaktionsmechanismen zum Schutz des Organismus gegen bakterielle Erreger. Einige dieser Mechanismen, wie die Pyroptose, die Erkennung von PAMPs und die Aktivierung des Inflammasoms, wurden in der Arbeit bereits beschrieben. Gramnegative Bakterien, die in dieser Arbeit am Beispiel von EC erforscht wurden, färben sich mit der Gram-Färbung rot an, da sie im Gegensatz zu grampositiven Bakterien keine dicke Mureinhülle besitzen, sondern nur eine dünne Peptidoglykanschicht sowie eine äußere dünne Lipidmembran (85,86). Wichtige Virulenzfaktoren gramnegativer Bakterien sind Bestandteile dieser Lipidmembran LPS, welche in den letzten Jahrzehnten intensiv erforscht wurden (87). Die Erkennung von LPS durch TLR4 wurde im vorletzten Kapitel beschrieben. Die

Reaktion von Immunzellen auf lebende EC ist außerhalb der gastrointestinalen Mukosa zwar lebensnotwendig, eine überschießende Antwort kann jedoch zur Sepsis und sogar zum Tod des Organismus führen (88).

### **1.3.1 *Escherichia coli***

EC ist einer der bekanntesten Vertreter der Familie der Enterobakterien. Dieses Bakterium ist gramnegativ, fakultativ anaerob und kommt im menschlichen und tierischen Darm vor. Obwohl die meisten Stämme von EC nicht pathogen sind, gibt es doch gefährliche Serotypen, die Krankheiten auslösen können. Zu den darmpathogenen EC zählen sechs verschiedene Serotypen, die weltweit 160 Millionen Durchfallerkrankungen und 1 Million Todesfälle verursachen, wobei vor allem die Kinder unter fünf Jahren in Entwicklungsländern betroffen sind (89). Diese Serotypen sind enteropathogene EC (EPEC), enterotoxische EC (ETEC), enteroinvasive EC (EIEC), enterohämorrhagische EC (EHEC), enteroaggregative EC (EAEC) und diffus-haftende EC (DAEC) (90). Außer den darmpathogenen gibt es uropathogene und neonatale Meningitis auslösende EC, die häufig über eine Bakteriämie zu einer Sepsis führen (91). EC sind mit 44,7% die häufigsten Sepsis-auslösende Bakterien, gefolgt von *Staphylococcus aureus* mit 26,8% (92).

Die pathogenen EC benutzen verschiedene Virulenzmechanismen, um den Wirt zu befallen. Dazu zählt die Adhäsion an Zellen, die alle Stämme außer EIEC mittels langer Fimbrien (Pilli) bewerkstelligen. Die Erkennung von Bakterien durch die Wirtszellen erfolgt durch spezifische Rezeptoren, die mit Bakterienbestandteilen (z.B. LPS) interagieren. Dafür wird ein Komplex zwischen LPS und LPS-Bindungsproteinen (LBP) gebildet. LBP ist ein Plasmaprotein, welches zu akute-Phase-Proteinen gezählt wird. Die LPS/LBP-Komplexe werden vom TLR4-assoziierten cluster of differentiation (CD)14-Protein erkannt. CD-14 ist ein Membranprotein, welches von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Die Signalübertragung in der Zelle findet MyD88-abhängig oder -unabhängig statt, was bereits beschrieben wurde (93). Es kommt zur Aktivierung der weiteren phagozytierenden Zellen, die in der Lage sind, Bakterien intrazellulär aufzunehmen und zu bekämpfen.

### 1.3.2 Lebende und tote EC: RNA als vita-PAMP

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass Lebendimpfstoffe eine stärkere Immunreaktion des Organismus hervorrufen als Totimpfungen (94). Man vermutete lange, dass diese Tatsache auf die Virulenzfaktoren lebender Organismen und ihre Replikationsfähigkeit zurückzuführen ist. Jedoch hinterlassen oft auch abgeschwächte Erreger, die keine Virulenzfaktoren besitzen, eine robuste Immunität. Viele uns bekannten PAMPs wie LPS und DNA sind in lebenden wie in toten Bakterien präsent. Sander und Kollegen identifizierten 2011 jedoch ein sogenanntes vita-PAMP, welches nur in lebenden Bakterien zu finden ist (95). Es handelte sich um die bakterielle mRNA in lebenden EC, die vom Immunsystem direkt erkannt und zu einer stärkeren Immunantwort führte. Für die Studie wurde v.a. der apathogene EC K12 Stamm DH5 $\alpha$  benutzt mit einer natürlich vorkommenden Thymidin-Auxotrophie (thyA<sup>-</sup>). Diesen Bakterien fehlen Virulenz- und Replikationsfaktoren, die pathogene Stämme besitzen. Damit lassen sich die Analysen auf das Merkmal „Lebendigkeit“ fokussieren. Anstatt der Effekte spezifischer Virulenzfaktoren zu untersuchen kann man die Immunantwort gegen lebende EC direkt mit der Antwort auf tote EC vergleichen. Dafür wurde der gleiche EC-Stamm hitzeabgetötet (heat killed EC, HK EC). Es wurde gezeigt, dass nur lebende und nicht hitzeinaktivierte EC zum Zelltod und zur Produktion von IL-1 $\beta$  und IFN- $\beta$  führten, während die Produktion der meisten übrigen inflammatorischen Zytokine durch lebende und tote Bakterien gleich stark induziert wurde. Die Zugabe von EC-RNA (isoliert aus lebenden Bakterien) zu HK EC führte zur vollständigen Rekonstitution der IL-1 $\beta$ -Produktion und zur Pyroptose. Es stellte sich heraus, dass die mRNA potenter war als andere RNA-Arten, diese Immunantwort in murinen Makrophagen zu induzieren. Die Immunantwort war abhängig vom TLR-Adaptorprotein TRIF, Caspase-1 und dem NLRP3-Inflammasom. In einer früheren Studie wurde die Aktivierung der Caspase-1 durch bakterielle RNA ebenso beschrieben (96).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Anlehnung an die zuvor beschriebene Studie (95) der apathogene EC K12 Stamm DH5 $\alpha$  benutzt mit der natürlich vorkommenden Thymidin-Auxotrophie (thyA<sup>-</sup>), und die Immunantwort auf lebende oder hitzeinaktivierte Bakterien in menschlichen Phagozyten untersucht.

### 1.3.3 Sepsis und septischer Schock

Die Sepsis stellt eine lebensbedrohliche Systemerkrankung dar, die auf eine Infektion zurückzuführen ist und durch eine Dysregulation des Immunsystems entsteht. Die Definition von Sepsis ist 2016 überarbeitet worden und bedarf keiner Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)-Kriterien mehr (97). In der neuen Definition spielt die Organdysfunktion (z.B. Nierenversagen) als Folge der Infektion die entscheidende Rolle. Für die Kriterien der Organdysfunktion wird der Sepsis-related organ failure assessment (SOFA) Score verwendet, welcher die Lungen-, Nieren-, Leber- und Kreislauffunktion erfasst sowie die Thrombozytenzahl und als Hinweis auf ZNS-Schädigungen die Glasgow Coma Scale. Demnach wird eine Sepsis bei Anstieg des SOFA-Scores auf  $\geq 2$  Punkte definiert. Daneben existiert auch der vereinfachte SOFA-Score, der klinisch schneller zu erfassen ist. In diesem sogenannten quick-SOFA (qSOFA)-Score wird jeweils ein Punkt für Folgendes vergeben: Atemfrequenz  $\geq 22$ /Minute, Systolischer Blutdruck  $< 100$ mmHG und Vigilanzminderung. Bei Zutreffen von mindestens zwei Kriterien ist die septische Organdysfunktion wahrscheinlich. Die SIRS-Kriterien haben keine Bedeutung für die Definition mehr, können aber die Diagnose der Sepsis unterstützen und finden in der Klinik immer noch breite Verwendung. Diese Kriterien sind: Körpertemperatur  $\geq 38^\circ\text{C}$  oder  $\leq 36^\circ\text{C}$ , Herzfrequenz  $\geq 90$ /Minute, Atemfrequenz  $\geq 20$ /Minute, Leukozytenzahl  $> 12000/\mu\text{l}$  oder  $< 4000/\mu\text{l}$ . Für einen SIRS müssen mindestens zwei Kriterien erfüllt sein (98). Die Letalität der Sepsis lag in Deutschland zwischen 2007 und 2013 bei etwa 25% (99).

Schwere Verläufe der Sepsis führen zum septischen Schock, einer massiven Kreislaufdysregulation, die in der Regel eine intensives Volumenmanagement und eine Katecholamintherapie erfordert. Dabei bleibt laut Definition der mittlere arterielle Druck bei  $< 65$ mmHg trotz adäquater Volumentherapie. Außer der Kreislaufdysregulation umfasst die Definition des septischen Schocks auch die zelluläre Dysfunktion, die durch Serum-Laktat  $> 2$ mmol/L definiert ist. Bei Nachweis eines septischen Schocks beträgt die Krankenhaussterblichkeit  $> 40\%$  (97).

Die Pathophysiologie von Sepsis beruht auf der Aktivierung proinflammatorischer Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  als Reaktion auf PAMPs wie Endotoxine (LPS). Dies führt zur Aktivierung weiterer proinflammatorischen Signalwege wie dem Komplementsystem, weiterer proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-6 und dem migration inhibitory factor

(MIF). Diese proinflammatorischen Faktoren führen zu einer systemischen Reaktion, obwohl der Ursprung der Sepsis meist ein Organ als Fokus hat. Auch antiinflammatorischen Signalwege werden mitaktiviert, jedoch ist bei Sepsis die Balance zwischen der pro- und der antiinflammatorischen Immunreaktion gestört. Es resultiert eine Störung der Endothelzellfunktion sowie der Blutgerinnung. Die Zerstörung von Endothelzellen führt zum Kapillarleck und dem Verlust von Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem, was durch die Ödementstehung im Körper zu sehen ist. Die Aktivierung der Blutgerinnung führt zur disseminierten intravasalen Koagulopathie, die anfangs am Thrombozytenabfall und der Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit gemessen werden kann und später zur Funktionsstörung der Organe (akutes Atemnotsyndrom, akutes Nierenversagen) führt (7).

#### **1.3.4 Die Rolle der Caspase-4 in der Sepsis**

Immunaktivierung durch Bakterien kann Pyroptose und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen auslösen, was bei Dysregulation der Immunreaktion zur Sepsis führen kann (7). Ein Großteil der Sepsisforschung wird in Mäusen gemacht. Das Mausmodell dient dazu, antiinflammatorische Medikamente zu entwickeln, die z.B. bei der rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden (100). Es existieren aber einige entscheidende Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Immunsystem. So sind Nager generell gegenüber Endotoxinen deutlich toleranter als Menschen (101).

Einer der Unterschiede des menschlichen und des murinen Genoms ist, dass Caspase-11 bei Menschen durch die Caspasen-4 und -5 ersetzt ist. Die murine Caspase-11 wurde für die LPS-induzierte Letalität und die Aktivierung der Caspase-1 verantwortlich gemacht (29). Caspase-4 ist eine inflammatorische Caspase, die für die Pyroptose und die Inflammasom-Aktivierung verantwortlich ist (81). Transgene Mäuse, denen durch die genetische Manipulation das menschliche Caspase-4-Gen hinzugefügt wurde, waren gegenüber LPS viel sensitiver als Wildtyp-Mäuse. In ‚bone marrow-derived‘ macrophages (BMMs) wurde außerdem nachgewiesen, dass Caspase-4 die Aktivierung von Caspase-1 unterstützt, ohne das NLRP3-Inflammasom zu aktivieren. Diese Daten weisen darauf hin, dass Caspase-4 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Entstehung der Sepsis im Menschen spielt (102).

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Das angeborene Immunsystem steht an vorderster Front der Abwehr gegen Pathogene wie EC. Die Bestandteile des Erregers werden durch PRRs erkannt, was über die intrazellulären Signalkaskaden zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung der systemischen Immunantwort führt. Eine robuste Immunantwort ist unabdingbar für die effektive Abwehr von Infektion mit Bakterien wie EC. Jedoch kann eine überschießende dysregulierte Immunantwort zur Sepsis und zum Tod führen (91). Aus diesem Grund müssen die Immunreaktionen des angeborenen Immunsystems streng reguliert werden.

Die inflammatorischen Caspasen spielen für die Reaktion auf die gramnegativen Bakterien eine mutmaßlich wichtige Rolle. Caspase-1 ist bislang am besten erforscht, jedoch gibt es Hinweise, dass Caspase-4 für die Entstehung der Sepsis (mit-)verantwortlich ist (102). Diese Caspase fehlt im murinen Genom, was die Erforschung der Sepsis anhand der gängigen Mausmodelle erschwert. Die Rolle von Caspase-4 ist daher im Gegensatz zu Caspase-1 bisher nur unzureichend erforscht worden. Das Ziel dieser Studie ist es, die Funktionen von Caspase-1 und Caspase-4 und anderer inflammatorischer Caspasen bei der Reaktion auf lebende EC zu untersuchen und die Unterschiede zwischen der Immunantwort auf lebende und tote Bakterien zu charakterisieren.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Zellen**

#### **2.1.1 Humane Monozyten**

##### ***2.1.1.1 Die Gewinnung der Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)***

PBMCs wurden mittels Pancoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats von Blutspendern (Leukozytenfilm) isoliert. Zuvor wurde der Buffy Coat 1:1 mit Waschpuffer gemischt. 25ml des verdünnten Buffy Coats wurden auf 20ml Pancoll geschichtet und für 25 Minuten ohne Bremse bei 1000g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde die mittlere Leukozytenschicht vorsichtig entnommen und in ein neues 50ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurden die so gewonnenen PBMCs im 50ml Waschpuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 300g mit Bremse zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zwei Mal wiederholt, das erste Mal bei 200g, das zweite Mal bei 160g. Der Überstand wurde jedes Mal vollständig entfernt.

##### ***2.1.1.2 Die Isolierung der Monozyten aus PBMCs***

CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> klassische Monozyten wurden aus PBMCs mittels immunomagnetischer Negativselektion mit dem EasySep™ Human Monocyte Enrichment KITS (Stemcell Technologies) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Kurzgefasst, wurden PBMCs in einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml im EasySep™-Puffer vorbereitet. Danach wurden den Zellen 50µl/ml des EasySep™-Antikörpergemisches zugesetzt, welches unter anderem Anti-CD16-Antikörper enthielt. Die Antikörperlösung wurde gut mit den Zellen vermischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 50µl/ml der EasySep™-Magnetpartikeln hinzugefügt und für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Schließlich brachte man das Gemisch aus PBMCs, Antikörper und Magnetpartikeln auf 2,5ml Gesamtvolumen mit EasySep™-Puffer und stellte das Gemisch für 2,5 Minuten bei Raumtemperatur in den EasySep™-Magneten. Nach 2,5 Minuten wurden die nicht gebundenen Zellen durch vorsichtiges Dekantieren in ein neues Röhrchen überführt. Die Monozyten wurden anschließend gezählt mittels Neubauer-Zählkammer und auf eine Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Reinheit der Zellen wurde mehrfach kontrolliert und lag in der Regel bei 85-95% CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> Monozyten.



### **2.1.2 Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MoDC)**

Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen (MoDC) wurden aus Monozyten mit Hilfe der Differenzierungsfaktoren IL-4 (50ng/ml, Peprotech) und Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF, 10ng/ml, Peprotech) für 4 Tage im Zellkulturmedium differenziert. Die Monozyten wurden dafür in einer Konzentration von  $75 \times 10^4$  Zellen/well in 24-Mikrotiterplatten ausgesät. Am Tag 1 und Tag 3 nach dem Aussäen wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig gewechselt und frisches Differenzierungsmedium hinzugefügt.

### **2.1.3 THP-1 Zellen**

#### ***2.1.3.1 Caspase-1 defiziente THP-1 Zellen***

Caspase-1 defiziente THP-1 Zellen (stabil mit shRNA transduziert) wurden bei Invivogen erworben und entsprechend der Herstellerangaben kultiviert. Die Zellen wurden in 10ml RPMI-Zellkulturmedium unter Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin in einer T25-Zellkulturflasche zwei Tage kultiviert. Danach wurde den Zellen das Selektionsantibiotikum Hygromycin in einer Konzentration von 200 $\mu$ g/ml zugesetzt und die Zellen für weitere zwei Tage damit belassen. Anschließend wurde die erste Passage in 1ml Aliquots in Einfriermedium (FCS und 10% DMSO) eingefroren.

Nach der Entnahme neuer Passage aus dem Stickstoff, wurden die Zellen zunächst für eine Woche im Zellkulturmedium (+Penicillin/Streptomycin) kultiviert, vor erneuter Selektion wurde Hygromycin für zwei Tage hinzugefügt.

Nach Selektion wurden die Zellen im Zellkulturmedium in Multiwell-Platten ausgesät und für 24 Stunden mit 200nM phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) stimuliert. Am folgenden Tag wurde das Medium vollständig entfernt und durch PMA-freies Zellkulturmedium ersetzt. Die nächsten Mediumwechsel fanden am 3. Tag und 4. Tag statt, wobei am 4. Tag anstatt von 10% Fetales Kälberserum (FKS) 2% FKS benutzt wurde.

#### ***2.1.3.2 Stabile THP-1 Zelllinien***

Es wurden stabile THP-1 Zelllinien etabliert, in denen mittels der lentiviralen Transduktion jeweils shRNA-pools gegen Caspase-4 und das ASC exprimiert wurden.

Außerdem wurde eine separate Kontrollvektor-Zelllinie generiert (pLKO.puro). Das detaillierte Vorgehen ist unter 2.7. aufgeführt.

Die Zellen wurden in Zellkulturmedium unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin kultiviert und in T75-Flaschen mit Selektionsantibiotikum Puromycin in der dafür bestimmten Konzentration von 2,5µg/ml für drei Tage selektioniert. Die Zellen wurden danach in Multiwell-Platten ausgesät und anschließend wurde mit den Zellen genauso verfahren wie mit Caspase-1 defizienten THP-1 Zellen.

## **2.2 Bakterien**

Für die Infektion der Zellen wurde der EC K12 Stamm DH5α benutzt. Natürlich vorkommende Thymidin-auxotrophe Mutanten (thyA<sup>-</sup>) wurden auf Luria-Bertania (LB)-Agarplatten mit 50µg/ml Trimethoprim und 500µg/ml Thymidin selektiert. Auxotrophie wurde durch die Inokulation und die Übernachtskultur einzelner Kolonien im LB-Medium bestätigt, die nur in Anwesenheit von Thymidin wuchsen und gegenüber Trimethoprim resistent waren. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 30% Glycerol aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Vorbereitung der hitzeinaktivierten EC wurden EC thyA<sup>-</sup> über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Schüttelinkubator kultiviert. Die Übernachtskultur wurde mit PBS auf eine optische Dichte bei 600nm (OD<sub>600</sub>) von 0,6 verdünnt und für 90 Minuten bei 60°C im Wasserbad inaktiviert. Dann wurde die Kultur auf Raumtemperatur gekühlt, mit 30% sterilem Glycerol je 10ml aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Zur Vorbereitung der Infektion wurden EC in 5ml LB-Medium (+50µg/ml Trimethoprim und 500µg/ml Thymidin) über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Schüttelinkubator kultiviert. Diese Kultur wurde morgens 1:10 in LB-Medium verdünnt und die Konzentration der Bakterien wurde mittels der OD<sub>600</sub> gemessen. Dann wurden EC in 20ml LB-Medium und den erforderlichen Antibiotika auf OD<sub>600</sub>=0,1 verdünnt. Die Bakterien wurden für etwa 1,5-2 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> im Schüttelinkubator kultiviert, bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,65 bis 0,85. Aus der Kultur wurden 15ml entnommen und zwei Mal in Phosphatpuffer (PBS) bei 4600 RPM für 6 Minuten zentrifugiert, um die Reste der Antibiotika und des LB-Mediums zu entfernen. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert, 1:10 in PBS verdünnt und die optische Dichte (OD<sub>600</sub>) wurde gemessen.

Die erforderlichen Verdünnungen der Bakterien wurden vorbereitet. Dabei wurde die folgende Formel benutzt:  $OD_{600}1 = 5 \times 10^8 \text{EC/ml}$ .

Die Einstellung der Konzentration der HK EC erfolgte genauso wie bei den lebenden Bakterien.

### **2.3 Infektion der Zellen mit Bakterien**

Die hier durchgeführte Infektion der Zellen mit EC wurde wie früher beschrieben durchgeführt (95). Die isolierten Monozyten wurden zu  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ( $=10^6/\text{ml}$ ) in 96-well-Platte in Antibiotika- und Thymidin-freien Zellkulturmedium ausgesät und nach 2 Stunden infiziert.

MoDC wurden zu  $7,5 \times 10^5$  Zellen/Well in einer Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml im Zellkulturmedium + Differenzierungsfaktoren ausgesät. Die Infektion fand am 4. Differenzierungstag statt.

THP-1 Zellen wurden zu  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml im Zellkulturmedium ausgesät und am 4. PMA-Stimulationstag infiziert.

Die Infektion der Monozyten wurde mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 10 (d.h. 1 Zelle:10 Bakterien) der EC und HK EC, die Infektion der dendritischen Zellen und der THP-1 Zellen mit einer MOI 30 der EC und der HK EC durchgeführt.

EC und HK EC wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^9/\text{ml}$  verwendet. Die geforderten MOIs wurden vorbereitet und den Zellen hinzugefügt. Nach der Infektion wurden die Zellen für eine Minute bei 2500 RPM zentrifugiert und für 90 Minuten in den Inkubator gestellt. Nach der Inkubationszeit wurde in alle Bedingungen 1% Penicillin/Streptomycin zugegeben um sämtliche Bakterien abzutöten. Dann wurden die infizierten Zellen für 16 Stunden in den Inkubator gestellt und anschließend die Überstände für ELISA und Zelltod-Messungen sowie die Lysate für Western-Blot gewonnen.

### **2.4 Caspase-Inhibitoren**

Mit Caspase-Inhibitoren wurden die Monozyten vor der Infektion mit EC oder HK EC 30 Minuten lang inkubiert. Die Inhibitoren waren in einer Konzentration von 2mM in DMSO

gelöst und wurden 1:1000 den Zellen hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel DMSO allein ebenso 1:1000 verwendet. Nach 30 Minuten Inkubationszeit folgte die oben beschriebene Infektion mit EC oder HK EC.

<b>Beschreibung</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>Firma</b>
Caspase-1 Inhibitor	Z-YVAD-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-2 Inhibitor	Z-VDVAD-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-3 Inhibitor	Z-DEVD-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-4 Inhibitor	Z-LEVD-FMK	MBL International
Caspase-5 Inhibitor	Z-WEHD-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-6 Inhibitor	Z-VEID-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-8 Inhibitor	Z-IETD-FMK	Enzo Life Sciences
Caspase-9 Inhibitor	Z-LEHD-FMK	Enzo Life Sciences

**Tabelle 1: die Liste der verwendeten Caspase-Inhibitoren**

## **2.5 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms**

Für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurden LPS und Nigericin verwendet.

Für die Stimulation der MoDC wurden die Zellen am 4. Differenzierungstag mit 1µg/ml LPS (EC ultrapure (Invivogen)) für 4 Stunden inkubiert und anschließend mit 10µM Nigericin (Sigma) für 1,5 Stunden stimuliert.

Für die Stimulation der THP-1 Zellen wurden die Zellen am 4. PMA-Stimulationstag mit 100ng/ml LPS für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde 10µM Nigericin für 1,5 Stunden zugesetzt.

## **2.6 RNA-Transfektion**

### **2.6.1 Präparation von bakterieller RNA aus EC**

Die Isolation der Gesamt-RNA aus EC fand mit dem E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit (Omega Bio-tek) entsprechend den Herstellerangaben statt. Alle für die RNA-Präparation notwendigen Reagenzien waren im E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit enthalten.

## 2.6.2 Transfektion der THP-1 Zellen mit der Gesamt-RNA aus EC

Für die RNA-Transfektion wurden THP-1 Zellen zu  $1 \times 10^5$  Zellen/Well in 96-Well-Platte in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml im Standardzellkulturmedium ausgesät.

Am 4.PMA-Stimulationstag wurde mithilfe des nicht-liposomalen Transfektionsreagenz Viomer® RED die Gesamt-RNA entsprechend der Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurde die isolierte RNA zu 100µg/ml mit dem mitgelieferten Buffer E gelöst. Für eine Lösung aus Viomer® und RNA wurde Viomer® 1:10 mit der verdünnten RNA vermischt. Diese Lösung wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der RNA-Viomer®-Komplex 1:10 zu den Zellen gegeben wurde. Die Endkonzentration von RNA betrug 10µg/ml.

Die Überstände wurden nach 17 Stunden geerntet und für Zelltod- und ELISA-Messungen verwendet.

## 2.7 Lentivirale Gentransduktion

### 2.7.1 Allgemeines

Die Lentivirale Gentransduktion wurde durchgeführt wie von Satoh und Manel beschrieben (103).

### 2.7.2 Plasmide

Für jede Transduktion wurde jeweils ein shRNA-Vektor (z.B. casp-4-shRNA) und als Hilfsvektor Simianes Immundefizienz-Virus-*Virus-like-particles* (SIV-VLP), welcher das Vpx-Protein kodiert. Das Vpx-Protein führt zum Abbau von SAM domain and HD domain-containing protein 1 (SAMHD1), wodurch die Infektion der Zelle mit dem Virus nicht mehr blockiert wird. Myeloide Zellen, wie die hier verwendeten MoDC oder THP-1 Zellen exprimieren hohe Level am SAMHD1, weshalb die vpx SIV-VLP Hilfspartikel eingesetzt wurden. psPAX2 wurde als *packaging* plasmid (Verpackungsplasmid) verwendet, welches die nötigen viralen Proteine exprimiert. pCMV-VSVG wurde für die Expression des Hüllproteins G des vesikulären Stomatitis Virus benötigt. Als Kontrolle wurde ein Leervektor, der pLKO.1puro, eingesetzt.

### **2.7.3 Plasmidpräparation**

Die shRNA-pLKO.1puro Vektoren und die übrigen Plasmide wurden von Thermo Scientific als EC-Kultur in 2xLB-Lennox und 8% Glycerol und 100µg/ml Carbenicillin geliefert. Die Präparation der Plasmide erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Für alle Hilfspartikeln und den Leervektor pLKO.1puro wurde als Selektionsantibiotikum Ampicillin (100µg/ml) verwendet, für alle anderen Vektoren wurde Carbenicillin zu 100µg/ml eingesetzt. Am nächsten Tag wurden einzelnen Kolonien „gepickt“ und in 3ml LB-Lennox mit 100µg/ml des jeweiligen Selektionsantibiotikums inokkuliert, am Abend des gleichen Tages in ein größeres Volumen von 30ml LB-Lennox mit Carbenicillin oder Ampicillin überführt. Die Übernachtskultur wurde pelletiert und für die Plasmidisolation verwendet.

Für die Plasmidpräparation wurde das PureLink®HiPure Plasmid DNA Purification Kit (ThermoFisher) entsprechend der Herstellerangaben zur Midipräparation verwendet. Die gereinigten Plasmide wurden in etwa 50-100µl TE-Puffer (TE), je nach sichtbarer Menge des Plasmids, resuspendiert. Die Menge der gereinigten DNA wurde mittels Nanodrop bestimmt und anschließend bei -20°C gelagert.

### **2.7.4 HEK293T-Zellen**

Es wurden Lenti-X-293T-Zellen von Clontech Laboratories verwendet und entsprechend dem mitgelieferten Protokoll behandelt. Kurzgefasst, wurden die Zellen gleich nach der Ankunft im Wasserbad erwärmt, in 10ml des warmen HEK-Zell-Mediums übertragen und gut gemischt. Anschließend wurden die Zellen bei 100g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden nun auf die kollagenbeschichtete Zellkulturflasche (T75) übertragen und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 48 Stunden inkubiert bis die Zellen eine hohe Konfluenz zeigten und somit passagiert werden konnten.

Ein Teil der Zellen wurde gleich in der ersten und in der zweiten Passage eingefroren. Die restlichen Zellen wurden weiter passagiert. Für das Ablösen der Zellen aus der Flasche wurde das Medium abgesaugt und 2ml Trypsin für eine T75- und 4ml Trypsin für eine T175-Zellkulturflasche dazugegeben. Die Zellen wurden mit Trypsin für etwa 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert bis sie sich vom Flaschenboden sichtbar lösten. Dann wurden die HEK293T-Zellen im sterilen PBS aufgenommen und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert.

Für die Transfektion wurden nur Zellen verwendet, die nicht älter als Passage 20 waren.

### 2.7.5 Transfektion der HEK293T-Zellen

Nachdem Auftauen wurden die Zellen mindestens zwei Mal gesplittet bis sie eine hohe Konfluenz und die nötige Menge erreicht hatten. Zur Transfektion wurden die Zellen geerntet und in 6-Well-Platten in einer Konzentration  $5,5 \times 10^5$  Zellen/ml in 2ml ausgesät. Am gleichen Tag nach ca. 8 Stunden wurden die HEK293T-Zellen mit lentiviralen Vektoren transfiziert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt.

Die Transfektion und die Transduktion der HEK-Zellen wurde wie von Satoh und Manel beschrieben (103) durchgeführt. Es wurden folgende Plasmid-Konzentrationen verwendet:

Vektorname	Plasmid	Menge ( $\mu\text{g}$ )
Lentiviraler Vektor für das Zielgen oder Kontrollvektor (pLKO.1puro)	pLKO.1puro oder Zielgen	1,6
	psPAX2	1
	pCMV-VSVG	0,4
Hilfspartikel SIV-VLP	pSIV3+	2,6
	pCMV-VSVG	0,4

**Tabelle 2: eingesetzte DNA-Mengen für Transfektion (pro Well), modifiziert nach (103)**

Es wurde eine Lösung aus 200 $\mu\text{l}$  DMEM und 8 $\mu\text{l}$  Transfektionsreagenz TransIT-293 vorbereitet. Die Lösung wurde gut gemischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, das benötigte DNA-Volumen hinzugefügt und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise gleichmäßig auf HEK293T-Zellen verteilt und die Zellen dann für 18 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 18 Stunden wurde das gesamte Medium entfernt und durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.7.6 Lentivirale Transduktion von MoDC

Der Überstand der HEK293T-Zellen, der die fertigen lentiviralen Partikel enthielt, wurde geerntet und die Zelltrümmer mit Hilfe eines 0,45µm Spritzenfilters entfernt.

Die Zielzellen (MoDC) wurden aus primären Monozyten differenziert (siehe 2.1.2). Für die Differenzierung und die anschließende Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurden die Zellen in 24-Well-Platten in einer Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen/ml zu  $7,5 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesät. Es wurden auf 750µl Zellmedium 375µl des lentiviralen Überstandes und 375µl des SIV-VLP Überstands übertragen. Dazu wurden 1,5µl von einer 1000-fach konzentrierten Protamin-Lösung hinzugegeben. Protamin beschleunigt die Bindung der Viren an die Zellen, indem es negative Ladungen der Zell- und der Virusmembran neutralisierte. Die hinzugegebenen Vektoren wurden vorsichtig gemischt und für 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Parallel wurden die Monozyten mit GM-CSF und IL-4 zu MoDC differenziert (siehe 2.1.2).

### 2.7.7 Testung der shRNA-Vektoren

Um den Vektor zu finden, mit dem man einen starken Knock-Down des Zielgens erreicht, wurden als Erstes alle vorhandenen lentiviralen shRNA-Vektoren (meistens 3-4 pro Gen) in MoDC einzeln getestet. Der Effekt des Knock-Downs wurde überprüft, indem die Zellen mit EC MOI 30 infiziert wurden. Die Prüfung des Knock-Down-Effekts fand mit Western Blot und ELISA statt. Die shRNA-Vektoren mit dem stärksten Knock-down wurden für die eigentlichen Versuche weiterverwendet.

In MoDC wurden die zwei besten lentiviralen shRNA Vektoren für Caspase-4 einzeln eingesetzt. Für die Etablierung der stabilen THP-1 Zellen wurde der Caspase-4 Klon mit der Identifikationsnummer TRCN0000003512 (GE Dharmacon Inc) genutzt. Für die Herstellung der stabilen shRNA-ASC THP-1-Zellen wurden drei der besten ASC shRNA Vektoren gepoolt eingesetzt.

Zielgen der sh-RNA	Klon-ID	Herkunft
pSIV3+	Plasmid #35979	Geschenk von Nicolas Manel



psPAX2	Plasmid #12260	Addgene
pCMV-VSVG	Plasmid #8454	Addgene
pLKO.puro	Plasmid #8453	Addgene

**Tabelle 3: die Liste der Plasmide, die bei allen Versuchen eingesetzt wurden (Hilfspartikel und Kontrollvektor)**

<b>Zielgen der sh-RNA</b>	<b>Klon-ID</b>	<b>Herkunft</b>
Caspase-1	TRCN0000003503	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-1	TRCN0000003504	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-1	TRCN0000010796	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-1	TRCN0000118459	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-1	TRCN0000118460	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003510	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003511	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003512	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003513	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003514	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059073	GE Healthcare Dharmacon Inc.

ASC (PYCARD)	TRCN0000059074	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059075	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059076	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059077	GE Healthcare Dharmacon Inc.

**Tabelle 4: Liste aller getesteten lentiviralen shRNA-Vektoren.**

<b>Zielgen der sh-RNA</b>	<b>Klon-ID</b>	<b>Herkunft</b>
Caspase-4	TRCN0000003510	GE Healthcare Dharmacon Inc.
Caspase-4	TRCN0000003512	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059073	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059075	GE Healthcare Dharmacon Inc.
ASC (PYCARD)	TRCN0000059076	GE Healthcare Dharmacon Inc.

**Tabelle 5: die Liste der für die Versuche eingesetzten lentiviralen shRNA-Vektoren**

## **2.7.8 Etablierung stabiler THP-1 Zelllinien mittels lentiviralen shRNA-Transduktion**

### **2.7.8.1 Puromycin Kill Curve**

Die hier eingesetzten lentiviralen Vektoren kodieren eine Puromycinresistenz. Für die Selektion stabil transduzierter Zellen mittels Puromycin wurde zunächst die niedrigste Puromycin-Konzentration ermittelt, bei der die THP-1-Wildtyp (WT)-Zellen sterben, aber die transduzierten Zellen überleben.

THP-1 Zellen wurden in 12-Well-Platten in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml je 1ml ausgesät. Puromycin wurde jeweils zu 0µg/ml; 0,5µg/ml; 1µg/ml; 2,5µg/ml; 5µg/ml und 10µg/ml (jeweils in Duplikaten) hinzugefügt. Es wurden für 4 Tage tägliche Zelltodmessungen durchgeführt. Dafür wurden jeden Tag jeweils 10µl aus jedem Well entnommen, 1:1 mit Trypanblau gemischt und der Anteil an toten Zellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es wurde die Konzentration an Puromycin gewählt, bei der am 3. Tag 100% der THP-1-WT-Zellen tot waren, die transduzierten Zellen jedoch >90% vital waren. Dies traf für eine Konzentration von 2,5µg/ml Puromycin zu.

#### **2.7.7.2 Transduktion der THP-1 Zellen mit lentiviralen Vektoren**

Es wurden die Vektoren für Caspase-4, ASC und als Kontrolle Leervektor (pLKO.puro) eingesetzt, die dafür frisch in den HEK-Zellen produziert wurden

THP-1 Zellen wurden für die Transduktion in 6-Well-Platten in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 1ml Zellkulturmedium in Triplikaten ausgesät. Am gleichen Tag wurden 500µl des lentiviralen Vektors (Zielgen oder Kontrollvektor) und 500µl des Hilfspartikels SIV-VLP zugegeben. Dazu fügte man 2µl der 1000fach konzentrierten Protamin-Lösung hinzu. Diese Lösung wurde in den Wells vorsichtig gemischt und die Platten bei 32°C und 800 RCF für 45 Minuten zentrifugiert. Danach inkubierte man die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

24 Stunden nach der Transduktion wurde der Inhalt der jeweiligen drei Wells in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 1200 RPM für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 10ml Zellkulturmedium resuspendiert und für zwei Tage in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Nach 2 Tagen wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen und nach weiteren zwei Tagen in T175-Zellkulturflaschen überführt. Nun wurden die Zellen mit dem Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Konzentration 2,5 µg/ml für drei Tage selektiert. Danach konnten die Zellen eingefroren und der Knock-Down-Effekt überprüft werden.

## **2.8 ELISA**

Die Konzentrationen der Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α wurden aus Zellüberständen mithilfe von kommerziellen ELISA-Kits entsprechend der Herstellerangaben gemessen.

Es wurden hierfür Kits ELISA Ready-Set-Go!<sup>®</sup> von eBioscience für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  benutzt.

## **2.9 Zelltod-Messung**

### **2.9.1 Messung der Laktatdehydrogenase-Freisetzung**

In humanen Monozyten wurde der Zelltod nach einer Infektion mit EC und mit HK EC anhand der Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung gemessen. LDH ist ein Enzym, welches bei der Lyse der Zelle in den Extrazellularraum freigesetzt wird. Monozyten wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml jeweils zu 100 $\mu$ l in 96-Well-Platten ausgesät und für 16 Stunden mit EC oder HK EC infiziert.

Die LDH-Messung wurde mittels eines kommerziellen Kits von Abcam entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Für die Positivkontrolle wurde die mitgelieferte Zelllyse-Lösung in einer Konzentration von 10% des Volumens auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Formel für die Berechnung des Zelltodes lautete: LDH-Freisetzung im Verhältnis zu Maximum =  $(OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Kontrolle}}) / (OD_{\text{Maximum}} - OD_{\text{Kontrolle}}) \times 100$ .

### **2.9.2 Messung der Adenylat-Kinase-Freisetzung**

Für MoDC und THP-1 Zellen wurde der Zelltod mittels der Adenylat-Kinase (AK)-Freisetzung gemessen. Die AK ist ein Enzym, welches nach der Zerstörung der Zellmembran freigesetzt wird. Die Zellen wurden in oben beschriebenen Konzentrationen jeweils für Infektion und Stimulation ausgesät.

Die AK-Freisetzung wurde mittels des ToxiLight<sup>™</sup> bioassay kit von Lonza entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Für die Positivkontrolle (maximaler Zelltod) wurde Triton X-100 in einer Konzentration von 1:100 den Zellen hinzugefügt und die Zellen für 30 Minuten damit inkubiert bis die Überstände geerntet wurden. Zellüberstände wurden auf Raumtemperatur gebracht und je 20 $\mu$ l in Lumineszenzkompatiblen 96-Well-Platten übertragen. Anschließend fügte man 100 $\mu$ l des mitgelieferten Detektionsreagenz hinzu und inkubierte die Platten 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden Lumineszenzsignale im Mikroplatten-Reader gemessen. Die Ermittlung der jeweiligen Prozentwerte im Verhältnis zum maximalen Zelltod wurde analog zu der Rechnung der LDH-Freisetzung gemacht.

## **2.10 Western Blot**

### **2.10.1 Probenvorbereitung für Western Blot**

#### ***2.10.1.1 Vorbereitung der Lysat-Überstand-Mischungen***

Für die Darstellung der Proteine mittels Western Blots wurden Gemische aus Zelllysaten und Zellüberständen von MoDC und THP-1 Zellen verwendet.

Zellen wurden in oben beschriebenen Konzentrationen für Infektion und Stimulation ausgesät. Für die Gewinnung der Gemische aus Zelllysaten und -Überständen wurden etwa 80µl der Zellüberstände in den Wells belassen und 80µl von Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA-Puffer)/Well mit Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche) auf die Zellen gegeben und durch gründliches Resuspendieren lysiert. Zu der vorbereiteten Lösung (Zelllysate+Zellüberstände+RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren) wurde anschließend 5x-konzentrierter Lämmli-Puffer zugefügt. Anschließend wurden die Proben bei 95°C im Heizschüttler für 5 Minuten denaturiert, bei 10000 RCF zentrifugiert und der Überstand bei -80°C gelagert.

#### ***2.10.1.2 Präzipitation von Zellüberständen mittels Methanol-Chloroform-Fällung***

Für den Nachweis von IL-1β wurde der Zellüberstand der THP-1 Zellen verwendet und durch Methanol-Chloroform-Fällung nach dem Protokoll von Jakobs *et al.* „Immunoblotting for active caspase 1“ (104) präzipitiert. Dafür wurden THP-1 Zellen zu 5 x 10<sup>6</sup>Zellen/Well je 1 x 10<sup>6</sup>/ml in 24-Well-Platten ausgesät und anschließend stimuliert oder infiziert.

Zu 300µl des gewonnenen Überstandes wurden 300µl Methanol und 75µl Chloroform dazugegeben. Danach wurden die Proben für 30 Sekunden am Vortexmischer geschüttelt und anschließend für 5 Minuten bei 13000 RCF zentrifugiert. Die obere wässrige Schicht wurde entfernt und 300µl Methanol zu jeder Probe hinzugefügt, am Vortexmischer gehalten bis die Proteinschicht ausflockte. Daraufhin wurden die Proben erneut bei 13000 RCF für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet für 5 Minuten bei 55°C getrocknet. Das Pellet wurde in 40µl RIPA-Puffer+Protease-Inhibitoren+5x Lämmli-Puffer resuspendiert und gevortext. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 Minuten im Hitzeschüttler denaturiert und bei -80°C gelagert.

### 2.10.2 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE-Gelelektrophorese wurde im BioRad-Mini-Gel-System nach der von Lämmli beschriebenen Methode durchgeführt (105). Man bereitete zuerst den Trenn- und den Sammelgel vor. Als Trenngel wurde für die Darstellung der aktiven Caspase-1, ASC und IL-1 $\beta$  ein 13%-Acrylamidgel und für die Caspase-4, IL-1 $\beta$  und die Proform der Caspase-1 ein 10%-Acrylamidgel verwendet.

<b>Substanz</b>	<b>Trenngel 10%</b>	<b>Trenngel 13%</b>	<b>Sammelgel</b>
Destilliertes Wasser	4,85ml	4ml	3ml
Trenngel- /Sammelgelpuffer	2,5ml	2,5ml	1,25ml
SDS 10%	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Acrylamid 40%	2,5ml	3,25ml	665 $\mu$ l
Ammoniumperoxodisulfat 10%	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	25 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l

**Tabelle 6: die Vorbereitung von 2 Trenngelen und 2 Sammelgelen**

### 2.10.3 Immunoblot

Die Gele wurden vorsichtig aus den Kammern abgelöst und nach dem Semi-Dry-Verfahren (1 Stunde, 50V) auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

Die Membran wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Odyssey-Blockpuffer inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit PBS+0,1% Tween für jeweils 5-10 Minuten.

Anschließend wurde der primäre Antikörper (in Odyssey-Blockpuffer gelöst) auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran wieder drei Mal, wie oben beschrieben, gewaschen

und nach dem Waschen der Fluoreszenz-markierte sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben. Die Membran wurde mit dem sekundären Antikörper im Dunkeln auf dem Schüttler eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran zwei Mal mit PBS+0,1% Tween und das letzte Mal nur mit PBS gewaschen.

Für die Visualisierung der Fluoreszenzsignale wurde der LICOR-Scanner von Odyssey verwendet.

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Caspase-1, human	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling	1:1000
Anti-Caspase-1(p20), human	Maus, monoklonal	AdipoGen	1:1000
Anti-Caspase-4, human	Maus, monoklonal	MBL	1:1000
Anti-ASC, human	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz	1:200
Anti-IL-1 $\beta$ (D3U3E), human	Kaninchen, monoklonal	Cell Signaling	1:1000
Anti-Aktin	Ziege, polyklonal	Santa Cruz	1:1000

**Tabelle 7: die Liste der verwendeten primären Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Maus-IgG, Cy 5.5 gekoppelt	Ziege, polyklonal	Rockland	1:5000
Anti-Kaninchen-IgG, IRDye 800 gekoppelt	Ziege, polyklonal	Rockland	1:7500

Anti-Ziege-IgG, IRDye 800 gekoppelt	Esel, polyklonal	Rockland	1:2000
Anti-Ziege-IgG, IRDye 700 gekoppelt	Esel, polyklonal	Rockland	1:2000

**Tabelle 8: die Liste der verwendeten sekundären Antikörper**

## 2.11 Statistik

Die Auswertung der Versuche (ELISA und LDH-Assay) fand mit Graph Pad Prism 5.04 statt. Für den Vergleich von 2 Gruppen wurde der Mann Whitney Test benutzt, für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde der ANOVA Test verwendet. Für die Auswertung des einzelnen Versuches in Duplikaten (Abb. 8 und Abb. 15) wurde Unpaired T-Test benutzt.

## 2.12 Medien

Blotpuffer (10-fach konzentriert)	15g Tris-Base 72g Glycin 500ml destilliertes Wasser
EasySep-Puffer	PBS 2% FKS 1mM EDTA
Einfriermedium	FKS 10% DMSO
HEK-Zell-Medium	DMEM 10% FKS
Lämmli-puffer (5-fach konzentriert) für 10ml	3,2ml 1M TRIS-HCL (pH-Wert 6,8) 3,5ml Glycerin 2,5ml 2-Mercaptoethanol



	<p>1,5g SDS</p> <p>100mg Bromphenolblau</p>
Laufpuffer (5-fach konzentriert)	<p>15g TRIS-Base</p> <p>72g Glycin</p> <p>5g SDS</p> <p>1000ml destilliertes Wasser</p>
LB-Medium	<p>10g Bacto™-Trypton</p> <p>5g Bacto™-Yeast-Extract</p> <p>10g NaCl</p> <p>1000ml destilliertes Wasser</p> <p>(+15g Bacto™ Agar für Festmedium)</p>
LB-Medium (Lennox)	<p>10g Bacto™-Trypton</p> <p>5g Bacto™-Yeast-Extract</p> <p>5g NaCl</p> <p>1000ml destilliertes Wasser</p>
RIPA-Puffer	<p>50mM Tris-HCL (pH-Wert 7,4)</p> <p>NaCl 150mM</p> <p>SDS 0,1%</p> <p>Desoxycholsäure 0,5%</p> <p>NP-40 1%</p>
Sammelgelpuffer	<p>0,5M Tris-HCL (pH-Wert 6,8)</p> <p>destilliertes Wasser</p>
Strippingpuffer	<p>1M Tris-HCL (pH-Wert 6,7)</p> <p>2g SDS</p>

	704,2µl β-Mercaptoethanol destilliertes Wasser
Trenngelpuffer	1,5M Tris-HCL (pH-Wert 8,8) destilliertes Wasser
Waschpuffer	RPMI 1640 5% FKS (hitzeinaktiviert, gefiltert) 0,2mM EDTA
Zellkulturmedium (Monozyten, MoDC, THP-1 Zellen)	RPMI 1640 10% FKS (hitzeinaktiviert, gefiltert) 1% L-Glutamin 1% HEPES 1% NEAA

**Tabelle 9: Medien**

### 2.13 Chemikalien und Substanzen

Bezeichnung	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Acrylamide/Bis Solution 40%	Serva
Ammoniumperoxodisulfat	Serva
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Aqua ad iniectabilia	Braun
Bacto™ Agar	BD Biosciences
Bacto™ Trypton	BD Biosciences

Bacto™-Yeast Extrakt	BD Biosciences
Bromphenolblau	Amersham Pharmacia Biotech
Carbenicillin	Thermo-Scientific
Chloroform	Merck Millipore
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Desoxycholsäure	Sigma-Aldrich
DMEM	Gibco
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
<i>Escherichia coli</i> K12, strain DH5α	Life Technologies
FKS	Sigma-Aldrich
Glycerol	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck Millipore
HEPES Buffer (1M)	Sigma-Aldrich
Hygromycin B Gold	Invivogen
Humanes rekombiniertes GM-CSF	BioLegend®
Humanes rekombiniertes IL-4	BioLegend®
Isopropanol	Sigma-Aldrich
Kaleidoskope™ Precision Plus Protein™	Bio-Rad
L-Glutamin	Life-Technologies

Lenti-X293-T-Zellen	Clontech Laboratories Inc
LPS-EK von EC K12	Invivogen
LPS-EB ultrapure	Invivogen
Methanol	Roth
NaCl	Roth
Nigericin	Invivogen
Non essential amino acids	Sigma-Aldrich
NP-40	Fluka Chemie GmbH
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR Biosciences GmbH
Pancoll	PAN-Biotech GmbH
PBS	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
PMA	Sigma-Aldrich
Protamin sulfate salt from salmon	Sigma-Aldrich
Puromycin dihydrochloride	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	Gibco
SDS	Serva
TEMED	Serva
THP-1-WT-Zellen	Geschenk von Veit Hornung
THP-1-defCasp-Zellen	Invivogen
Thymidin	Sigma-Aldrich

TransIT®-293 Transfection Reagent	Mirus Bio® LLC
Trimethoprim	Sigma-Aldrich
TRIS-Base	Sigma-Aldrich
TRIS-HCL	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypan Blue	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
Viromer® RED	Lipocalyx

**Tabelle 10: Chemikalien und Substanzen**

### 2.14 Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
EasySep™ Human Monocyte Enrichment Kit	STEMCELL Technologies Inc
E.Z.N.A.™ Bacterial RNA Kit	Omega bio-tek Inc
Human IL-1 beta ELISA Ready-Set-Go!®	eBioscience
Human IL-6 ELISA Ready-Set-Go!®	eBioscience
Human TNF alpha ELISA Ready-Set-Go!®	eBioscience
LDH-Cytotoxicity Assay Kit II	abcam
PureLink®HiPure Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
ToxiLight™ Non-destructive	Lonza

Cytotoxicity BioAssay Kit	
---------------------------	--

**Tabelle 11: Kits**

### 2.15 Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugsystem VACUSAFE comfort	Integra Biosciences GmbH
Bio-Photometer	Eppendorf
FilterMax F5 Multi-Mode-Microplate-Reader	Molecular Devices
Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad
HERAcell® 240i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific
Inverses Lichtmikroskop IMT-2	Olympus
Kreisschüttler 3011	GFL
Magnetrührer REO	IKA®-Werke GmbH
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf
Multipette® M4	Eppendorf
Nalgene®Einfrierhilfebox Mr.Frosty	Thermo Scientific
NanoDrop 2000	Thermo Scientific
Netzgerät für Gelelektrophorese EPS 601	GE Healthcare
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Superior
Odyssey-Scanner	LI-COR Biosciences GmbH
Pipetboy Easypet® 3	Eppendorf

Pipetten	Eppendorf
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge Ministar	VWR
Ultrazentrifuge Sorvall RC-5C Plus	GMI Inc
Unitwist 400	Uniequip
Vortexmischer VV3	VWR
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

**Tabelle 12: Geräte**

## 2.16 Verbrauchsmaterial

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Amersham Protran 0,45µm Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare
Corning®3995 96-Well-Platten, clear flat bottom (Lumineszenz-Messung)	Corning
Falcon®-Tubes 15ml, 50ml	Falcon
Filterpapier	Whatman
ELISA-96-Well-Platten Maxisorp Nunc™	Thermo Scientific
Kryoröhrchen 1ml	Carl Roth
Küvetten für Photometer	Sarstedt
Nalgene™Rapid-Flow™ Sterile Disposable Filter	Thermo Scientific
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt

Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt
Serologische (sterile) Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Falcon
Spritzenvorsatzfilter Celluloseacetat 0,45µm, steril, ultraschallverschweißt	Kisker Biotech GmbH
Sterile Spritzen (5ml) Injekt®	Braun
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Falcon
Zellkultur-Multi-Well-Platten (12 Well, 24 Well, 48 Well, 96 Well)	Falcon

**Tabelle 13: Verbrauchsmaterial**



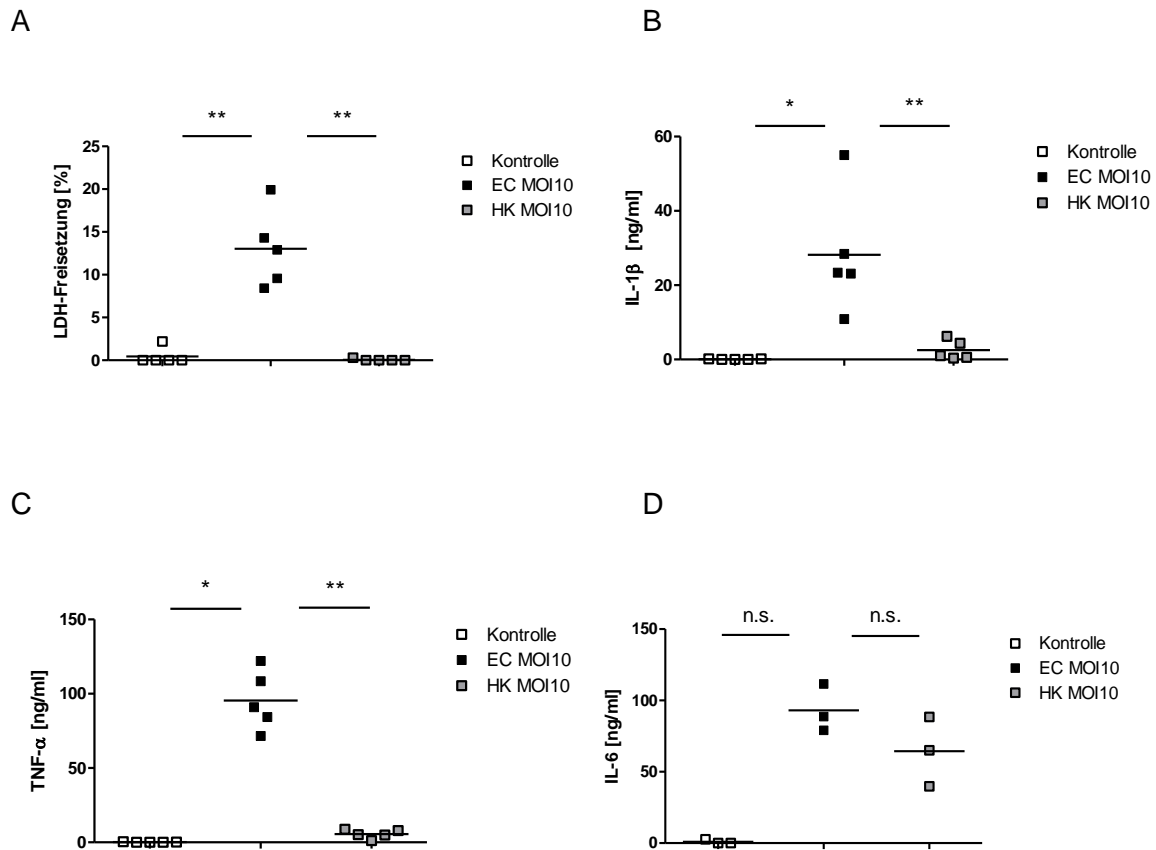
## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Initiierung von Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Produktion durch lebende Bakterien in humanen Monozyten**

Das Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Rolle der proinflammatorischen Caspasen in der Reaktion der Zellen auf lebende und tote Bakterien zu untersuchen. Dafür wurden humane Monozyten mit lebenden und hitzeinaktivierten EC infiziert (MOI 10). Um die Reaktion der Zellen auf die Bakterien zu evaluieren, wurden der Zelltod und die Konzentrationen der inflammatorischen Zytokine bestimmt.

Nur eine Infektion mit EC und nicht mit HK EC führte zu einer moderaten LDH-Freisetzung in Monozyten (Abb. 1 A). Auch die Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  wurde spezifisch durch lebende aber nicht durch hitzeinaktivierte EC induziert (Abb. 1 B, C). Die IL-6-Freisetzung (stellvertretend für viele proinflammatorische Zytokine) unterschied sich bei lebenden und toten Bakterien nicht signifikant (Abb. 1 D).

Die Versuche belegen, dass eine Stimulation von humanen Monozyten mit lebenden aber nicht mit toten EC zu einem moderaten Zelltod (ca. 10-15%) und zu einer robusten Freisetzung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führte. Nach einer Infektion mit HK EC waren Pyroptose und die IL-1 $\beta$ -Produktion gegenüber der Kontrolle nicht erhöht. Lediglich IL-6 wurde nicht nur nach einer Infektion mit lebenden, sondern auch mit toten Bakterien in einer großen Menge produziert.

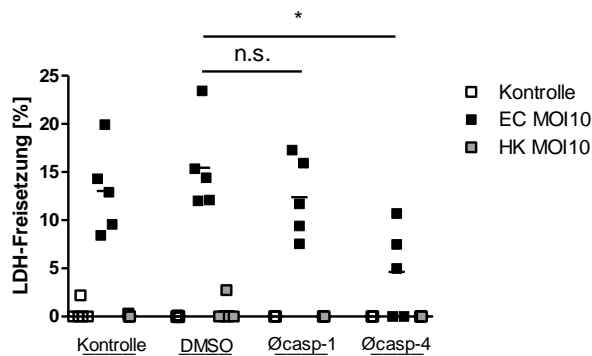


**Abbildung 1: Stimulation von Pyroptose und IL1 $\beta$ -Produktion durch lebende und nicht durch tote Bakterien in humanen Monozyten.** Humane Monozyten wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit lebenden EC oder HK EC (in den Abbildungen vereinfacht HK genannt), bei MOI = 10 für 16 Stunden infiziert. (A) Zelltod gemessen als LDH-Freisetzung. (B) IL-1 $\beta$ , (C) TNF- $\alpha$  und (D) IL-6 wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren 5 (A-C) bzw. 3 (D) unabhängige Einzelversuche, jeweils in biologischen Duplikaten durchgeführt. MOI = Multiplicity of infection, LDH=Laktatdehydrogenase. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ .

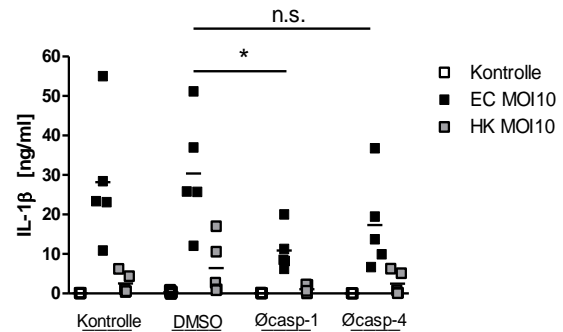
### 3.2 Hemmung von Caspase-1 reduziert IL-1 $\beta$ -Produktion, Hemmung von Caspase-4 reduziert Zelltod

Nachdem gezeigt wurde, dass die humanen Monozyten auf eine Infektion mit lebenden Bakterien mit Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Freisetzung reagieren, wurde die Rolle der inflammatorischen Caspasen untersucht. Vor allem wurden die Funktionen von Caspase-1 und Caspase-4 evaluiert. Dafür wurden humane Monozyten vor der bakteriellen Stimulation mit Caspase-Inhibitoren behandelt.

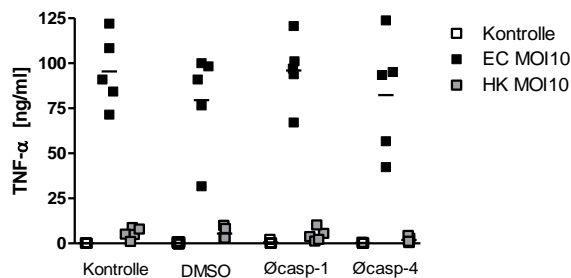
A



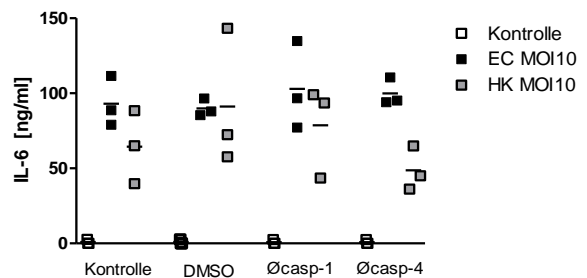
B



C



D



**Abbildung 2: Hemmung von Caspase-1 reduziert IL-1β-Produktion, Hemmung von Caspase-4 reduziert den Zelltod und beeinflusste weniger die IL-1β-Produktion.** Humane Monozyten wurden entweder unbehandelt gelassen oder jeweils mit Caspase-1- oder Caspase-4-Inhibitor (2mM in DMSO gelöst) oder DMSO allein für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit EC oder HK EC (MOI = 10) für 16 Stunden stimuliert. (A) Zelltod wurde mittels LDH-Freisetzung gemessen. (B) IL-1β, (C) TNF-α und (D) IL-6 wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren 5 (A-C) oder 3 (D) unabhängige Einzelversuche, jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Casp=Caspase, DMSO=Dimethylsulfoxid. \*=p<0,05.

Nach Stimulation mit EC wurde der Zelltod durch die Inhibition von Caspase-4 signifikant und durch die Inhibition der Caspase-1 nicht signifikant reduziert (Abb. 2 A). Die IL-1β-Produktion wurde vor allem durch die Inhibition der Caspase-1 reduziert, weniger durch die Inhibition von Caspase-4 (Abb. 2 B). Im Gegensatz dazu wurde weder die Freisetzung von TNF-α noch von IL-6 durch die Inhibition der Caspasen vermindert (Abb. 2 C, D), da beide Zytokine Caspase-unabhängig gebildet werden, was die Spezifität der Inhibition belegt.

Zusammenfassend konnte demonstriert werden, dass als Reaktion auf eine Infektion mit lebenden Bakterien in humanen Monozyten vor allem die Caspase-1 und

weniger die Caspase-4 für die IL-1 $\beta$ -Produktion zuständig ist, während der Zelltod vor allem durch Caspase-4 reguliert wird.

### **3.3 Andere Caspasen zeigten keinen Einfluss auf die Regulation von IL-1 $\beta$ und Zelltod**

Parallel zur Evaluation der Rollen von Caspase-1 und -4 wurde auch die Bedeutung anderer Caspasen untersucht. Speziell wurde das Augenmerk auf Caspase-5 gelegt, die zusammen mit Caspase-4 als Ortholog von Caspase-11 der Maus gilt.

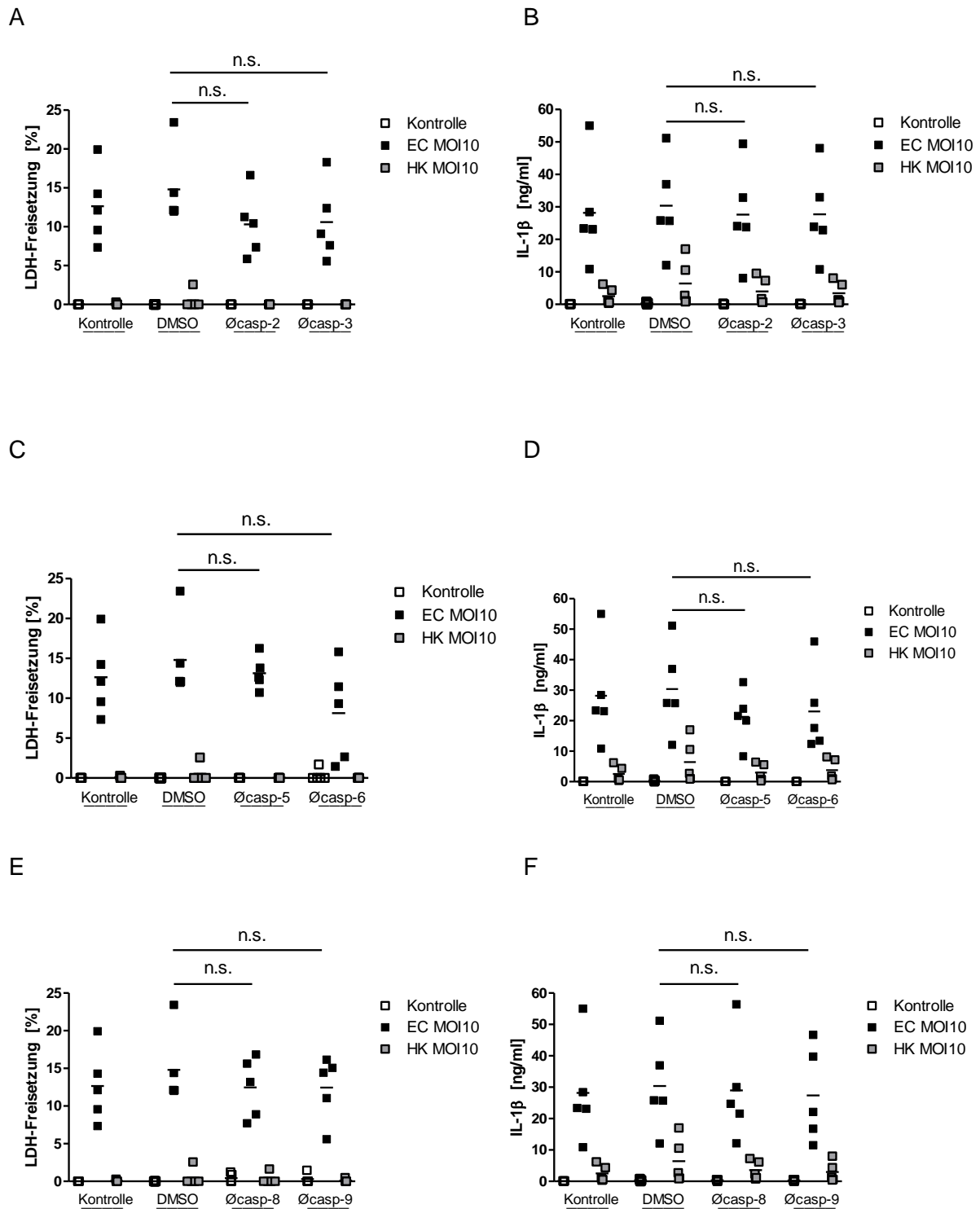
Dafür wurden humane Monozyten vor einer bakteriellen Infektion mit Caspase-Inhibitoren behandelt. Zusätzlich zu einem Caspase-5-Inhibitor, wurden die Inhibitoren von Caspasen-2, -3, -6, -8 und -9 verwendet. Keiner dieser Inhibitoren führte zu einer reduzierten LDH-Freisetzung oder IL-1 $\beta$ -Produktion nach Stimulation mit lebenden EC (Abb. 3 A-F). Es gab ebenso keine Reduktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 nach der Inhibition dieser Caspasen (nicht dargestellt).

Es konnte also gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Caspasen-1 und -4, deren Bedeutung für die IL-1 $\beta$ -Produktion und den Zelltod gezeigt werden konnte, die übrigen hier untersuchten Caspasen, einschließlich Caspase-5, keine Rolle für eine inflammatorische Antwort der Monozyten auf lebende Bakterien zu spielen scheinen.

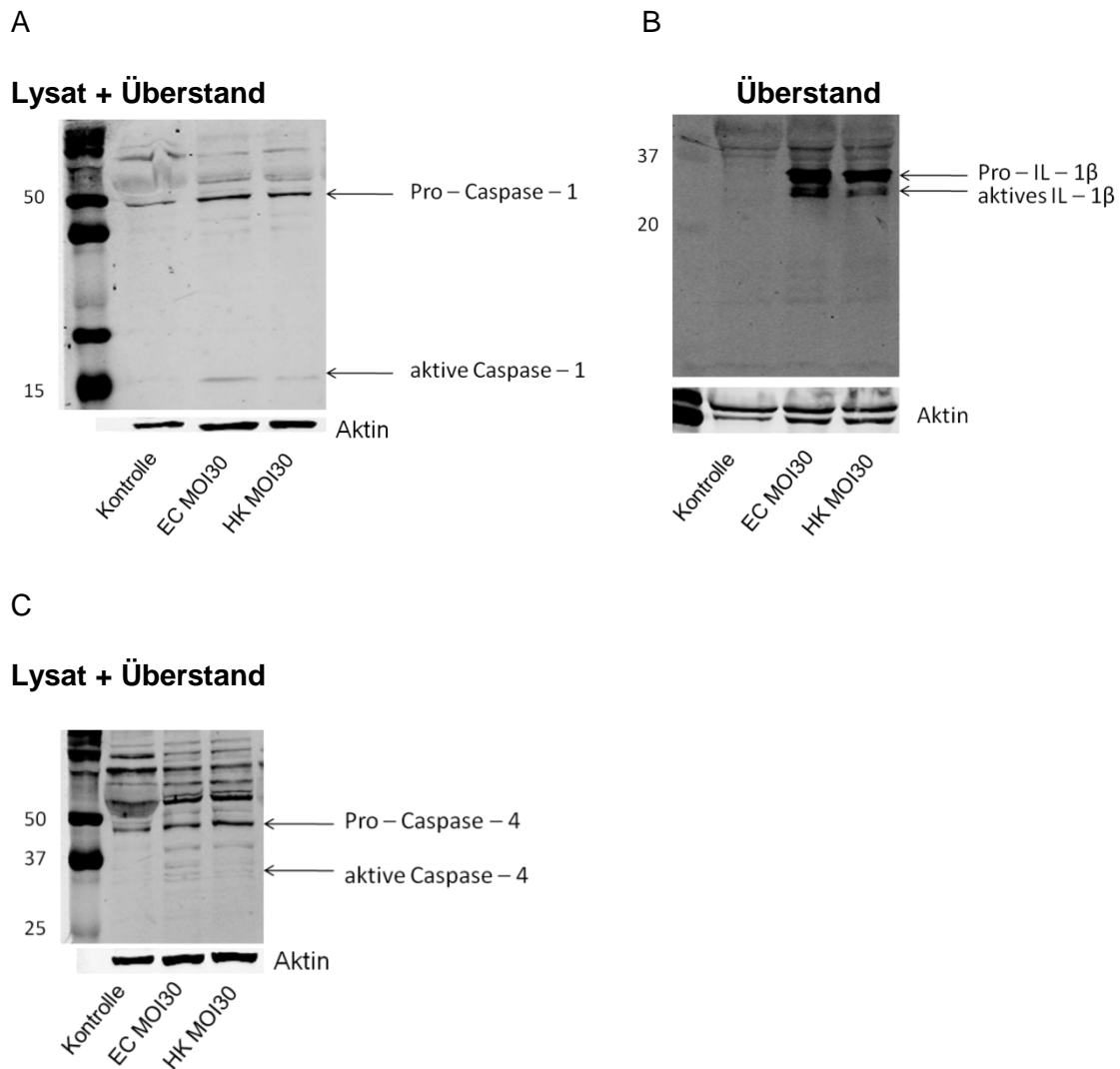
### **3.4 Infektion mit lebenden Bakterien führte zur Aktivierung von Caspase-1 und -4**

Nachdem in humanen Monozyten der Einfluss von Caspase-1 und Caspase-4 auf die IL-1 $\beta$ -Produktion und den Zelltod analysiert wurde, wurde die Rolle von diesen Caspasen in MoDC untersucht, da diese leichter zu manipulieren sind als Monozyten.

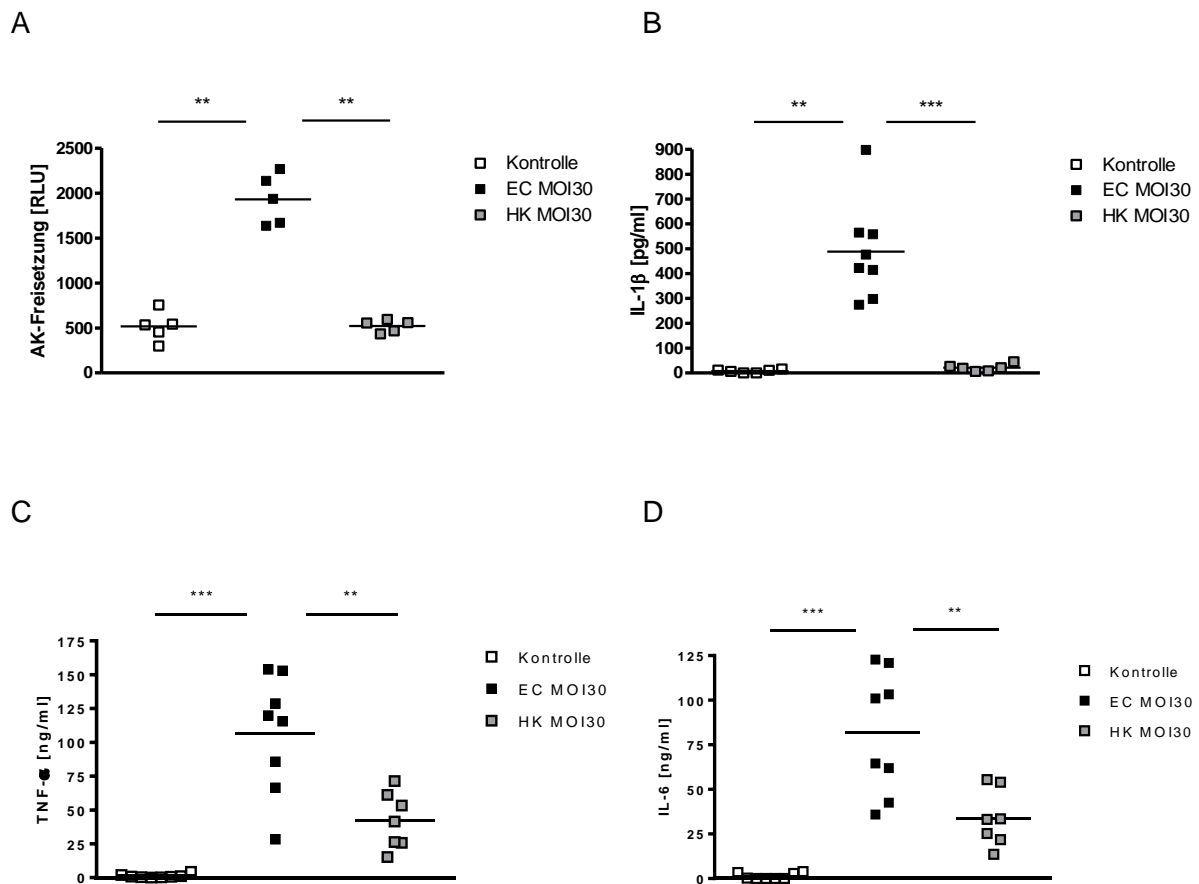
Dafür wurden die MoDC mit lebenden und toten Bakterien mit einer hohen Dosis (MOI 30) stimuliert. Zunächst wurde mittels Western Blots gezeigt, dass nach einer Infektion mit lebenden EC die Caspasen-1 und -4 stärker aktiviert werden als nach einer Infektion mit HK EC (Abb. 4 A, C). Zudem kam es durch lebende Bakterien zu einer stärkeren Freisetzung vom aktiven IL-1 $\beta$  in den Überstand, was man ebenso an einer deutlich stärkeren Bande in dieser Bedingung erkannte (Abb. 4 B).



**Abbildung 3: Inhibition weiterer Caspasen zeigte keinen Einfluss auf IL-1 $\beta$ -Produktion und Zelltod.** Humane Monozyten wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit Caspase-2-, Caspase-3-, Caspase-5-, Caspase-6-, Caspase-8- oder Caspase-9-Inhibitor in DMSO (2 $\mu$ M) für 30 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle diente DMSO (1:1000). Anschließend wurden die Zellen mit EC oder HK (MOI=10) für 16 Stunden stimuliert. (A, C, E) Der Zelltod wurde mittels LDH-Freisetzung gemessen. (B, D, F) IL-1 $\beta$ -Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Die korrespondierenden TNF- $\alpha$  und IL-6-Messungen sind hier nicht dargestellt. Die Daten zeigen 5 unabhängige Einzelversuche, jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Linien repräsentieren den Mittelwert.



**Abbildung 4: In MoDC führte eine Infektion mit lebenden Bakterien zur Aktivierung von Caspase-1 und -4 und zur Freisetzung von IL-1 $\beta$  in den Überstand.** MoDC wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit EC oder HK EC (MOI=30) für 16 Stunden infiziert. (A, B) Der Nachweis von Caspase-1 erfolgte aus Zellysat-Überstand-Mischungen, IL-1 $\beta$  wurde mittels der Methanol-Chloroform-Fällung präzipitierten Überständen nachgewiesen (13%-Acrylamidgelle). Gezeigt sind die Ergebnisse von 5 durchgeführten Western Blots für Caspase-1 und von 3 Western Blots für IL-1 $\beta$ . (C) Caspase-4 wurde in Lysat-Überstand-Mischungen aufgetrennt auf einem 10%-Acrylamidgel nachgewiesen. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot von insgesamt 4 durchgeführten Western Blots. (A-C) Links wurde der Marker aufgetragen und die Ziffern entsprechen der Proteingröße in kDa.



**Abbildung 5: In MoDC führte eine Infektion mit lebenden und nicht mit toten Bakterien zum Zelltod und zur Produktion von IL-1 $\beta$ .** MoDC wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC und HK EC (MOI=30) für 16 Stunden infiziert. (A) Der Zelltod wurde mittels der Adenylatkinase-Freisetzung in relativen Licht Einheiten [RLU] gemessen. (B) IL-1 $\beta$ , (C) TNF- $\alpha$  und (D) IL-6 wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen (A) 5 und (B-D) 8 unabhängige Einzelversuche, jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. AK=Adenylatkinase. \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ ; \*\*\*= $p < 0,001$ .

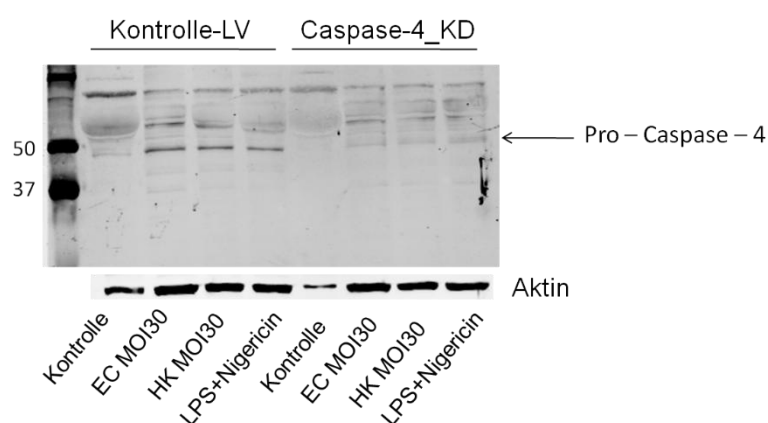
Nur eine Infektion mit lebenden und nicht mit toten EC führte zur Pyroptose der Zellen (Abb. 5 A). Der Zelltod wurde mittels Adenylatkinase-Freisetzung nachgewiesen. Eine stärkere IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach einer Infektion der Zellen mit lebenden Bakterien konnte mittels ELISA-Messungen gezeigt werden (Abb. 5 B), genauso wie eine starke Produktion von TNF- $\alpha$  und von IL-6 (Abb. 5 C, D).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass der Unterschied zwischen einer Infektion mit lebenden und toten Bakterien mit einer Aktivierung der inflammatorischen Caspasen-1 und -4 assoziiert ist. Die Caspasen-1 und -4 wurden durch eine Infektion mit lebenden Bakterien in ihre aktiven Formen gespalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es in MoDC nur nach einer Infektion mit EC und nicht mit HK EC zu einer

hohen Freisetzung von IL-1 $\beta$  in den Überstand und zur moderaten Pyroptose kommt. Nach einer Infektion mit HK EC gab es gegenüber der Kontrolle keinen Unterschied in der Höhe des Zelltodes und der IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Dieser Effekt wurde bereits in humanen Monozyten beobachtet.

### 3.5 Transienter Knock-Down von Caspase-4 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion von IL-1 $\beta$

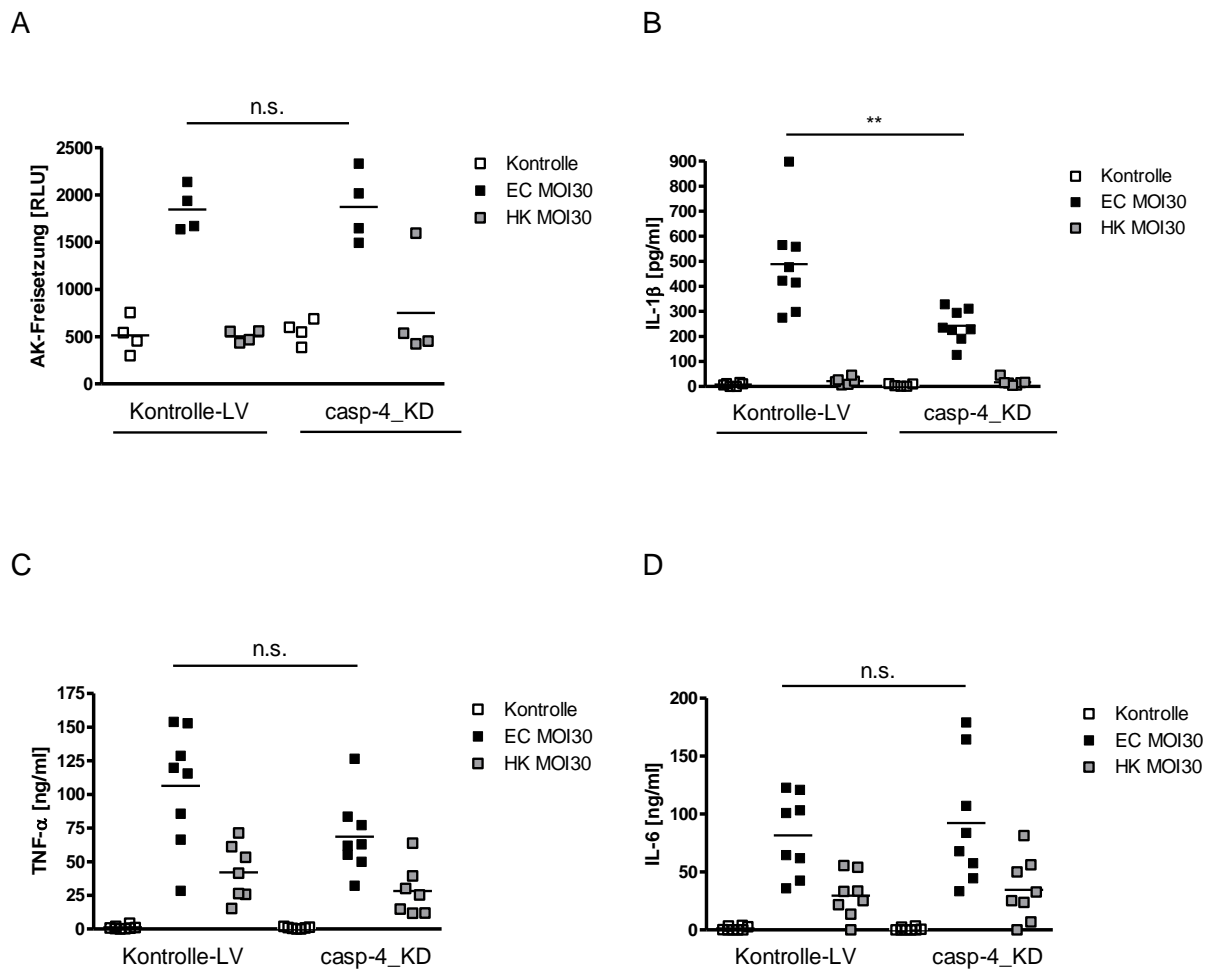
Zum Nachweis einer funktionellen Rolle von Caspase-4 in MoDC wurde die Expression von Caspase-4 mittels der lentiviralen shRNA-Transduktion transient inhibiert. Als Kontrolle wurde ein leerer Kontrollvektor (pLKO1.puro, Kontrolle-LV) transduziert. Anschließend wurden die Zellen mit jeweils EC oder HK EC (MOI30) infiziert. Zunächst wurde die Effizienz des Knock-Downs mittels Western Blot untersucht. Es konnte eine deutlich schwächere Expression von pro-Caspase-4 nachgewiesen werden als in korrespondierenden Kontroll-Zellen (Abb. 6).



**Abbildung 6: KD-Effizienz für Caspase-4 durch die transiente lentivirale shRNA-Transduktion.** MoDC wurden entweder mit Kontroll-LV (pLKO1.puro) oder mit Caspase-4-shRNA transient lentiviral transduziert. Danach wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC oder HK EC (MOI=30) für 16 Stunden infiziert. Als Zusatzbedingung wurden die Zellen mit 1 $\mu$ g/ml LPS EC ultrapure für 4 Stunden inkubiert und anschließend mit 10 $\mu$ M Nigericin für die nächsten 1,5 Stunden stimuliert. Gezeigt ist das Ergebnis von einem repräsentativen Western Blot von insgesamt 6 durchgeführten Western Blots (Zelllysat-Überstand-Mischungen auf 10%-Acrylamidgel). KD=Knock-Down, LV=Lentivirus



Im Gegensatz zu den Inhibitorexperimenten zeigte sich, dass nach einer Infektion mit lebenden Bakterien die Pyroptose durch Caspase-4-KD unbeeinflusst blieb (Abb. 7 A). Es gab jedoch einen signifikanten Unterschied in der IL-1 $\beta$ -Produktion zwischen den Caspase-4-KD und den Kontrollvektor-behandelten Zellen (Abb. 7 B). Die Reduktion von IL-1 $\beta$  nach KD von Caspase-4 war spezifisch, da weder TNF- $\alpha$  noch IL-6 signifikant reduziert wurden (Abb. 7 C, D).



**Abbildung 7: Transienter KD von Caspase-4 in MoDC führte zur spezifischen Reduktion von IL-1 $\beta$  nach einer Infektion mit lebenden Bakterien.** MoDC wurden entweder mit Kontrolle-LV (pLKO1.puro) oder mit Caspase-4-shRNA-LV transient transduziert. Danach wurden die Zellen entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC oder HK EC (MOI = 30) für 16 Stunden stimuliert. (A) Der Zelltod wurde durch die AK-Freisetzung in relativen Licht Einheiten [RLU] gemessen. (B, C, D) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen (A) 4 und (B-D) 8 unabhängige Einzelversuche, jeweils in Duplikaten durchgeführt. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*\*=  $p < 0,01$ .

Aus diesen Ergebnisse ging hervor, dass im Gegensatz zu humanen Monozyten, wo man nach einer Infektion mit lebenden Bakterien einen signifikanten Effekt der Caspase-4 auf den Zelltod und einen nicht signifikanten auf die IL-1 $\beta$ -Freisetzung sah, in MoDC nur die IL-1 $\beta$ -Produktion und nicht der Zelltod durch Caspase-4 beeinflusst wurde.

### **3.6 Stabiler Knock-Down von Caspase-1 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion und nicht des Zelltodes**

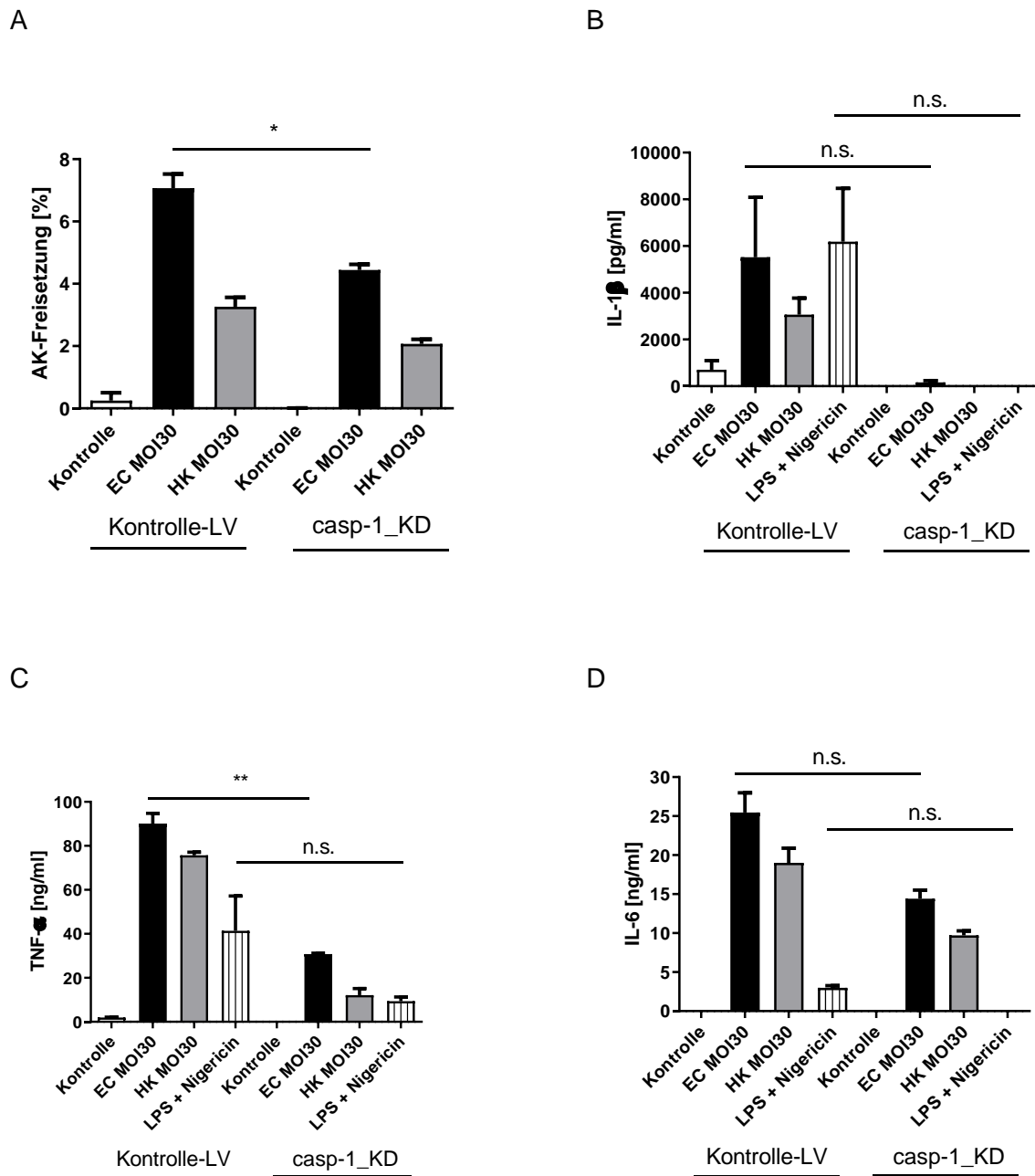
Um den Effekt von Caspase-1 näher zu untersuchen, wurde erneut ein shRNA-vermittelter KD gewählt. Allerdings war der transiente KD in lentiviral transduzierten MoDC schwierig, da sich zwar ein robuster KD etablieren ließ, allerdings zeigten sich ausgeprägte off-target Effekte, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verwendet wurde. Stattdessen wurde eine kommerziell erhältliche stabile Caspase-1-defiziente-THP-1-Zelllinie verwendet (stabile shRNA-Expression) und mit pLKO.puro (Kontrolle-LV) transduzierter stabiler THP-1-Zelllinie verglichen. Die Zellen wurden mit lebenden oder mit hitzeinaktivierten EC (MOI 30) oder mit LPS und Nigericin stimuliert.

Lediglich die Passage 1 der Caspase-1-defizienten Zellen zeigte eine spezifische Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion nach einer Infektion mit lebenden Bakterien (Abb. 8). Spätere Passagen dieser Zellen zeigten ebenfalls ausgeprägte off-target Effekte, da es hier zu einer Reduktion aller inflammatorischen Zytokine kam (TNF- $\alpha$ , IL-6) (Abb. 10).

In der 1. Passage der Caspase-1-defizienten Zellen wurde nach einer Infektion der Zellen mit lebenden und toten Bakterien eine kaum messbare Reduktion der Pyroptose festgestellt (Abb. 8 A). Wobei sich in THP-1 Zellen nach bakterieller Stimulation grundsätzlich ein sehr geringer Zelltod zeigte (5-10%). Im Gegensatz dazu war die IL-1 $\beta$ -Produktion sowohl durch Bakterien als auch durch LPS+Nigericin aufgehoben (Abb. 8 B). Die übrigen inflammatorischen Zytokine wurden durch den Caspase-1-KD jedoch ebenfalls reduziert, was bereits auf off-target Effekte hinweist (Abb. 8 C, D).

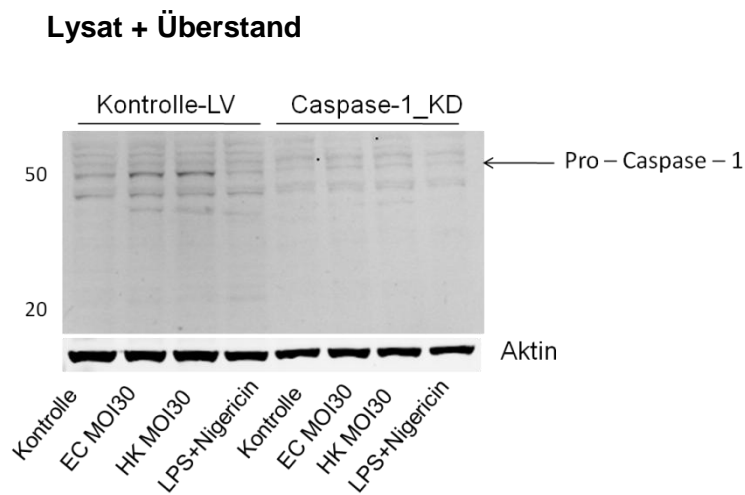
Die Effizienz des KD und die Freisetzung von IL-1 $\beta$  in den Überstand wurde mittels Western Blot untersucht. Pro-Caspase-1 Expression in den Caspase-1 defizienten Zellen war verringert, jedoch nicht vollständig aufgehoben (Abb. 9 A). Außerdem sah man in allen Bedingungen, dass in den stabilen Caspase-1-shRNA

transduzierten Zellen sowohl die Proform als auch die aktive Form von IL-1 $\beta$  vermindert waren, was ebenfalls auf off-target Effekte hinwies (Abb. 9 B).

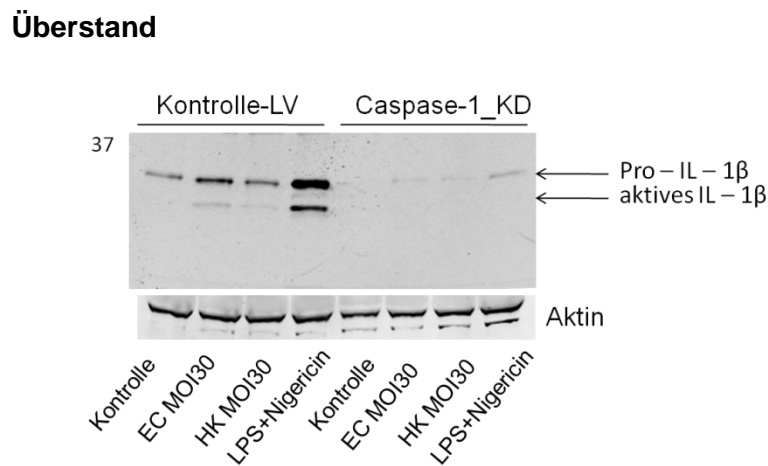


**Abbildung 8: Der stabile KD von Caspase-1 inhibiert IL-1 $\beta$ -Produktion und zeigte fast keinen Einfluss auf den Zelltod nach Infektion mit lebenden und toten Bakterien.** Caspase-1-defiziente THP-1 Zellen sind im Vergleich zu stabilen Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI = 30) oder LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden) und Nigericin (10 $\mu$ M für 30 Minuten) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentration der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse stammen aus einem Versuch (jede Bedingung in Duplikaten), mit Caspase-1-defizienten THP-1 Zellen aus der 1. Passage (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistik: \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ .

A



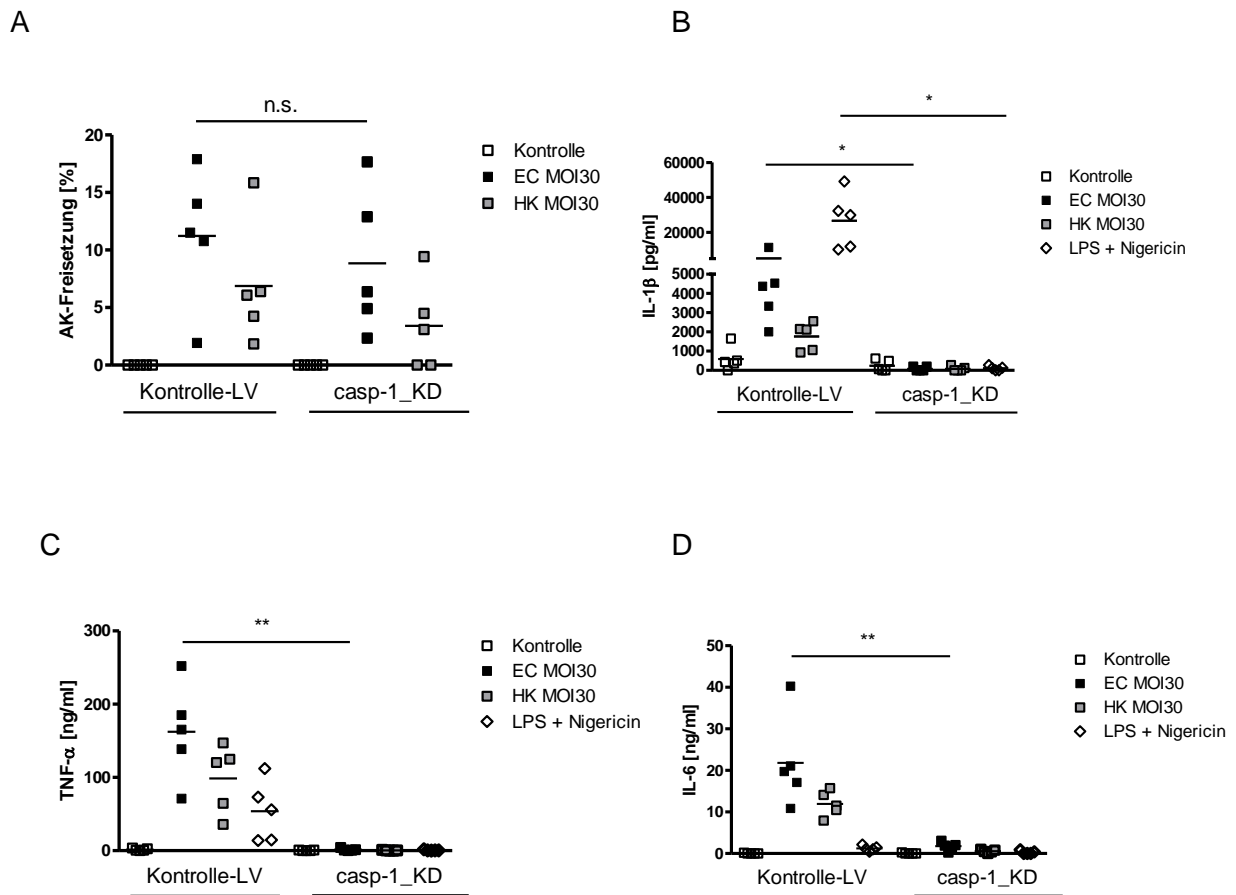
B



**Abbildung 9: Der stabile KD von Caspase-1 führte zur nahezu aufgehobenen IL-1 $\beta$ -Freisetzung.** Caspase-1-shRNA-KD THP-1 Zellen sind im Vergleich zu Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI = 30) und LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden) und Nigericin (10 $\mu$ M für 30 Minuten) stimuliert. (A) Dargestellt ist die Pro-Caspase-1 aus Lysat-Überstand-Mischungen und (B) IL-1 $\beta$  aus konzentrierten Überständen (10%-Acrylamidgele). (A, B) Beide Membranen stammen aus einem Versuch und repräsentieren das Ergebnis von jeweils 3 durchgeführten Western Blots. Links wurde der Marker aufgetragen und die Ziffern entsprechen der Proteingröße in kDa.

In späteren Passagen der Caspase-1-shRNA THP-1-Zellen (ab Passage 2) wurde, verglichen mit Kontrollvektor-Zellen, in keiner der Bedingungen eine Reduktion der Pyroptose festgestellt (Abb. 10 A). Es kam aber, ähnlich wie in der Passage 1, zu einer nahezu aufgehobenen Produktion von IL-1 $\beta$ . Dieser Effekt wurde nach einer Infektion mit lebenden und toten Bakterien ebenso wie nach einer Stimulation mit LPS

und Nigericin beobachtet (Abb. 10 B). Die Konzentrationen anderer inflammatorischer Zytokine wurden durch den Caspase-1-KD in allen Bedingungen auch signifikant reduziert, sodass keine Rückschlüsse auf die spezifische Funktion von Caspase-1 in diesem Ansatz möglich erschien (Abb. 10 C, D).



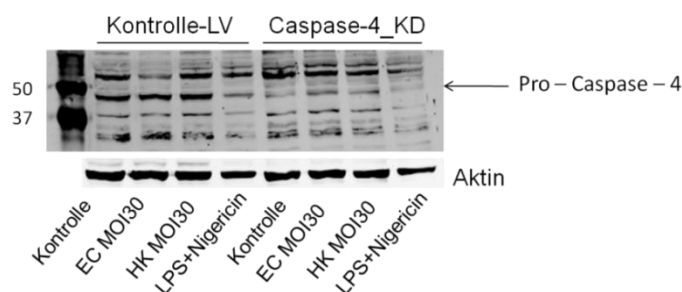
**Abbildung 10: Der stabile KD von Caspase-1 in späteren Passagen zeigte unspezifische Effekte auf alle untersuchten inflammatorischen Zytokinen.** Caspase-1-shRNA-THP-1 Zellen sind im Vergleich zu stabilen Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI=30) und LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden)+Nigericin (10μM für 30 Minuten) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentration der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen 5 unabhängige Versuche, jeweils in Duplikaten, aus späteren Passagen (ab Passage 2) der Caspase-1-shRNA- THP-1 Zellen. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*= $p < 0,05$ ; \*\*= $p < 0,01$ .

Insgesamt deuten die Inhibitor- und die shRNA-Versuche daraufhin, dass Caspase-1 nach einer Infektion der Zellen mit lebenden Bakterien vor allem für die IL-1β-Produktion verantwortlich war. Jedoch ist eine Aussage zur Rolle der Caspase-1 in THP-1 Zellen aufgrund der mangelhaften Spezifität der Caspase-1-defizienten Zellen schwierig zu treffen.

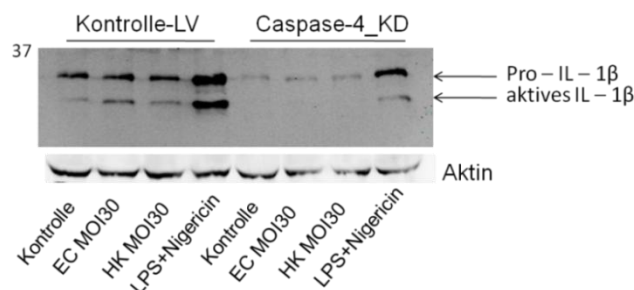
### 3.7 Stabiler Knock-Down von Caspase-4 führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion der inflammatorischen Zytokine und des Zelltodes

Um auch die Funktion von Caspase-4 für die inflammatorische Antwort der Zellen auf Bakterien weiter zu untersuchen, wurden ebenfalls THP-1 Zellen verwendet. Dafür wurden stabil transduzierte Caspase-4-shRNA Zelllinien generiert und mit stabil transduzierten Kontroll-LV THP-1 Zellen verglichen.

#### Lysat + Überstand

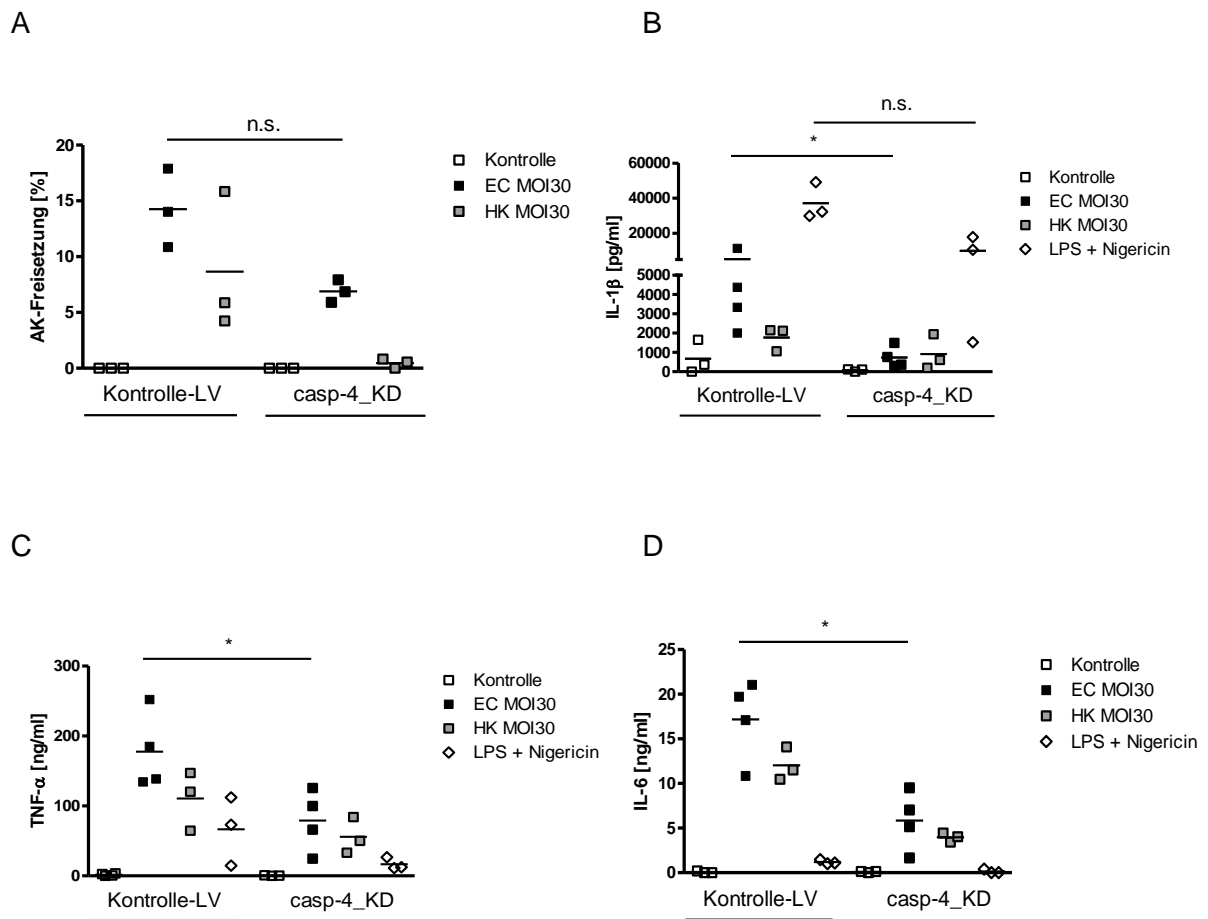


#### Überstand



**Abbildung 11: Stabiler KD von Caspase-4 führte zu einer Reduktion von IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand.**

Dargestellt ist die KD-Effizienz der Pro-Caspase-4 aus Lysat-Überstand-Mischungen und IL-1 $\beta$  aus konzentrierten Überständen in Caspase-4-shRNA-THP-1 Zellen verglichen mit stabilen Kontroll-LV transduzierten Zellen (10%-Acrylamidgele). Beide Membranen stammen aus einem Versuch und repräsentieren das Ergebnis von jeweils 2 durchgeführten Western Blots. Links wurde der Marker aufgetragen und die Ziffern entsprechen der Proteingröße in kDa.



**Abbildung 12: Stabiler KD von Caspase-4 führte zu einer unspezifischen Reduktion inflammatorischer Zytokine und einer nicht signifikanten Reduktion des Zelltodes.** Es sind stabil lentiviral transduzierten Caspase-4-shRNA THP-1 Zellen im Vergleich zu Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI=30) und LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden)+Nigericin (10µM für 30 Minuten) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen (A) 3 oder (B-D) 3 bis 4 unabhängige Versuchen (jeweils in Duplikaten). Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*=p<0,05.

Die Effizienz des Caspase-4-KDs konnte mittels Western Blot gezeigt werden. Im gleichen Versuch wurde eine verminderte Freisetzung von IL-1β in den Überstand beobachtet. Im konzentrierten Überstand sah man eine Reduktion der Proform und der aktiven Form von IL-1β in allen Bedingungen (Abb. 11).

Es wurde ein nicht signifikanter Unterschied in der Reduktion des Zelltodes durch Caspase-4 KD nach einer Infektion mit lebenden Bakterien (Abb. 12 A) festgestellt. Allerdings fiel eine deutliche Reduktion aller hier untersuchten inflammatorischen Zytokine in derselben Bedingung auf, was erneut auf off-target Effekte schließen ließ.

Nach einer Aktivierung des Inflammasoms durch LPS und Nigericin kam es zu einer nicht signifikanten Reduktion von IL-1 $\beta$  (Abb. 12 B-D).

Die hier beobachteten Effekte waren jedoch als unspezifisch zu werten, da auch andere inflammatorische Zytokine durch den KD von Caspase-4 in ihrer Konzentration vermindert waren.

### **3.8 Stabiler Knock-Down von ASC führte nach einer Infektion mit lebenden Bakterien zur Reduktion von IL-1 $\beta$ und nicht des Zelltodes**

Nachdem die Rolle der Caspase-1 und -4 für die inflammatorische Antwort der Zellen auf lebende und tote Bakterien in unterschiedlichen Zelltypen mit eingeschränktem Aussagewert untersucht wurde, wurde die Funktion von ASC näher beleuchtet, ein für die Aktivierung der Caspase-1 zentrales Protein (26).

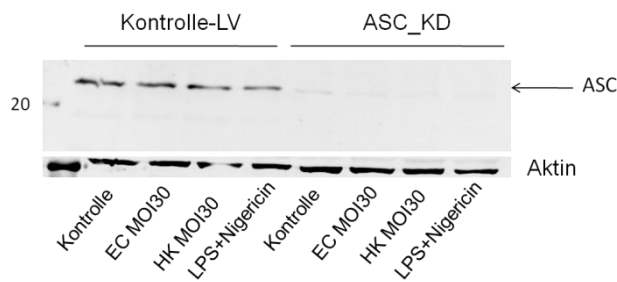
Hierfür wurde eine stabile ASC-KD-Zelllinie generiert. Wie schon für Caspase-4 wurden dafür die THP-1-WT Zellen lentiviral mit ASC-shRNA transduziert und mittels Puromycin selektioniert.

Mittels Western Blot wurde die Effizienz des KD in stabilen ASC-shRNA-Zellen nachgewiesen (Abb. 13 A). Außerdem sah man in ASC-KD-Zellen in allen Bedingungen eine fast aufgehobene IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand verglichen mit Kontroll-Zellen. Man sah in ASC-KD-Zellen eine Reduktion der Proform und der aktiven Form von IL-1 $\beta$  im konzentrierten Überstand. Es war schwierig, die tatsächlich aufgetragene Proteinmenge in einzelnen Bedingungen miteinander zu vergleichen, da die Darstellung von Aktin oder anderer herkömmlicher Standards im konzentrierten Überstand problematisch ist (Abb. 13 B). Es war die gleiche Menge an Pro IL-1 $\beta$  in Lysat-Überstand-Mischungen in den Infektionsbedingungen beider Zellreihen zu sehen (Abb. 13 C).



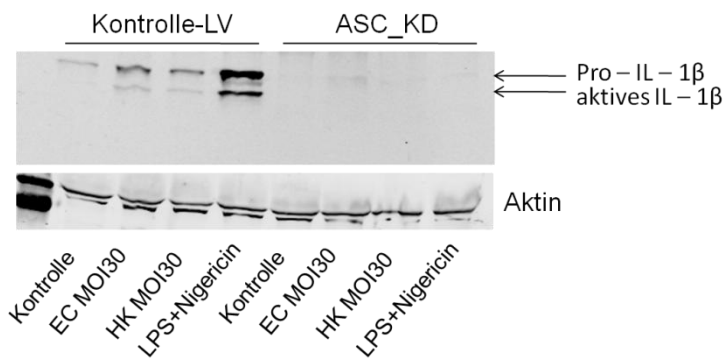
A

### Lysat + Überstand



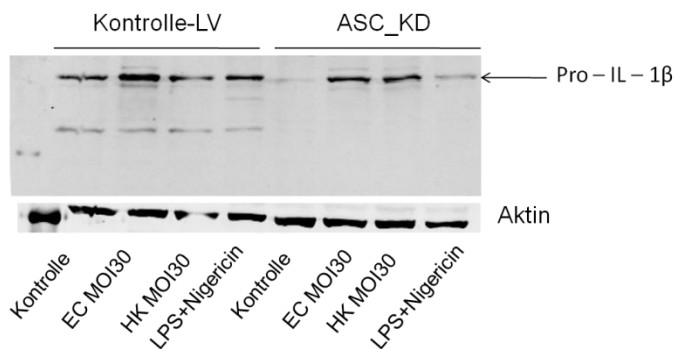
B

### Überstand

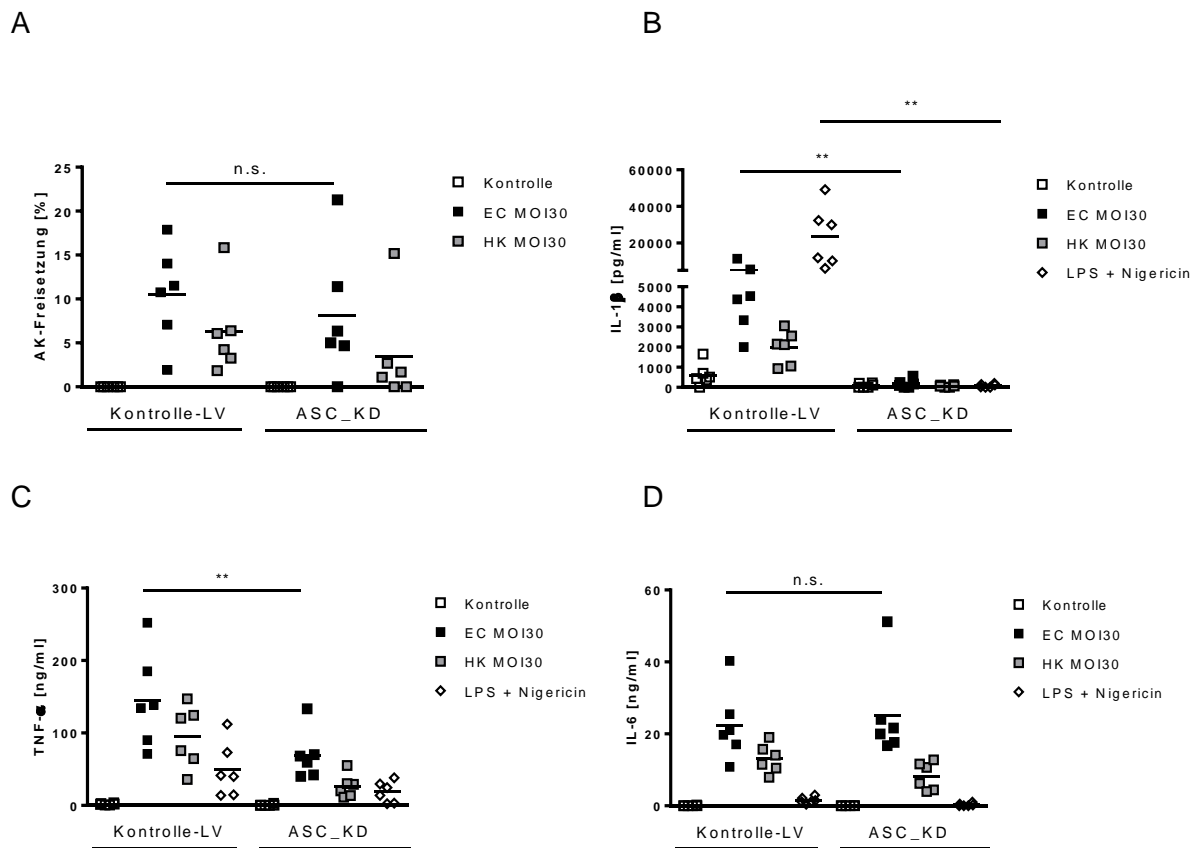


C

### Lysat + Überstand



**Abbildung 13: Stabiler KD von ASC führte zur nahezu aufgehobenen IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand nach einer Infektion der Zellen mit lebenden und toten EC.** Es sind stabile lentiviral transduzierte ASC-shRNA THP-1 Zellen im Vergleich zu Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI = 30) und LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden)+Nigericin (10 $\mu$ M für 30 Minuten) stimuliert. (A, B) Dargestellt ist (A) die Knock-Down-Effizienz von ASC aus Lysat-Überstand-Mischungen, (B) das IL-1 $\beta$  aus konzentrierten Überständen und (C) aus Lysat-Überstand-Mischungen (13%-Acrylamidgele). Links wurde der Marker aufgetragen und die Ziffern entsprechen der Proteingröße in kDa.

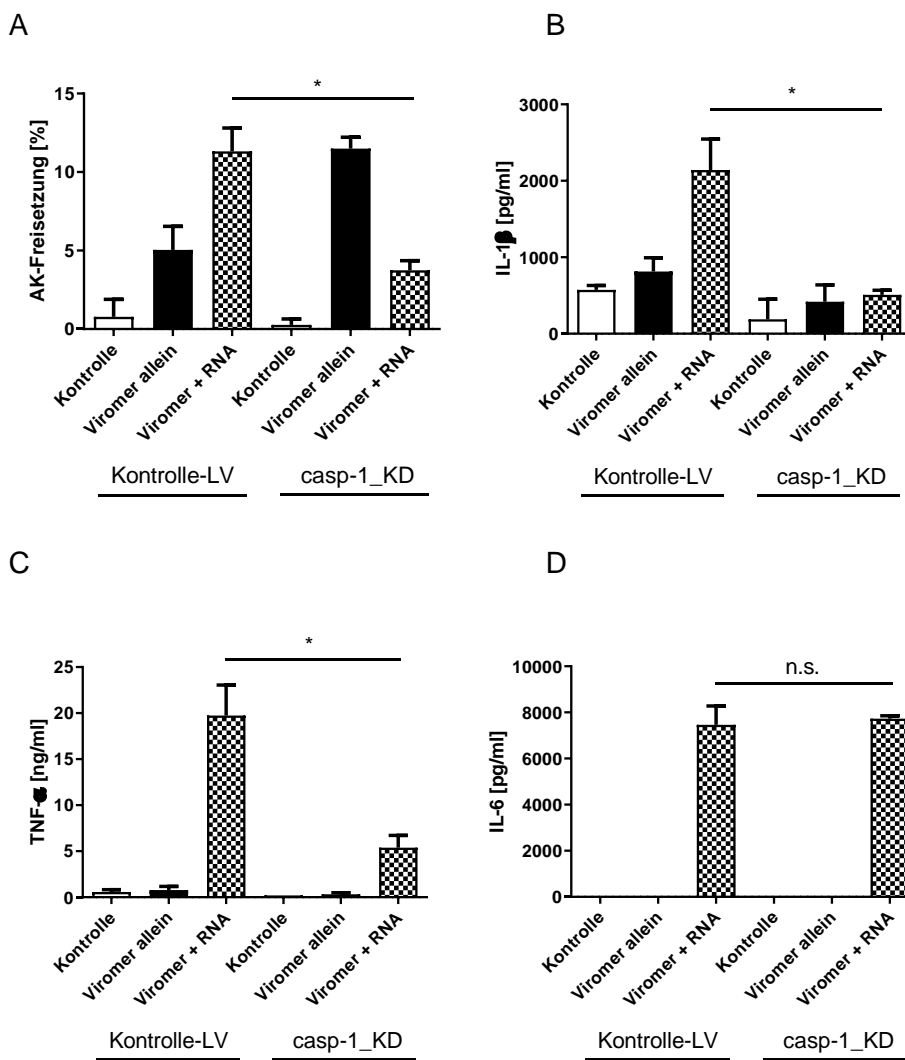


**Abbildung 14: Stabiler KD von ASC führte zur spezifischen Reduktion von IL-1 $\beta$  und nicht zur Reduktion von Zelltod nach einer Infektion mit lebenden Bakterien.** Es sind stabile lentiviral transduzierten ASC-shRNA-THP-1 Zellen im Vergleich zu Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils EC, HK EC (MOI=30) und LPS EC (100ng/ml für 4 Stunden)+Nigericin (10 $\mu$ M für 30 Minuten) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels der AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen 6 unabhängige Versuche (jeweils in Duplikaten durchgeführt). Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*\*= $p < 0,01$ .

Man beobachtete in den ASC-defizienten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen nach einer Infektion mit lebenden und toten Bakterien keine Reduktion des Zelltodes (Abb. 14 A), sehr wohl aber eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Freisetzung nach EC-Infektion (Abb. 14 B). Auch in der Positiv-Kontrolle für die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung (LPS+Nigericin) zeigte sich eine aufgehobene IL-1 $\beta$ -Produktion nach ASC-KD (Abb. 14 B). Wenn auch nicht im selben Umfang, wurde durch die Ausschaltung von ASC eine Reduktion von TNF- $\alpha$  in allen Bedingungen beobachtet (Abb. 14 C), jedoch keine Reduktion von IL-6 (Abb. 14 D).

### 3.9. Die Rolle von Caspase-1 und Caspase-4 bei der Erkennung von EC-RNA

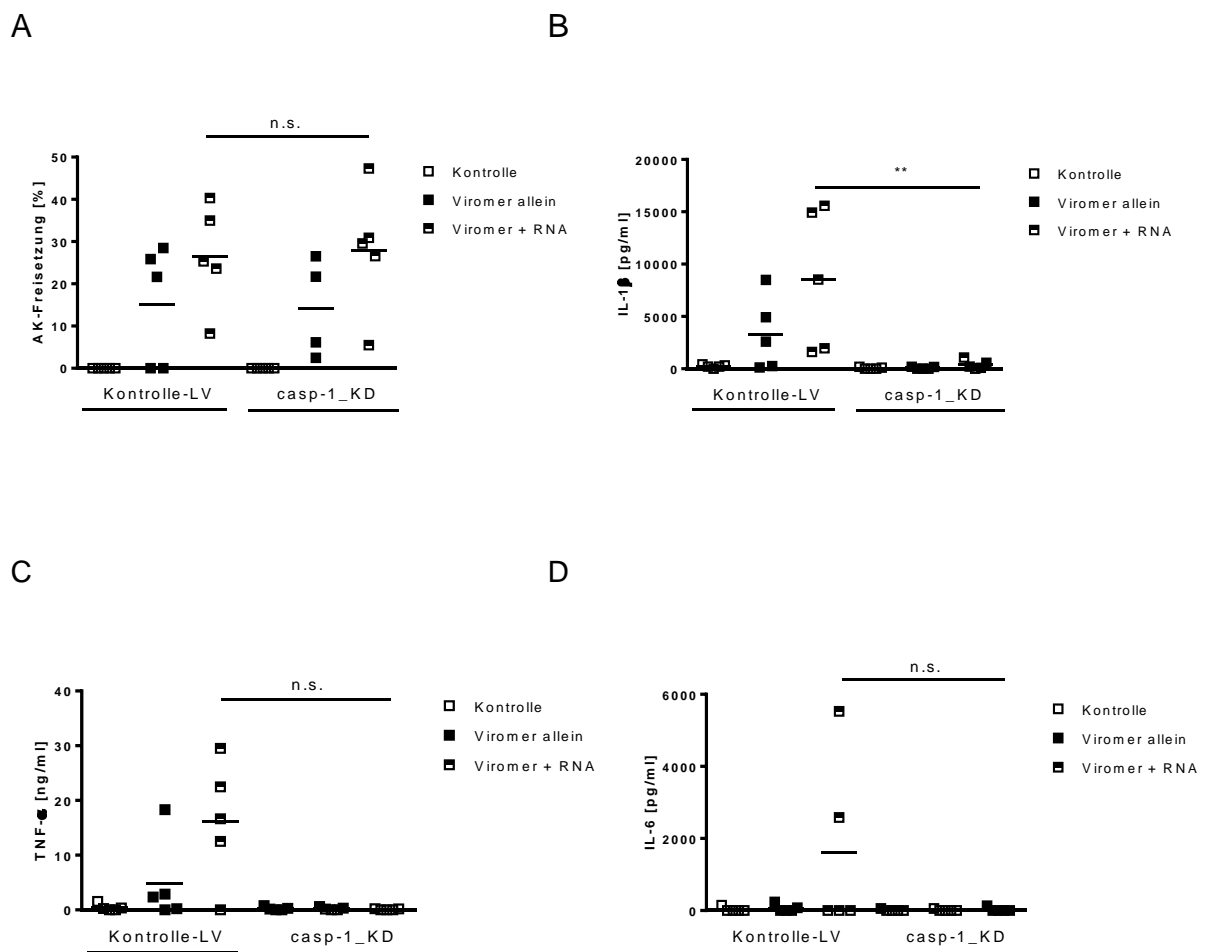
Es wurde nun untersucht, ob die Erkennung von RNA aus lebenden Bakterien die inflammatorischen Caspasen aktivierte und somit zum Zelltod und zur IL-1 $\beta$ -Freisetzung führte. Hierfür wurden die stabilen THP-1 Zelllinien (Caspase-1-, Caspase-4- und als Kontrolle ASC-KD-Zellen) mit der Gesamt-RNA aus lebenden EC mit Hilfe eines nicht-liposomalen Transfektionsreagenz' (Viromer®) transfiziert.



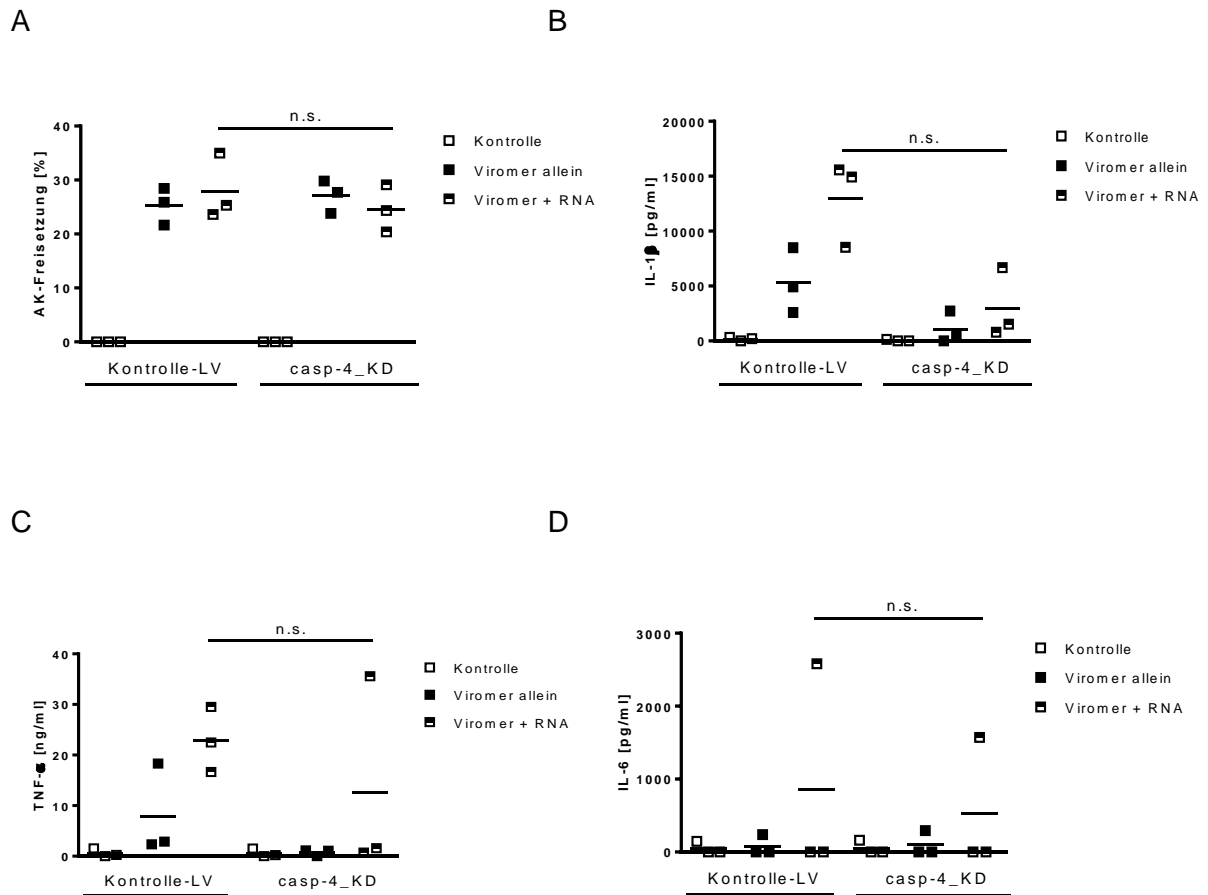
**Abbildung 15: Caspase-1-KD führte in der ersten Passage der stabilen Caspase-1-KD Zelllinie zur Reduktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Reaktion auf EC-RNA.** Caspase-1-defiziente THP-1 Zellen sind im Vergleich zu stabilen lentiviral transduzierten Kontrolle-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils Viromer® allein (1:100) oder mit Viromer® (1:100)-RNA (10 $\mu$ g/ml)-Komplexen stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentration der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse stammen aus einem Versuch (jede Bedingung in Duplikaten), als die Caspase -1-defizienten THP-1 Zellen in der 1. Passage waren (Mittelwert  $\pm$  SEM). Statistik: Statistik: \*= $p < 0,05$ .

In den Caspase-1-KD-Zellen erwies sich lediglich die 1. Passage als spezifisch (siehe Abschnitt 3.6). Somit wurde hier die 1. Passage verwendet. Nach EC-RNA-Transfektion wurde in den Caspase-1 defizienten Zellen nach einer Transfektion von EC-RNA eine Reduktion der IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion gesehen, ohne einer Reduktion von IL-6 (Abb. 15 B-D). Der Zelltod wurde nicht wesentlich beeinflusst.

In späteren Passagen kam es in den Caspase-1-KD-Zellen nach einer RNA-Transfektion zu keiner Reduktion von Zelltod, jedoch zu einer unspezifischen Reduktion von allen hier untersuchten inflammatorischen Zytokinen (Abb. 16 A-D).



**Abbildung 16:** In späteren Passagen der Caspase-1 defizienten THP-1-Zellen kam es zu einer Reduktion aller untersuchten Zytokine in Reaktion auf intrazelluläre EC-RNA. Caspase-1-defiziente THP-1 Zellen sind im Vergleich zu stabilen lentiviral transduzierten Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils Viomerer® allein (1:100) oder mit Viomerer® (1:100) und RNA (10 $\mu$ g/ml) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen 5 unabhängige Versuchen (jeweils in Duplikaten) aus späteren Passagen (>Passage 2) der Caspase-1-defizienten THP-1 Zellen. Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*\*= $p < 0,01$ .



**Abbildung 17: Caspase-4-KD führte nicht zu einer Reduktion des Zelltodes oder der Zytokinsekretion in Reaktion auf EC-RNA.** Es sind stabilen lentiviral transduzierten Caspase-4-KD THP-1 Zellen im Vergleich zu Kontrolle-Vektor-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils Viromer® allein (1:100) oder mir Viromer® (1:100) und RNA (10µg/ml) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen 3 unabhängige Versuche (jeweils in Duplikaten durchgeführt). Die Linien repräsentieren den Mittelwert.

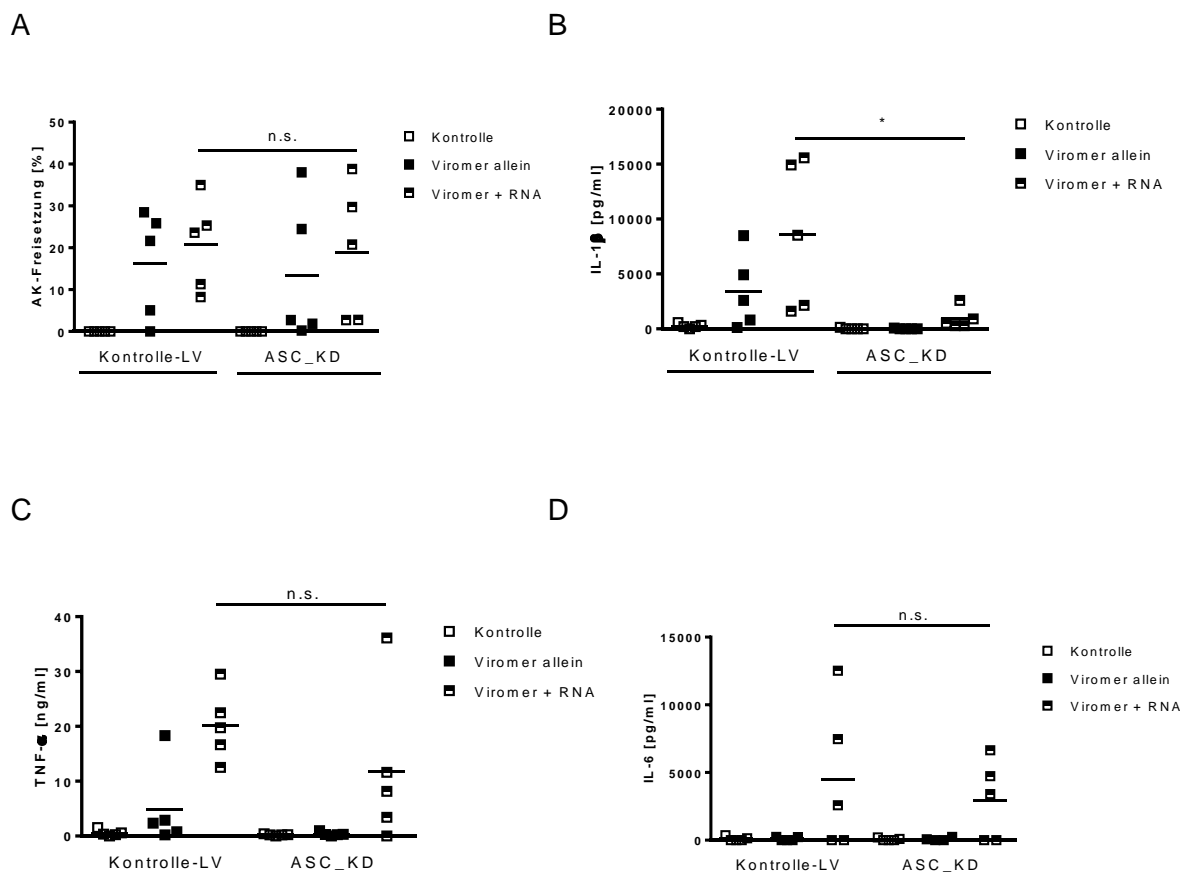
In Caspase-4-KD-Zellen führte die RNA-Transfektion nicht zu einer Reduktion des Zelltodes verglichen mit Kontrolle-Zellen, wobei Viromer® allein schon zu einem hohen Zelltod führte (Abb. 17 A). Es wurde außerdem eine nicht signifikante Reduktion von IL-1β beobachtet (Abb. 17 B) und in einem geringeren Ausmaß auch eine Reduktion von TNF-α und IL-6. Bei den letzteren waren die Abweichungen der einzelnen Werte deutlich zu sehen (Abb. 17 C, D).

Zusammengefasst ließ sich in diesem System eine sichere Aussage zur Rolle der Caspasen-1 und -4 bei der inflammatorischen Antwort der Zellen auf die RNA-Transfektion ebenfalls nicht treffen. Sicher scheint, dass nach einer RNA-Transfektion der ohnehin nur sehr moderate Zelltod durch KD von Caspase-1 und -4 unbeeinflusst

blieb. Was die IL-1 $\beta$ -Produktion betrifft, so wurde zwar durch die Ausschaltung beider Caspasen die Konzentration dieses Zytokins reduziert, jedoch waren auch TNF- $\alpha$  und IL-6 in ihren Konzentrationen vermindert.

### 3.10 Die Immunantwort auf EC-RNA wurde von ASC reguliert

In den ASC-KD-Zellen blieb nach der RNA-Transfektion der Zelltod unbeeinflusst, wobei auch hier das Transfektionsreagenz (Viromer®) allein bereits einen relevanten Zelltod verursachte (Abb. 18 A). In der gleichen Bedingung kam es durch ASC-KD nicht zu einer signifikanten IL-1 $\beta$ -Reduktion (Abb. 18 B). TNF- $\alpha$ -und IL-6-Freisetzungen wurden nicht signifikant reduziert, sodass man von einem spezifischen Effekt von ASC auf die IL-1 $\beta$ -Produktion als Antwort der Zellen auf intrazelluläre EC-RNA ausgehen konnte (Abb. 18 C, D).



**Abbildung 18: Die Immunantwort auf EC-RNA wurde von ASC reguliert.** Es sind stabile lentiviral transduzierten ASC-KD THP-1 Zellen im Vergleich zu Kontroll-LV-THP-1 Zellen (pLKO1.puro) dargestellt. Die Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit jeweils Viromer® allein (1:100) oder mit Viromer® (1:100) und RNA (10 $\mu$ g/ml) stimuliert. (A) Der Zelltod wurde mittels AK-Freisetzung bestimmt, (B-D) die Konzentrationen der Zytokine mittels ELISA. (A-D) Die Ergebnisse zeigen 5 unabhängige Versuchen (jeweils in Duplikaten durchgeführt). Die Linien repräsentieren den Mittelwert. Statistik: \*= $p < 0,05$ .

Zusammengefasst ging aus diesen Ergebnissen hervor, dass das ASC spezifisch die IL-1 $\beta$ -Produktion beeinflusste als Antwort der Zellen auf RNA von lebenden EC, während der Zelltod durch den ASC-KD unbeeinflusst blieb.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von inflammatorischen Caspasen in der Reaktion der humanen Immunzellen auf lebende und tote Bakterien zu untersuchen. Es zeigte sich, dass nur lebende und nicht tote Bakterien moderaten Zelltod und robuste IL-1 $\beta$ -Produktion in humanen Monozyten und dendritischen Zellen induzieren. Außerdem führte die Stimulation mit lebenden Bakterien zu einer Aktivierung der Caspasen-1 und -4, wobei diese Caspasen nach ihrer Aktivierung unterschiedliche Funktionen übernahmen.

Es wurden in dieser Arbeit verschiedene Zelltypen und KD-Varianten getestet, um die Funktionen von Caspasen zu erforschen. In humanen Monozyten war Caspase-4 vorrangig für den Zelltod und Caspase-1 für die IL-1 $\beta$ -Produktion verantwortlich. In THP-1-Zellen konnte für das Inflammasom-Adaptorprotein ASC eine zentrale Funktion in der IL-1 $\beta$ -Produktion, aber nicht für den Zelltod nachgewiesen werden, während die Rolle von Caspase-1 und Caspase-4 nicht abschließend bewertet werden konnte.

Die Intention der Arbeit war es, die Reaktion der Zellen auf lebende Bakterien zu untersuchen. Eine Immunantwort muss nämlich streng reguliert werden um eine überschießende Entzündung und Sepsis zu verhindern. Dabei spielt möglicherweise die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien eine wichtige Rolle, da die Immunantwort auf tote Erreger nicht so drastisch ausfallen braucht wie auf lebende Bakterien.

Es wurde bereits vor Jahren demonstriert, dass nach einer bakteriellen Infektion eine Form des Zelltodes ausgelöst wird, die sich von den bereits bekannten Apoptose und Nekrose unterscheidet. Diese Form des Zelltodes ist Pyroptose (50). Anhand der *Shigella*- und *Salmonella*-Infektionen konnte gezeigt werden, dass Pyroptose Caspase-1 vermittelt ist (48,49,67,68). Die Freisetzung des Zytokins IL-1 $\beta$  verläuft ebenfalls Caspase-1 abhängig (54).



Der hier verwendete apathogene EC Stamm K12 DH5 $\alpha$  exprimiert keine bekannten Virulenzfaktoren. Die Replikationsfähigkeit wurde durch eine Thymidin-Auxotrophie (thyA<sup>-</sup>) beschränkt. Damit konnten selektiv die grundlegenden Mechanismen der Erkennung des toten oder lebenden Pathogens untersucht werden ohne den störenden Einfluss von bakterieller Replikations- oder Virulenzfaktoren. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass eine Infektion mit diesem Bakterienstamm zur Pyroptose und zur IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den murinen BMMs führte (95). Hier wurde untersucht, ob humane Phagozyten ähnliche Antworten zeigen. Hierfür wurden primäre Monozyten, MoDC und THP-1 Zellen mit lebenden oder toten EC stimuliert.

In dieser Studie führte nur eine Infektion mit lebenden, aber nicht mit toten Bakterien zur Pyroptose, gemessen durch die LDH-Freisetzung in den Überstand, und zur IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Somit konnten die Ergebnisse aus murinen Zellen repliziert werden (95). Außerdem konnte in den MoDC und THP-1 Zellen gezeigt werden, dass eine Freisetzung von aktivem IL-1 $\beta$  in den Überstand nur durch lebende und nicht durch tote Bakterien stimuliert wurde.

In humanen Monozyten wurden durch lebende Bakterien im Vergleich zu toten Bakterien neben einer höheren Pyroptose-Rate und stärkeren IL-1 $\beta$ -Freisetzung auch eine höhere TNF- $\alpha$ -Produktion stimuliert. Dies ist bemerkenswert, da murine Phagozyten keine Unterschiede in der Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit lebenden oder toten Bakterien zeigten (95). Das liegt am ehesten daran, dass in BMMs die Aktivierung von TLR4 auf der Zelloberfläche durch PAMPs wie bakterielle LPS, zu einer starken Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs und zur Produktion der inflammatorischen Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6) führt. In humanen Zellen hingegen wird TNF und IL-12 nicht durch TLR4-Aktivierung induziert. In anderen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Erkennung von bakterieller RNA, welche primär in lebenden Bakterien nachweisbar ist, zur Induktion von TNF und IL-12 führt. Bakterielle RNA wird in humanen Phagozyten durch den endosomal lokalisierten TLR8 erkannt (106). Aktuell ist unklar, welcher Rezeptor die IL-1 $\beta$ -Freisetzung in Reaktion auf lebende Bakterien vermittelt. Unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe legen jedoch eine Beteiligung von TLR8 nahe (Pfeiffer et al, unpublizierte Ergebnisse).

Insgesamt war in der vorliegenden Studie beobachtete Pyroptose nach Infektion mit lebenden Bakterien deutlich niedriger als in BMMs nachgewiesen wurde (95).

Zudem musste eine relativ hohe Infektionsdosis (MOI 30) verwendet werden um messbaren Zelltod nachzuweisen. Diese Infektionsdosis kann zwar bei akuten bakteriellen Infektionen am Infektionsort erreicht werden, stellt jedoch sicher eher eine Ausnahme dar. Die mechanistische Ursache für die unterschiedliche Reaktion von humanen und murinen Phagozyten in Bezug auf Zelltod und TNF- $\alpha$ -Produktion ist nicht abschließend geklärt. Es könnte sein, dass die Erkennung von lebenden Bakterien Spezies-Unterschiede aufweist, die auf TLR8 zurückzuführen sind. TLR8 wird zwar in Mäusen exprimiert, reagiert jedoch nicht auf Einzelstrang-RNA (ssRNA) (107). Wie bereits oben erwähnt, wird gerade die Rolle von TLR8 in unserer Arbeitsgruppe erforscht.

Caspase-1 ist die am besten charakterisierte inflammatorische Caspase. Sie ist in Mäusen und Menschen konserviert (62,63). Daneben besitzen Mäuse noch zwei weitere inflammatorischen Caspasen – Caspase-11 und -12 (58). Die funktionellen Äquivalenten der murinen Caspase-11 im Menschen sind wahrscheinlich Caspase-4 und -5 (59). Humane Caspase-12 wurde lange als funktionslos eingestuft. Vor kurzem wurde jedoch ihre Rolle in der Apoptose beschrieben (61).

Anhand der *Shigella*- und *Salmonella*-Infektionen konnte gezeigt werden, dass Caspase-1 für die Pyroptose der Zellen verantwortlich ist (48,49,67,68). Ebenso ist aus den Anfängen der Caspase-Forschung bekannt, dass die Aktivierung der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 durch Caspase-1 erfolgt (54).

Was die Caspasen-4 und -5 angeht, so ist ihre Funktion bei weitem nicht so gut untersucht wie die der Caspase-1. Aus einer kürzlich publizierten Studien ist bekannt, dass die Caspase-4 in humanen Zellen für die Pyroptose und NLRP3-abhängig für die IL-1 $\beta$ -Produktion verantwortlich ist (82). Bei der Caspase-5 wurde in einigen Studien eine ähnliche Funktion vermutet, da die Synthese der Caspase-5 auf mehrere proinflammatorische Stimuli mit einer erhöhten mRNA-Synthese, Proteinexpression und katalytischer Aktivität reagierte (83). Außerdem wurde in einer Studie von 2015 gezeigt, dass in humanen Monozyten die Caspase-5 zusammen mit der Caspase-4 nach einer LPS-Stimulation für IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Produktion verantwortlich war (84).

In der aktuellen Arbeit sollte untersucht werden, ob inflammatorische Caspasen im Zelltod und in der Freisetzung von IL-1 $\beta$  nach Detektion von lebenden Bakterien durch humane Phagozyten eine Rolle spielen. Basierend auf bisherigen Studien wurde das Augenmerk vor allem auf die inflammatorischen Caspasen-1, -4 und -5 gelegt. Parallel dazu wurden initial auch andere humane Caspasen untersucht. Nach der Infektion der humanen Monozyten mit lebenden Bakterien zeigten nur die Caspasen-1 und -4 eine Funktion bei der Pyroptose und der IL-1 $\beta$ -Freisetzung. Die anderen hier untersuchten Caspasen, einschließlich der Caspase-5, spielten für die Pyroptose und die IL-1 $\beta$ -Produktion keine Rolle. Dies widerspricht der Studie (84), in welcher gezeigt wurde, dass die Caspase-5 zusammen mit der Caspase-4 für die IL-1 $\beta$ -Freisetzung verantwortlich war. Dort wurde die Reaktion auf LPS untersucht, welche auch Bestandteile der hier eingesetzten gramnegativen Bakterien sind. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten daran liegen, dass in der älteren Studie ein weniger spezifischer Inhibitor eingesetzt wurde, der beide Caspasen (-4 und -5) inhibierte. Es könnte also sein, dass der Effekt vor allem auf die Inhibition von Caspase-4 zurückzuführen war. Das bestätigt der Versuch in der älteren Studie, wo mit der spezifischen siRNA gegen die Caspase-5 vor allem ein Unterschied in der IL-1 $\alpha$  und weniger in der IL-1 $\beta$ -Produktion gemessen wurde, wobei beides nicht signifikant reduziert wurde. In dieser Studie wurde außerdem gezeigt, dass eine Internalisierung von LPS für die Caspase-5-Aktivierung notwendig ist. In einer anderen Studie wurde demonstriert, dass die Caspase-5 an intrazelluläre LPS bindet (57). Damit wäre zu diskutieren, ob die Caspase-5 nur durch zytosolische Bakterienbestandteile aktiviert wird.

Ausgehend von den bisherigen Ergebnissen wäre zu diskutieren, ob die Caspase-5 zusammen mit der Caspase-4 durch unterschiedliche inflammatorische Stimuli aktiviert wird, der Beitrag zur Pyroptose und zur IL-1 $\beta$ -Produktion jedoch vor allem durch die Caspase-4 geleistet wird. Um die Rolle der Caspase-5 weiter zu untersuchen, könnte man in der Zukunft für die Versuche mit humanen Monozyten einen anderen spezifischen Caspase-5-Inhibitor testen. Außerdem könnte man eine längere Stimulationszeit der Zellen mit Bakterien ausprobieren (zum Beispiel 18, 20 oder 22 Stunden), um den Effekt der Reaktion auf zytosolische Bestandteile der Caspase-5 zu untersuchen.

Es gibt vielzählige Studien, die die Funktionen von Caspase-1 bei der Pyroptose (48,49,67,68) und der IL-1 $\beta$ -Produktion (54) belegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der Caspase-1 während einer Infektion mit lebenden und toten EC untersucht und zudem mit der Rolle von Caspase-4 verglichen. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass Caspase-1 primär durch lebende und nicht durch tote Bakterien aktiviert wird. Hierbei ist anzumerken, dass die Darstellung der aktiven Caspase-1 im Western Blot sich als technisch herausfordernd darstellte. Eine mehrfache Anpassung der Proteinextraktion und der Elektrophoresebedingungen war nötig.

In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass pharmakologische Inhibition von Caspase-1 in humanen Monozyten während einer Infektion mit lebenden Bakterien zu einer Hemmung der IL-1 $\beta$ -Freisetzung, jedoch nicht der Pyroptose führte. Diese Daten unterscheiden sich von Erkenntnissen früherer Studien (47,48,67,68). Jedoch wurden in diesen Studien Makrophagen der Maus und keine menschlichen Zellen untersucht. Außerdem wurden in den genannten Studien primär virulente Bakterien verwendet (*Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*), welche über spezifische Virulenzfaktoren wie z.B. Sekretionsapparate und Flagellen zur Aktivierung von Caspase-1 über das NLRC4/Naip5-Inflammasom führen. Diese Stämme induzieren auch eine massive Pyroptose in Makrophagen, weshalb die LDH-Freisetzung in diesen Studien deutlich höher war. Jedoch war das Ziel der Arbeit nicht die Untersuchung spezifischer Virulenzfaktoren, sondern allgemein der Antwort auf lebende Bakterien im Gegensatz zu toten Bakterien, weswegen hier Bakterienstämme ohne Virulenzfaktoren verwendet wurden, was den Vergleich mit den früheren Studien schwierig macht.

Nach dem Infizieren der humanen Monozyten und dem Einsatz des Caspase-1-Inhibitors wurde die Funktion der Caspase-1 weiter erforscht, indem die Genexpression von Caspase-1 mittels shRNA-vermitteltem-KD vermindert wurde. Zunächst wurde versucht, einen transienten KD von Caspase-1 in MoDC mithilfe lentiviraler shRNA-Transduktion zu etablieren. Hierbei zeigte sich jedoch durchweg eine unzureichende KD-Effizienz mit insgesamt vier verschiedenen shRNA-LV-Vektoren. Die Ergebnisse der frustrierten Versuche sind hier nicht dargestellt. Alternativ wurden kommerziell hergestellte stabile Caspase-1-shRNA THP-1-Zellen eingesetzt. Die shRNA-Sequenz ist nicht bekannt. Allerdings zeigten die Zellen lediglich in der 1. Passage eine relativ

spezifische Caspase-1-Defizienz. In späteren Passagen waren alle untersuchten Zytokinantworten ebenfalls deutlich reduziert, inklusive solcher Zytokine, für die bekannt ist, dass sie Caspase-1 unabhängig reguliert werden, wie z.B. IL-6. Dies ließ auf erhebliche „off-target-Effekte“, entweder basierend auf off-target silencing der transduzierten shRNA, oder durch klonale Selektionseffekte während der Selektionsphase schließen. Als „off-target-Effekt“ wird eine ungewollte Veränderung des Genoms bezeichnet, die nicht der Zielposition entspricht, sich jedoch von der Zielposition nur gering unterscheidet und damit vom Silencing miterfasst wird. Diese „off-target-Effekte“ scheinen in der vorliegenden Arbeit mit der Kulturzeit zuzunehmen, was möglicherweise mit einer Akkumulation von shRNA zusammenhängt oder eben auf Selektionseffekte zurückzuführen ist. Aus diesem Grund war hier nur in der Passage 1 mit den spezifischen Effekten des Silencing zu rechnen, wogegen in den späteren Passagen die oben beschriebenen unspezifische Effekte auftraten. In den letzten Jahren ist es in diesem Gebiet zu massiven technischen Innovationen gekommen, v.a. ist eine Anwendung von clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein (CRISPR/Cas) für die Genomeditierung verbreitet, was aktuell auch in unserer Arbeitsgruppe standardmäßig zum Einsatz kommt. Diese Technik war jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung der vorliegenden Arbeit noch nicht verbreitet, weswegen sie hier auch nicht zum Einsatz kam.

In der Arbeitsgruppe wurden mittlerweile mittels CRISPR/Cas-vermittelte Genomeditierung Caspase-1 und Caspase-4 defiziente Zellen generiert. Hier zeigt sich die aus den gezeigten Inhibitorversuchen bekannte Dichotomie, nämlich einer wichtigen Rolle von Caspase-1 in der Prozessierung und Freisetzung von IL-1 $\beta$ , aber ohne wesentlichen Einfluss auf den Zelltod. Caspase-4 spielt eine Rolle bei der LPS-vermittelten Aktivierung u.a. auch beim Zelltod. Diese Daten sind Teil einer nachfolgenden Dissertation (Pfeiffer et al., unpubliziert) unserer Arbeitsgruppe.

Basierend auf den hier erhobenen Inhibitorwerten ist zudem anzunehmen, dass die humane Caspase-4 und nicht Caspase-1 für die hier sehr moderat ausgeprägte Pyroptose verantwortlich ist. In einer Studie von Casson und Kollegen aus dem Jahr 2015 fanden sich übereinstimmende Ergebnisse. Dort wurden humanen Monozyten mit *Legionella pneumophila* infiziert und durch Inhibition von Caspase-1 keine Reduktion der Pyroptose festgestellt (81). Ausgehend von meinen Ergebnissen und den

Ergebnissen dieser Studie wäre zu diskutieren, ob die Funktionen der inflammatorischen Caspasen des Menschen sich von denen der Maus noch stärker unterscheiden als bisher vermutet. Einer der Unterschiede wäre der bekannte Umstand, dass die Caspase-11 der Maus im Menschen als Äquivalente Caspasen-4 und -5 besitzt (59). Der andere Unterschied ist, dass die Caspase-4 im Menschen einen Teil der Funktionen der murinen Caspase-11 übernimmt und Caspase-1-unabhängig die Pyroptose einleitet. Zum besseren Verständnis sind weitere Studien mit verbesserter Technologie, z.B. Genomeditierung, wie bereits zuvor diskutiert, notwendig, die einzeln und spezifisch die jeweiligen Caspasen ausschalten und den Effekt der Infektion der murinen und humanen Zellen jeweils untersuchen.

Aus dem Jahr 2014 ist bekannt, dass Caspase-4 genauso wie Caspase-5 intrazelluläre LPS direkt binden kann (57). In der gleichen Studie wurde die Funktion der Caspase-4 in der Einleitung der Pyroptose in humanen Monozyten in Reaktion auf intrazelluläre LPS gezeigt. In murinen Zellen ist beschrieben, dass LPS durch ‚Guanylate-binding proteins‘ (GBP) aus dem Phagosom ins Zytosol gelangen kann und dort Caspase-11 abhängige Pyroptose einleitet (76,77). In einer älteren Studie aus dem Jahr 2012 wurde diskutiert, dass Caspase-4 direkt an Caspase-1 bindet und damit die Aktivität der letzteren verstärkt (78). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Caspase-4 als Antwort auf intrazelluläre LPS auch für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit für die IL-1 $\beta$ -Produktion zuständig war (82). Außerdem wurde gefunden, dass die Caspase-4 nach einer Infektion mit gramnegativen Bakterien zur Pyroptose und zur IL-1 $\alpha$ -Produktion führte (81).

In dieser Arbeit wurde mittels der Western Blots gezeigt, dass die Caspase-4 nur durch lebende und nicht durch tote Bakterien aktiviert wird. Hierbei ist zu beachten, dass zwar die Prozessierung des Proenzym als Aktivierungsschritt gesichert ist, jedoch für die aktive Form der Caspase-4 noch keine eindeutige Proteingröße definiert ist, wie es zum Beispiel für die Caspase-1 der Fall ist. In der vorliegenden Arbeit wird von einer Proteingröße des aktiven Fragments von etwa 35 kDa ausgegangen, was

immer wieder nach einer Infektion mit lebenden Bakterien in den durchgeführten Western Blots gesehen wurde.

In humanen Monozyten konnte ich demonstrieren, dass Caspase-4 nach der Infektion der Zellen mit lebenden Bakterien für den Zelltod zuständig war, da die Pyroptose-Rate nach chemischer Inhibition von Caspase-4 reduziert wurde. Außerdem war in diesen Experimenten Caspase-4 in einem geringeren Ausmaß als Caspase-1 für die IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand verantwortlich. Der Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Produktion bestätigte sich auch in den Versuchen mit MoDC, in denen mittels shRNA ein transienter Caspase-4-KD erreicht wurde. Dagegen sah man in dendritischen Zellen keine Reduktion des Zelltodes durch KD von Caspase-4. Das könnte an den technischen Schwierigkeiten der Zelltodmessungen liegen, da es schwierig war, den Zelltod aus Überständen der Zellen zu messen, die längere Zeit in Kultur waren. In der Zukunft sollten weitere Messungen des Zelltodes durchgeführt werden, z.B. Bestimmung der Zellintegrität und Phosphatidylserin-Externalisierung, z.B. mittels Annexin-V oder Propidiumiodid-Assay.

Generell muss die Spezifität der Caspase-Inhibitoren diskutiert werden, da Caspasen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und die oben beschriebenen „off-target-Effekte“ nicht vollkommen auszuschließen sind. Gleiches gilt für die KD-Experimente mittels shRNA. Hier kam es zu erheblichen „off-target-Effekten“, die die Interpretierbarkeit der Ergebnisse stark einschränkten. Wie bereits diskutiert, wird nun verstärkt Genomeditierung mittels CRISPR/Cas eingesetzt um die definitive Funktion von Caspasen zu klären, allerdings sind auch hier klonale Effekte zu bedenken.

Durch den transienten KD der Caspase-4 in dendritischen Zellen kam es neben einer IL-1 $\beta$ -Reduktion auch zu einer Reduktion von TNF- $\alpha$ . Dies könnte neben eines möglichen off-target Effekts auch an einem sekundären Effekt der IL-1 $\beta$ -Reduktion liegen, da IL-1 $\beta$  über den IL-1-Rezeptor ebenfalls zu einer starken NF- $\kappa$ B Aktivierung und Induktion von proinflammatorischen Zytokinen führt.

Die Infektion der hier etablierten stabilen Caspase-4 defizienten THP-1 Zelllinie konnte leider keine neuen Aspekte bringen. Während sich ein stabiler KD erreichen ließ, zeigten sich leider erhebliche unspezifische Effekte mit einer allgemeinen Reduktion aller inflammatorischen Antworten inklusive Zelltod, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6.

Dementsprechend kann man hier nicht von einem spezifischen Effekt der Caspase-4 ausgehen. Auch hier sind weitere Versuche mit CRISP/Cas notwendig, um die Caspase-4 spezifische Effekte versuchen zu beleuchten.

Zusammenfassend kann man vor dem Hintergrund dieser Daten, sowie der publizierten Literatur diskutieren, dass die humane Caspase-4 Pyroptose einleiten kann und je nach Zelltyp zusammen mit Caspase-1 auch für die IL-1 $\beta$ -Produktion in Reaktion auf lebende Bakterien verantwortlich ist. Diese so genannte „nicht kanonische“ Aktivierung des Inflammasoms durch Caspase-4 wurde in den humanen Monozyten auch früher beschrieben (81). Aus meiner Studie wurde deutlich, dass die Pyroptose auch unabhängig von Caspase-1 möglich sein kann. Es kam die Frage auf, ob die Caspase-4 die Funktion der Caspase-1 im Inflammasom übernimmt oder selbständig ohne Inflammasom-Bestandteile fungiert. Um diese Frage zu adressieren wurde ein weiterer, von Caspase-1 unterschiedlicher Bestandteil des Inflammasoms untersucht, nämlich das Adaptorprotein ASC.

ASC ist am Aufbau des NLRP3-Inflammasoms beteiligt und fungiert als ein so genanntes Adaptermolekül, welches aktivierte NLR-Moleküle (z.B. NLRP3) mit der Procaspase-1 verbindet und sie damit aktiviert (108). Als Ergebnis der Caspase-1-Aktivierung entstehen die aktiven Formen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 (10). In dieser Arbeit wurde in den stabilen ASC-defizienten THP-1-Zellen nach einer Infektion mit lebenden EC eine aufgehobene IL-1 $\beta$ -Produktion beobachtet. Dies sah man an den ELISA-Messungen und im Western Blot aus dem konzentrierten Überstand. Die Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion war nicht von einer Reduktion der IL-6-Produktion begleitet, was die Spezifität der Ergebnisse zeigte. Jedoch kam es zu einer signifikanten TNF- $\alpha$ -Reduktion, was am sekundären Effekt der aufgehobenen IL-1 $\beta$ -Produktion liegen könnte. Es wurde in den stabilen ASC-shRNA transduzierten Zellen keine Reduktion des Zelltodes festgestellt. Außerdem war der Zelltod selbst nach einer Infektion der Kontrollvektor-Zellen mit EC niedrig, weshalb die Rolle von ASC, und somit des Inflammasoms im Bakterien-vermittelten Zelltod nicht abschließend bewertet werden können. Die IL-1 $\beta$ -Aktivierung ist dagegen vollständig von ASC abhängig.



Andere Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, sowohl mittels transienter shRNA-Transduktion in MoDC, als auch mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Genomedition, dass die IL-1 $\beta$  Freisetzung vollständig NLRP3-abhängig ist (Helbig et al. (109) und Pfeiffer et al., unpubliziert). Zusammen mit den hier gezeigten Ergebnissen scheint somit das NLRP3-ASC-Caspase-1 Inflammasom zentral für die auf lebende Bakterien ausgelöste IL-1 $\beta$ -Freisetzung in menschlichen Phagozyten zu sein. Dies deckt sich zudem mit den Erkenntnissen in Maus-Phagozyten (95).

Zusammenfassend ging aus dieser Studie hervor, dass Bakterien-induzierter Zelltod ASC-unabhängig und damit wahrscheinlich unabhängig vom NLRP3-Inflammasom vermittelt wird. Ähnliche Ergebnisse sah man in einer älteren Studie (57). Dort wurde in U937-Zellen als Antwort auf zytoplasmatische LPS ein Caspase-1- und ASC-unabhängiger, aber Caspase-4-abhängiger Zelltod gezeigt. Aus meiner Studie ging außerdem hervor, dass ASC für die IL-1 $\beta$ -Produktion verantwortlich ist, was bereits früher in der gleichen Zelllinie gezeigt wurde (81). In einer älteren Studie (28) wurde eine ASC-abhängige Pyroptose beschrieben, die allerdings durch LPS und ATP hervorgerufen wurde, Reagenzien, die für die Aktivierung des Inflammasoms bekannt sind. Außerdem wurden in der älteren Arbeit keine humanen Zellen eingesetzt, sondern Mauszellen, die keine Caspase-4 besitzen. Diese beiden Aspekte machen den Vergleich der früheren Studie mit dieser schwer.

Es ist schon länger bekannt, dass RNA von lebenden Bakterien in Maus-Phagozyten, z.B. BMMs, Caspase-1 durch das NLRP3-Inflammasom aktiviert (96). Es wurde bislang angenommen, dass dazu die bakterielle RNA aus den Bakterien in das Zytosol gelangen muss. 2011 wurde bakterielle mRNA als ein so genanntes *vita*-PAMP bezeichnet, anhand dessen die Immunzellen die „Lebendigkeit“ der Bakterien feststellen und danach NLRP3- und Caspase-1-abhängig Pyroptose und IL-1 $\beta$ -Produktion auslösen (95). In einer späteren Studie wurde gezeigt, dass Caspase-11 für den Zelltod durch lebende Bakterien eine relevante Rolle spielt (110).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass auch in humanen Zellen lebenden EC im Gegensatz zu hitzeabgetöteten die IL-1 $\beta$ -Produktion und die Pyroptose

auslösten. Außerdem kam es nur durch lebende EC zur Aktivierung von Caspase-1 und -4. Der Mechanismus, mit dem humane Immunzellen zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden, wurde hier ebenfalls adressiert. Dafür wurde bakterielle RNA extrahiert und in humane Phagozyten transfiziert.

In der stabilen Caspase-1 defizienten THP-1 Zelllinie wurde nach einer EC-RNA Transfektion in der 1. Passage eine Reduktion der IL-1 $\beta$ -Produktion gegenüber der Kontrollvektor-Zelllinie festgestellt. Die IL-1 $\beta$ -Reduktion war von einer TNF- $\alpha$ -Reduktion begleitet, was ein sekundärer Effekt der IL-1 $\beta$ -Reduktion sein könnte, die IL-6-Produktion blieb hingegen unbeeinflusst. Die Pyroptose war nach der Behandlung mit dem Transfektionsreagenz allein schon höher als mit dem Transfektionsreagenz und RNA zusammen, was die Ergebnisse der Zelltodmessung unverwertbar machte. Leider waren in den späteren Passagen erhebliche unspezifische Effekte zu beobachten, die eine Reduktion von allen gemessenen inflammatorischen Zytokinen zeigten. Daher steht aktuell nur ein einzelner Versuch zur Verfügung, was keine valide Interpretation der Ergebnisse erlaubt.

In den stabilen Caspase-4 KD-Zellen blieb der Zelltod nach der RNA-Transfektion im Vergleich zu Kontrollvektor-Zellen ebenfalls unverändert. Es kam zu einer wenn auch nicht signifikanten IL-1 $\beta$ -Reduktion. Allerdings kam es nach der Transfektion bei TNF- $\alpha$  und IL-6 zu einer breiten Streuung der Ergebnisse und zur Reduktion der Freisetzung dieser Zytokine in zwei von drei Versuchen, was erneut auf die bereits mehrfach diskutierten „off-target-Effekte“ schließen lässt. In Zukunft wäre die Verwendung von genomedierte THP-1 Zellen oder eines transienten KD in MoDC zu verwenden. Dieses System wurde in dieser Arbeit für die Infektion mit EC benutzt und funktionierte überwiegend gut. Damit ließen sich die unspezifischen Effekte minimieren, die mit erst nach längerer Kulturzeit aufgetreten sind.

Die hier generierte stabile ASC-shRNA Zelllinie erwies sich als einzige über viele Passagen hinweg als spezifisch und frei von unspezifischen NF $\kappa$ B-Effekten. Nach der RNA-Transfektion in diese Zellen kam es zu einer signifikanten Reduktion der IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand im Vergleich zu Kontrollvektor-Zellen. Der Zelltod und die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-6 in den Überstand blieben unverändert. Ausgehend von meinen Ergebnissen ist zu sehen, dass die Pyroptose als Antwort auf die zytosolische EC-RNA auch ohne ASC möglich ist. Die IL-1 $\beta$ -Freisetzung in den Überstand ist

hingegen vollständig ASC-abhängig, und somit Inflammasom-vermittelt. In dieser Hinsicht konnte ich die Ergebnisse der oben genannten Studie (95) auch im humanen System bestätigen. Was den Zusammenhang zwischen dem NLRP3-Inflammasom und der Pyroptose nach einer RNA-Transfektion anging, so ist es schwierig eine Aussage zu treffen, weil es bereits durch den Einsatz des Transfektionsreagenz allein zu einem signifikanten Zelltod kam. Neben der Verwendung von anderen Zellreihen könnte man in Zukunft auch andere Transfektionsreagenzien testen, auf das die Zellen nicht bereits mit so einem hohen Zelltod reagieren.

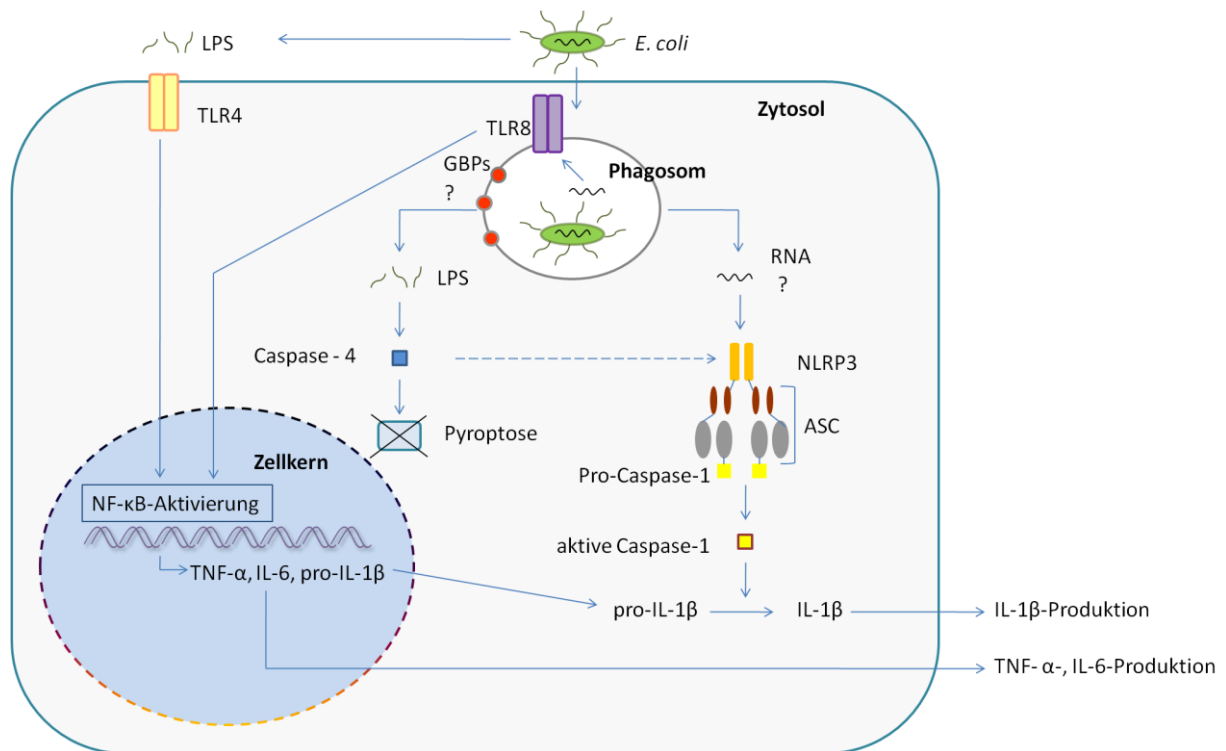
Zusammenfassend konnte ich aufgrund technischer Schwierigkeiten, die mit dem Transfektionsreagenz und mit der Zellkultur zusammenhingen, keine abschließende Aussage dazu treffen, ob die Reaktion der Zellen auf die zytosolische EC-RNA Caspase-1 und -4 abhängig verlief. Weitere Studien mit anderen Zellreihen und weitere Anpassung der Transfektionsbedingungen sind nötig, um die Rolle der inflammatorischen Caspasen in der Erkennung der zytosolischen bakteriellen RNA zu klären.

#### **4.1 Abschließende Bemerkungen**

Obwohl eine starke Immunantwort für das Bekämpfen der gramnegativen Bakterien, wie EC, notwendig ist, kann eine überschießende dysregulierte Aktivierung des Immunsystems zur Sepsis und sogar zum Tod des Organismus führen (7). Die inflammatorischen Caspasen spielen für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine große Rolle.

Diese Studie beschäftigte sich mit den Funktionen der Caspasen-1 und -4 bei der Reaktion auf lebende und tote Bakterien. Es wurde gezeigt, dass Caspasen-1 und -4 lediglich durch lebende und nicht durch tote Bakterien aktiviert werden. Hierbei waren die Funktionen der Caspasen-1 und -4 verschieden. Während Caspase-1 vor allem für die IL-1 $\beta$ -Produktion zuständig war, so schien die Pyroptose auch ohne Caspase-1 möglich und Caspase-4-abhängig. Außerdem unterstützte Caspase-4, je nach Zelltyp, im unterschiedlichen Maße die IL-1 $\beta$ -Aktivierung. Endgültige Aussagen wurden durch die bereits mehrfach diskutierten technischen Schwierigkeiten stark eingeschränkt. Daher sind weitere Studien, die z.T. bereits in der Arbeitsgruppe erfolgt sind, nötig um die Ergebnisse zu validieren bzw. endgültige Aussagen zur Rolle von Caspase-1 und

Caspase-4 zu ermöglichen. Außerdem könnte untersucht werden, wie genau Caspase-4 die nicht-kanonische Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms einleitet und ob Caspase-5 eine ähnliche Funktion besitzt. Die Infektion mit pathogenen EC-Bakterienstämme sowie *Shigella* oder *Salmonella* könnten die Rolle der Caspasen-4 und -5 bei der Infektion mit diesen für den Menschen gefährlichen Bakterien klarstellen. Die Inhibition der einzelnen Caspasen sowie von weiteren Inflammasom-Bestandteilen (hier am Beispiel von ASC untersucht) könnte eine Strategie für das Hemmen einer ungezielten und manchmal überschießenden Immunabwehr sein, die oft der Grund für einen schweren Infektionsverlauf ist. Weitere Studien sind notwendig, um ein besseres Verständnis der „Lebendigkeit“ der Bakterien zu adressieren. Denn auch eine verminderte Reaktion der Zellen auf tote im Gegensatz zu lebenden Bakterien ist eine Strategie, die man pharmakologisch nutzen kann, um dem Wirt während eines schweren Infektionsverlaufs zu helfen. Ein besseres Verständnis des Signalweges der inflammatorischen Caspasen und der Inflammasom-Bestandteile sowie der „Lebendigkeits-Merkmale“ der Bakterien könnte helfen, in Zukunft neue Strategien zu entwickeln, um die Inflammation und damit die Sepsis besser kontrollieren zu können.



**Abbildung 19: Unterschiedliche Rollen der Caspasen-1 und-4 bei der Reaktion auf lebende EC.** LPS als Zellmembranbestandteil von EC wird durch TLR4 erkannt, was zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB im Zellkern führt. Dadurch werden die proinflammatorischen Zytokine wie TNF-α, IL-6 und pro-IL-1β produziert. Die Internalisierung und die Aufnahme der Bakterien ins Phagosom führen zur Freisetzung von LPS und RNA ins Zytosol. Die Freisetzung von LPS ins Zytosol wird vermutlich durch GBP vermittelt. Intrazelluläre LPS aktivieren Caspase-4, was unabhängig vom NLRP3-Inflammasom zur Pyroptose der Zelle führen kann. Aufnahme von lebenden Bakterien führt zur Erkennung der bakteriellen RNA durch TLR8 im Phagosom (106). Es ist auch denkbar, dass RNA in das Zytosol gelangt und dort zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit der Caspase-1 führt. Das pro-IL-1β wird von der Caspase-1 in seine aktive Form prozessiert. Caspase-4 führt je nach Zelltyp zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und damit zur Produktion von IL-1β.

## Literaturverzeichnis

1. Medzhitov R, Janeway CJr. Innate Immunity. *N Engl J Med*. 3. August 2000;343(5):338–44.
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 19. März 1998;392(6673):245–52.
3. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197–216.
4. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. April 2008;8(4):279–89.
5. Fleming A. On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions [Internet]. Royal Society of London; 1922 [zitiert 18. Januar 2018]. Verfügbar unter: <http://archive.org/details/philtrans00877782>
6. Doke N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol Plant Pathol*. 1. November 1983;23(3):345–57.
7. Castellheim A, Brekke O-L, Espevik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol*. Juni 2009;69(6):479–91.
8. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. Februar 2011;30(1):16–34.
9. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991–1045.
10. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 19. März 2010;140(6):805–20.
11. Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*. Oktober 1985;42(3):779–89.
12. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. Mai 2010;11(5):373–84.
13. Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 18. Juni 1999;274(25):17406–9.
14. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Dezember 1999;96(25):14459–63.
15. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, u. a. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science*. 11. Dezember 1998;282(5396):2085–8.

16. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 26. April 2001;410(6832):1099–103.
17. O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. Mai 2007;7(5):353–64.
18. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science*. 28. November 1997;278(5343):1612–5.
19. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 1. August 2003;301(5633):640–3.
20. Perry AK, Chen G, Zheng D, Tang H, Cheng G. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. *Cell Res*. Juni 2005;15(6):407–22.
21. Cusson-Hermance N, Khurana S, Lee TH, Fitzgerald KA, Kelliher MA. Rip1 mediates the Trif-dependent toll-like receptor 3- and 4-induced NF- $\kappa$ B activation but does not contribute to interferon regulatory factor 3 activation. *J Biol Chem*. 4. November 2005;280(44):36560–6.
22. Kondo T, Kawai T, Akira S. Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol*. September 2012;33(9):449–58.
23. Kufer TA, Sansonetti PJ. NLR functions beyond pathogen recognition. *Nat Immunol*. Februar 2011;12(2):121–8.
24. Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:365–98.
25. Sokolovska A, Becker CE, Ip WKE, Rathinam VAK, Brudner M, Paquette N, et al. Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. *Nat Immunol*. Juni 2013;14(6):543.
26. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. August 2002;10(2):417–26.
27. Srinivasula SM, Poyet J-L, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*. 14. Juni 2002;277(24):21119–22.
28. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu J-W, Datta P, Miller B, Jankowski W, et al. The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ*. September 2007;14(9):1590–604.
29. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, Vande Walle L, Louie S, Dong J, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 16. Oktober 2011;479(7371):117–21.
30. Kanneganti T-D, Body-Malapel M, Amer A, Park J-H, Whitfield J, Franchi L, et al. Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem*. 1. Dezember 2006;281(48):36560–8.

31. Muruve DA, Pétrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, u. a. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature*. 6. März 2008;452(7183):103–7.
32. Locovei S, Wang J, Dahl G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett*. 9. Januar 2006;580(1):239–44.
33. Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on dispersed trans -Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. Dezember 2018;564(7734):71–6.
34. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, u. a. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Juli 2009;183(2):787–91.
35. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*. 27. Juni 2013;38(6):1142–53.
36. Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, u. a. Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. Mai 2013;14(5):454–60.
37. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, u. a. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. August 2008;9(8):847–56.
38. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. Juli 1999;11(1):115–22.
39. Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, u. a. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*. 9. März 2006;440(7081):228–32.
40. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. August 1972;26(4):239–57.
41. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. März 2008;9(3):231–41.
42. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, u. a. Classification of cell death. *Cell Death Differ*. Januar 2009;16(1):3–11.
43. Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol*. April 2002;128(4):1271–81.
44. Krysko DV, Denecker G, Festjens N, Gabriels S, Parthoens E, D'Herde K, u. a. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ*. Dezember 2006;13(12):2011–22.
45. Cho Y, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, u. a. Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*. 12. Juni 2009;137(6):1112–23.
46. Vande Walle L, Lamkanfi M. Pyroptosis. *Curr Biol CB*. 11. Juli 2016;26(13):R568-572.



47. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, Falkow S. Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3. September 1996;93(18):9833–8.
48. Hilbi H, Moss JE, Hersh D, Chen Y, Arondel J, Banerjee S, u. a. Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. *J Biol Chem.* 4. Dezember 1998;273(49):32895–900.
49. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2. März 1999;96(5):2396–401.
50. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* März 2001;9(3):113–4.
51. Man SM, Kanneganti T-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* Januar 2016;16(1):7–21.
52. Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* November 2006;8(11):1812–25.
53. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, u. a. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature.* 29. Oktober 2015;526(7575):660–5.
54. Li P, Allen H, Banerjee S, Franklin S, Herzog L, Johnston C, u. a. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* 10. Februar 1995;80(3):401–11.
55. Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, u. a. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Oktober 2010;185(7):4385–92.
56. Dombrowski Y, Peric M, Koglin S, Kammerbauer C, Göß C, Anz D, u. a. Cytosolic DNA Triggers Inflammasome Activation in Keratinocytes in Psoriatic Lesions. *Sci Transl Med.* 11. Mai 2011;3(82):82ra38.
57. Shi J, Zhao Y, Wang Y, Gao W, Ding J, Li P, u. a. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 9. Oktober 2014;514(7521):187–92.
58. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* April 2002;9(4):358–61.
59. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell.* 28. Mai 2004;117(5):561–74.
60. Xue Y, Daly A, Yngvadottir B, Liu M, Coop G, Kim Y, u. a. Spread of an inactive form of caspase-12 in humans is due to recent positive selection. *Am J Hum Genet.* April 2006;78(4):659–70.
61. Zhang Q, Liu J, Chen S, Liu J, Liu L, Liu G, u. a. Caspase-12 is involved in stretch-induced apoptosis mediated endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis Int J Program Cell Death.* April 2016;21(4):432–42.

62. Black RA, Kronheim SR, Merriam JE, March CJ, Hopp TP. A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem*. 5. April 1989;264(10):5323–6.
63. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, u. a. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*. 3. April 1992;256(5053):97–100.
64. Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, u. a. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature*. 28. Juli 1994;370(6487):270–5.
65. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, u. a. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*. Juli 2004;430(6996):213.
66. Sansonetti PJ, Phalipon A, Arondel J, Thirumalai K, Banerjee S, Akira S, u. a. Caspase-1 activation of IL-1beta and IL-18 are essential for *Shigella flexneri*-induced inflammation. *Immunity*. Mai 2000;12(5):581–90.
67. Brennan MA, Cookson BT. *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol*. Oktober 2000;38(1):31–40.
68. Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J*. 1. August 1996;15(15):3853–60.
69. Ledesma E, Martínez I, Córdova Y, Rodríguez-Sosa M, Monroy A, Mora L, u. a. Interleukin-1 beta (IL-1beta) induces tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression on mouse myeloid multipotent cell line 32D cl3 and inhibits their proliferation. *Cytokine*. 21. April 2004;26(2):66–72.
70. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 15. März 1996;87(6):2095–147.
71. Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–50.
72. Dinarello CA, Fantuzzi G. Interleukin-18 and host defense against infection. *J Infect Dis*. 15. Juni 2003;187 Suppl 2:S370-384.
73. Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kudo T, Taniguchi M, Koyama Y, u. a. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*. 10. Mai 2004;165(3):347–56.
74. Hagar JA, Powell DA, Aachoui Y, Ernst RK, Miao EA. Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock. *Science*. 13. September 2013;341(6151):1250–3.
75. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, Ramani SR, Gonzalez LC, Akashi-Takamura S, u. a. Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4. *Science*. 13. September 2013;341(6151):1246–9.
76. Meunier E, Dick MS, Dreier RF, Schürmann N, Kenzelmann Broz D, Warming S, u. a. Caspase-11 activation requires lysis of pathogen-containing vacuoles by IFN-induced GTPases. *Nature*. 15. Mai 2014;509(7500):366–70.

77. Pilla DM, Hagar JA, Haldar AK, Mason AK, Degrandi D, Pfeffer K, u. a. Guanylate binding proteins promote caspase-11-dependent pyroptosis in response to cytoplasmic LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22. April 2014;111(16):6046–51.
78. Sollberger G, Strittmatter GE, Kistowska M, French LE, Beer H-D. Caspase-4 is required for activation of inflammasomes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15. Februar 2012;188(4):1992–2000.
79. Grimstad Ø, Husebye H, Espevik T. TLR3 mediates release of IL-1 $\beta$  and cell death in keratinocytes in a caspase-4 dependent manner. *J Dermatol Sci*. Oktober 2013;72(1):45–53.
80. Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H, u. a. The Shigella OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe*. 15. Mai 2013;13(5):570–83.
81. Casson CN, Yu J, Reyes VM, Taschuk FO, Yadav A, Copenhaver AM, u. a. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26. Mai 2015;112(21):6688–93.
82. Schmid-Burgk JL, Gaidt MM, Schmidt T, Ebert TS, Bartok E, Hornung V. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *Eur J Immunol*. Oktober 2015;45(10):2911–7.
83. Bian Z-M, Elnér SG, Khanna H, Murga-Zamalloa CA, Patil S, Elnér VM. Expression and Functional Roles of Caspase-5 in Inflammatory Responses of Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1. November 2011;52(12):8646–56.
84. Viganò E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat Commun*. 28. Oktober 2015;6:8761.
85. Gram H. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschr Med*. 1884;2:185–9.
86. Glauert AM, Thornley MJ. The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol*. 1969;23:159–98.
87. GOLDMAN Robert C., LEIVE Loretta. Heterogeneity of Antigenic-Side-Chain Length in Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 0111 and *Salmonella typhimurium* LT2. *Eur J Biochem*. Juni 1980;107(1):145–53.
88. Sie MY, Ip-yam PC, Oon LLE. *Vibrio vulnificus* septicaemia. *Anaesth Intensive Care*. Februar 2002;30(1):77–81.
89. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, Herausgeber. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* [Internet]. 6. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009 [zitiert 31. Mai 2018]. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: [//www.springer.com/de/book/9783540463627](http://www.springer.com/de/book/9783540463627)
90. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. Januar 1998;11(1):142–201.
91. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(1):26–38.

92. Brunkhorst FM, Schmitz RPH. Sepsis – Epidemiologie, Biomarker und mikrobiologische Diagnostik. *Klin. Juni 2014;43(06):284–8.*
93. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta.* 1. September 2002;323(1):59–72.
94. Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Lockett W, u. a. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat Med.* August 2005;11(8):853–60.
95. Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, Amsen D, Dascher CC, Ryffel B, u. a. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature.* 22. Mai 2011;474(7351):385–9.
96. Kanneganti T-D, Özören N, Body-Malapel M, Amer A, Park J-H, Franchi L, u. a. Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature.* März 2006;440(7081):233.
97. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, u. a. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 23. Februar 2016;315(8):801–10.
98. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, u. a. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* Juni 1992;101(6):1644–55.
99. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublein S, u. a. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arzteblatt Int.* 11. März 2016;113(10):159–66.
100. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* August 2012;11(8):633–52.
101. Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D. Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. *Clin Diagn Lab Immunol.* Januar 2005;12(1):60–7.
102. Kajiwara Y, Schiff T, Voloudakis G, Gama Sosa MA, Elder G, Bozdagi O, u. a. A critical role for human caspase-4 in endotoxin sensitivity. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1. Juli 2014;193(1):335–43.
103. Satoh T, Manel N. Gene transduction in human monocyte-derived dendritic cells using lentiviral vectors. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;960:401–9.
104. Jakobs C, Bartok E, Kubarenko A, Bauernfeind F, Hornung V. Immunoblotting for active caspase-1. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2013;1040:103–15.
105. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* August 1970;227(5259):680–5.
106. Ugolini M, Gerhard J, Burkert S, Jensen KJ, Georg P, Ebner F, u. a. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nat Immunol.* 2018;19(4):386–96.

107. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, u. a. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 5. März 2004;303(5663):1526–9.
108. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 19. März 2010;140(6):821–32.
109. Helbig ET, Opitz B, Sander LE. Adjuvant immunotherapies as a novel approach to bacterial infections. *Immunotherapy*. 1. April 2013;5(4):365–81.
110. Rathinam VAK, Vanaja SK, Waggoner L, Sokolovska A, Becker C, Stuart LM, u. a. TRIF Licenses Caspase-11-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation by Gram-Negative Bacteria. *Cell*. 3. August 2012;150(3):606–19.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julia Halkin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Inflammatorische Caspasen und ihre Funktion in der Reaktion der Immunzellen auf lebende Bakterien/Inflammatory caspases and their role in the immun response to live bacteria“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe. Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und meinen Betreuer, Prof. Dr. Leif Erik Sander, für seine wunderbare Unterstützung und Geduld in den letzten Jahren danken ebenso wie für die Möglichkeit, ein Teil seines tollen Teams zu sein. Ebenso danke ich Prof. Opitz für das kritische Lesen dieser Dissertation. Ich möchte außerdem Prof. Norbert Suttrop dafür danken, dass ich die Möglichkeit bekam, meinen Interessen folgend, im Labor für Infektiologie und Immunologie an der Charité zu arbeiten.

Ich habe die Zeit im Labor genossen und habe in dieser Zeit sehr viel gelernt. Dafür danke ich neben Prof. Sander besonders Elisa Helbig, die mich am Anfang betreut und mir viel beigebracht hat. Außerdem danke ich dem gesamten Laborteam für die unglaubliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft rund um die Uhr, ganz besonders Moritz Pfeiffer, Philipp Georg, Jenny Gerhard, Matteo Ugolini, Christin Kabus und Ling Yao.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in all meinen Vorhaben unterstützt und mir die Rückendeckung gibt. Ich danke meinen Eltern und Großeltern, die mich in meiner Entscheidung bestärkt haben, diese Arbeit zu schreiben, meinem Ehemann Pavel für seine wunderbare Hilfe und Geduld sowie meine Tochter Nina für die tollen Momente zum Ablenken.