

Aus der Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Alternative NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen
Monozyten via TLR8

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Moritz Pfeiffer

.....

ausHamburg.....

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis:	1
2	Abkürzungsverzeichnis:	2
3	Zusammenfassung:	5
4	Abstract:	6
5	Einleitung:	7
5.1	Von der Mustererkennung zur skalierten Immunantwort	7
5.2	Mikrobielle Lebendigkeit – ein eigener Checkpoint des angeborenen Immunsystems?... 8	8
5.3	Mustererkennungsrezeptoren für mikrobielle RNA	9
5.4	Vesikel der äußeren Membran (Outer membrane vesicles = OMV) als mögliche Carrier von bakterieller RNA	11
5.5	Die Inflammasome – zentrale Schalter der angeborenen Immunität	11
5.6	NLRP3-Inflammasomaktivierung durch Erkennung von bakterieller Vitalität	15
6	Methoden:	16
6.1	Allgemeiner Experimentaufbau:	16
6.2	Isolation von primären, humanen Monozyten:.....	18
6.3	BlaER1 Zelllinie:.....	18
6.4	Herstellung der verschiedenen BlaER1 Knock-out Klone:	19
6.5	Zellkultur und Transdifferenzierung von BlaER1 Zellen:	19
6.6	Stimulation:	20
6.7	Bakterien:	21
6.7.1	Hitzeinaktivierung:	22
6.7.2	Infektion:	22
6.8	RNA Isolation:	23
6.9	Transfektionen:.....	23
6.10	Membranvesikel:	24
6.11	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):	25
6.12	Messung des Zelltodes:	25
6.13	Mikroskopische Darstellung der Pyroptosome:	25
6.14	Statistische Auswertung:	26
7	Materialien:	26
7.1	Medien:	26
7.2	Kommerziell erworbene KITS:	27
7.3	Weitere Materialien:	27
8	Ergebnisse:	28

8.1	Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien und bakterielle RNA	28
8.2	Die Rolle von bakteriellen Membranvesikeln in der Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien	33
8.3	Alternative Inflammasomaktivierung durch lebende <i>E. coli</i>	38
8.4	Lebende <i>E. coli</i> , bakterielle RNA und OMV aktivieren das NLRP3-Inflammasom in BlaER-1 Monozyten	43
8.5	Adaptormoleküle oberhalb von NLRP3.....	48
8.5.1	Lebende <i>E. coli</i> aktivieren das NLRP3-Inflammasom unabhängig von STING.	48
8.5.2	Lebende <i>E. coli</i> aktivieren das NLRP3-Inflammasom unabhängig von MAVS.	50
8.5.3	Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende <i>E. coli</i> ist partiell abhängig von TRIF.....	52
8.5.4	Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende <i>E. coli</i> ist partiell abhängig von MyD88.	53
8.6	TLR4 ist anteilig an der Induktion von intrazellulärem pro-IL-1 β durch lebende <i>E. coli</i> beteiligt und essentiell für die OMV-induzierte Inflammasomaktivierung.	55
8.7	Lebende Bakterien aktivieren ein alternatives NLRP3-Inflammasom via TLR8.	57
9	Diskussion:	62
9.1	Zusammenfassung und Einschränkungen der Ergebnisse	62
9.2	Erkennung der Lebendigkeit - Rolle für OMV?	66
9.3	TLR8 als Schlüsselrezeptor für die Erkennung bakterieller Vitalität	67
9.4	TLR8-vermittelte Inflammasomaktivierung	69
9.5	Ist die „alternative“ Inflammasomaktivierung eher die Regel als die Ausnahme?	70
9.6	Limitationen und Ausblick	72
10	Referenzen:	73
11	Eidesstattliche Versicherung	81
12	Lebenslauf	82
13	Publikationsliste	83
14	Danksagung	84

1 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Wichtige endosomale und zytoplasmatische RNA-Rezeptoren der angeborenen Immunität	10
Abbildung 2: Gegenüberstellung von kanonischer und alternativer NLRP3-Inflammasomaktivierung	14
Abbildung 3: Stimulationsexperimente mit primären, humanen Monozyten	17
Abbildung 4: Stimulationsexperimente mit BlaER1-Monozyten	17
Abbildung 5: Robuste Produktion von IL-1 β durch humane Monozyten nach Stimulation mit lebenden Bakterien	29
Abbildung 6: IL-1 β Induktion durch lebende Bakterien ist unabhängig von LPS und TLR4-Stimulation.	31
Abbildung 7: Bakterielle RNA induziert IL-1 β in humanen Monozyten.	32
Abbildung 8: Korrelation zwischen RNA Gehalt der Bakterien bei Infektion und Zytokinproduktion in Monozyten	33
Abbildung 9: OMV induzieren IL-1 β und IL-6 in Monozyten.	34
Abbildung 10: Isolierte RNA aus OMV induziert IL-1 β und IL-6 in primären, humanen Monozyten.	35
Abbildung 11: Reduzierte Induktion von IL-1 β in Anwesenheit von Polymyxin-B (LPS Inhibitor)	36
Abbildung 12: Induktion von IL-1 β durch Membranvesikel von verschiedenen Bakterien	37
Abbildung 13: Ein hypovesikulierender E. coli Stamm induziert weniger IL-1 β als sein Kontrollstamm.	38
Abbildung 14: Nachweis von Pyroptosomen (ASC-Specks) in humanen Monozyten	40
Abbildung 15: Quantifizierung der Pyroptosombildung in Monozyten nach Stimulation mit bakteriellen Stimuli	41
Abbildung 16: Einfluss von Kaliumionen-Efflux auf die Inflammasomaktivierung	42
Abbildung 17: Zelltod und IL-1 β Produktion bei unterschiedlicher MOI	43
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Kontrolle der monozytären Transdifferenzierung	45
Abbildung 19: NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen BlaER1-Monozyten	46
Abbildung 20: NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen BlaER1-Monozyten	47
Abbildung 21: Kontrollbedingungen aus dem Experiment der Abbildung 19 und der Abbildung 20	48
Abbildung 22: STING-unabhängige IL-1 β Produktion in BLaER-1 Zellen nach Stimulation mit lebenden E. coli	49
Abbildung 23: Kontrollbedingungen des Experimentes aus Abbildung 22	50
Abbildung 24: MAVS-unabhängige IL-1 β Produktion in BLaER-1 Zellen nach Stimulation mit lebenden E. coli	51
Abbildung 25: Kontrollbedingungen des Experimentes aus Abbildung 24	51
Abbildung 26: Partielle Rolle für TRIF in der Induktion von IL-1 β durch lebende E. coli	52

Abbildung 27: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 26	53
Abbildung 28: Partielle Abhängigkeit von MyD88 in der Induktion von IL-1 β durch lebende E. coli	54
Abbildung 29: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 28	54
Abbildung 30: Rolle von TLR4 in der Induktion von IL-1 β durch lebende E. coli, OMV und Hitze- getötete E. coli	56
Abbildung 31: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 30	57
Abbildung 32: IL-1 β Produktion nach Stimulation mit lebenden E. coli ist partiell abhängig von TLR8.	58
Abbildung 33: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 32	59
Abbildung 34: Zelltodinduktion von lebenden E. coli ist nicht abhängig von TLR8.	60
Abbildung 35: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 34	61
Abbildung 36: LPS-defiziente E. coli (ClearColi) und ClearColi-RNA induzieren TLR8-abhängig IL-1 β .	62
Abbildung 37: Lebende Bakterien aktivieren ein alternatives NLRP3-Inflammasom via TLR8	64

2 Abkürzungsverzeichnis:

Abkürzung	Englisch	Deutsch
AIM2	absent in melanoma 2	
APC	Antigen presenting cell	Antigenpräsentierende Zelle
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	
BCG Impfstoff (Tuberkulose)	Bacillus Calmette–Guérin vaccine	Bacille Calmette-Guérin Impfstoff
BlaER1	B cell Leukemia C/EBP α ER clone 1	
BS	Bacillus subtilis	Bacillus subtilis
CASP – caspase	cysteine-aspartic proteases	
CC	<i>ClearColi</i>	<i>ClearColi</i>
c-d-AMP	cyclic-di-adenosine monophosphate	Cyclisches di- Adenosinmonophosphat
DAMP	Danger associated molecular pattern	Gefahrassozierte molekulare Muster
DNA	Deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure

<i>EC</i> <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FADD	Fas-associated protein with death domain	
<i>HK</i> <i>HKEC</i>	<i>Heat-killed</i> <i>Heat-killed Escherichia coli</i>	<i>Hitze-getötet</i> <i>Hitze-getötete Escherichia coli</i>
IL (IL-6, IL-1 β)	Interleukin	Interleukin
IFN (- α , - β , - γ)	Interferon	Interferon
LPS	Lipopolysaccharide	Lipopolysachharid
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor	Makrophagenkolonien-stimulierender Faktor
MDA5	melanoma differentiation-associated 5	
MAIT Zellen	Mucosal associated invariant T cells	Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein	
MV	Membrane vesicles	Membranvesikel
moDC	Monocyte-derived dendritic cells	Aus Monozyten differenzierte Dendritische Zellen
MOI	multiplicity of infection	Multiplizität der Infektion
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88	
NEK7	NIMA-related kinase 7	
NETs	Neutrophil Extracellular Traps	neutrophile extrazelluläre Fallen
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	
Nig.	Nigericin	Nigericin
NLR- NLRP1 NLRP3	nucleotide-binding oligomerization domain (NOD), leucine-rich repeat (LRR)-containing protein	
OMV	outer membrane vesicles	Vesikel der äußeren bakteriellen Membran

P3	Pam3CSK4	Pam3CSK4
PBS	phosphate-buffered saline	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells	mononukleare Zellen des peripheren Blutes
PRR	Pattern recognition receptors	Mustererkennungsrezeptoren
PAMP	Pathogen associated molecular pattern	pathogenassoziierte molekulare Muster
RLR	RIG-I-like receptors	RIG-I-like Rezeptoren
RIG-I	retinoic acid-inducible gene I	
RIPK1	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1	
RNA dsRNA ssRNA rRNA mRNA sRNA	Ribonucleic acid doublestrang singlestrang ribosomal messenger short	Ribonukleinsäure Doppelstrang Einzelstrang Ribosomale Boten kurze
STING	Stimulator of interferon genes	
T _{FH}	T follicular helper cells	follikulären T-Helferzellen
TLR	toll-like receptor	Toll-like-Rezeptoren
TNF	tumor necrosis factor	Tumornekrosefaktor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β	
TR	Transfection reagent	Transfektionsreagenz

3 Zusammenfassung:

Das Immunsystem besitzt die herausragende Fähigkeit anhand evolutionär konservierter, pathogen-assoziiertes Muster zwischen körpereigenen und fremden Strukturen zu unterscheiden. Die Detektion von Mikroorganismen löst eine skalierte Immunreaktion aus, die von einer Reihe von Faktoren abhängig ist. Im Falle einer Infektion mit Bakterien spielen dabei unter anderem die Virulenz, die Lokalisation der Infektion als auch die Lebendigkeit der Bakterien eine Rolle. Sander *et al.* konnten 2011 zeigen, dass murine Makrophagen die Vitalität von Bakterien anhand ihrer RNA erkennen und daraufhin das NLRP3-Inflammasom aktivieren. Dieses ist ein zytosolischer Proteinkomplex, welcher eine Reihe von endogenen und exogenen Stimuli erkennt und unter anderem die Vorstufe von IL-1 β in seine aktive Form überführt. Die Mechanismen der Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien in humanen Monozyten sind jedoch unklar.

Wir fanden eine NLRP3-abhängige IL-1 β Produktion, jedoch zeigte die NLRP3-Aktivierung durch lebende *E. coli* in humanen Monozyten keine Merkmale der kanonischen Inflammasomaktivierung, wie Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration, Pyroptose und die Aggregation sogenannter Pyroptosome. Stattdessen ähnelt der Prozess einer kürzlich beschriebenen durch Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) ausgelösten alternativen Inflammasomaktivierung. Wir untersuchten daraufhin die zugrundeliegenden Mechanismen und die involvierten Rezeptor- und Adaptermoleküle. Dazu verwendeten wir neben primären Monozyten die humane BlaER1-Zelllinie, die nach Transdifferenzierung einen monozytären Phänotyp annimmt und in welcher die Existenz des alternativen Inflammasoms zum ersten Mal beschrieben wurde. Wir konnten zeigen, dass die alternative Inflammasomaktivierung durch bakterielle RNA ausgelöst wird. Die Inflammasomaktivierung und IL-1 β Freisetzung durch lebende *E. coli* wird vermittelt durch NLRP3, ASC und Caspase-1. Während die Induktion von IL-1 β durch tote *E. coli* TLR4 benötigte und damit auf das LPS zurückzuführen ist, aktivierten lebende *E. coli* über ihre RNA zusätzlich einen Signalweg über den RNA-Rezeptor TLR8 und das Adaptermolekül MyD88. Diese Befunde stellen erneut die Rolle von TLR8 für die Erkennung von mikrobieller Vitalität heraus. Die Aktivierung von RNA-Rezeptoren wie TLR8 ist somit ein zentraler Mechanismus in der angeborenen Immunantwort gegen lebende Mikroorganismen.

4 Abstract:

The immune system has the outstanding ability to distinguish between endogenous and foreign structures based on evolutionarily conserved pathogen-associated patterns. The detection of microorganisms triggers a scaled immune response that depends on a number of factors. In case of bacterial infection, virulence, localization of the infection as well as bacterial viability play a role among others. In 2011, Sander *et al.* showed that murine macrophages recognize the viability of bacteria by their RNA and subsequently activate the NLRP3 inflammasome. This is a cytosolic protein complex that recognizes a range of endogenous and exogenous stimuli and as a result converts the precursor of IL-1 β into its active form. However, the mechanisms of inflammasome activation by live bacteria in human monocytes remain unclear. We found NLRP3-dependent IL-1 β production, but NLRP3 activation by live *E. coli* in human monocytes did not show features of canonical inflammasome activation, such as dependence on extracellular potassium concentration, pyroptosis, and aggregation of so-called pyroptosomes. Instead, the process resembles a recently described alternative inflammasome activation via Toll-like receptor 4 (TLR4). Consequently, we investigated the underlying mechanisms and the receptor and adaptor molecules involved. For this purpose, in addition to primary monocytes, we used the human BlaER1 cell line, which assumes a monocytic phenotype after transdifferentiation and in which the existence of the alternative inflammasome was described for the first time.

We demonstrated that alternative inflammasome activation is triggered by bacterial RNA. Inflammasome activation and IL-1 β release by live *E. coli* is mediated by NLRP3, ASC, and Caspase-1. Whereas the induction of IL-1 β by heat-killed *E. coli* required TLR4 and was thus due to the LPS, live *E. coli* additionally activated a signaling pathway via the RNA receptor TLR8 and the adaptor molecule MyD88. These findings again highlight the role of TLR8 in the recognition of microbial viability. The activation of RNA receptors such as TLR8 is a central mechanism in the innate immune response against living microorganisms.

5 Einleitung:

5.1 Von der Mustererkennung zur skalierten Immunantwort

Eine fundamentale Aufgabe des Immunsystems ist die Erkennung und Bekämpfung von Infektionserregern. Eine zentrale Frage dabei ist, wie das Immunsystem zwischen fremden und potentiell gefährlichen Erregern und Bestandteilen des eigenen Körpers oder harmlosen Mikroorganismen unterscheidet¹.

Von Charles Janeway stammt die Theorie, dass das angeborene Immunsystem zwischen „körpereigen“ (self) und „fremd“ (non-self) mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors = PRRs) unterscheidet². PRRs erkennen evolutionär konservierte Bestandteile von Mikroorganismen, sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs)³. Ein sehr gut bekanntes PAMP ist das bakterielle Lipopolysachharid (LPS), welches Bestandteil der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien ist und vom Mustererkennungsrezeptor TLR4 erkannt wird⁴.

Polly Matzinger schlug 1994 in der sogenannten „Danger-Theorie“ vor, dass das Immunsystem nicht auf fremde Muster, sondern in erster Linie auf die Detektion von Gefahr spezialisiert sei⁵. Dabei würden dann nicht unbedingt fremde Mikroorganismen direkt erkannt, sondern die Gefahrensignale, die auch aus den Zellen des Wirtes hervorgehen können⁵.

Mit der Identifizierung einer Reihe von Mustererkennungsrezeptoren hat Janeways Theorie viel experimentelle Bestätigung erhalten². Dennoch lassen sich nicht alle Fragen der Infektionsimmunologie mit diesem bestechenden Modell erklären. Offen bleibt unter anderem die Frage, wie das Immunsystem seine Antwort skaliert, je nachdem ob es sich um einen harmlosen Kontakt mit toten oder avirulenten Bakterien handelt oder um eine lebensbedrohliche Sepsis¹.

Vor dem Hintergrund der oben skizzierten Debatte, schlugen Blander und Sander ein Modell mit fünf Checkpoints vor, welches zusätzlich zur Erkennung von Mikroorganismen durch Mustererkennung deren Gefährlichkeit für den Wirt exakt einschätzt und vereinen damit Teile der Theorie von Janeway mit der von Matzinger¹. Erstens sei die Anzahl der präsentierten PAMPs und damit aktivierten Mustererkennungsrezeptoren und die Frage, ob diese gelöst und isoliert oder auf

einem Mikroorganismus präsentiert werden wichtig. Zweitens spiele es eine Rolle, ob die Mikroorganismen tot oder lebendig seien. Drittens sei es entscheidend, ob es sich um pathogene oder nicht pathogene Mikroorganismen handele. Dieses werde durch das Vorhandensein und die Aktivität von Virulenzfaktoren, die unterschiedlich erkannt werden, z.B. auch über sogenannte Gefahrensignale (Danger associated molecular patterns = DAMPs) bestimmt. Viertens müsse das Immunsystem entscheiden, ob es sich um Kommensalen oder um invasive Mikroorganismen handele und fünftens sei die Lokalisation der Infektion (z.B. mukosal oder systemisch) bestimmend für die Immunantwort¹.

5.2 Mikrobielle Lebendigkeit – ein eigener Checkpoint des angeborenen Immunsystems?

Ergebnisse zu diesem Thema wurden kürzlich in einer Übersichtsarbeit von Ugolini und Sander zusammengetragen, auf der die folgende Zusammenfassung beruht⁶. Klinisch ist seit langem bekannt, dass Lebendimpfstoffe eine deutlich robustere Immunantwort erzeugen als Totimpfstoffe und dass beispielsweise im Falle der Mumps-Masern-Röteln Impfung eine einzelne Impfung lebenslangen Schutz vor der Erkrankung erzeugt, während klassische Totimpfstoffe nach definierten Intervallen aufgefrischt werden müssen⁷.

Ausgehend von dieser Überlegung und vorhergehenden Studien, die beispielsweise gezeigt hatten, dass eine Impfung mit getöteten *Listeria monocytogenes* im Gegensatz zur Infektion mit lebenden *Listeria monocytogenes* keine protektiven CD8+ Effektor-T-Zellen induziert⁸, konnten Sander und Kollegen 2011 ausführlich demonstrieren, dass das Immunsystem zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden kann und in Abhängigkeit davon eine unterschiedlich starke Immunantwort auslöst⁹.

Dabei produzierten murine Makrophagen nach Stimulation mit lebenden oder toten *E. coli* die gleichen Mengen an IL-6 und TNF, unterschieden sich jedoch in der Produktion von IFN- β und IL-1 β ⁹. Als dafür verantwortliches Molekül wurde die bakterielle RNA ausgemacht, welche eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und nach dem Tod der Bakterien rasch abgebaut wird⁹.

Sie schlugen den Terminus *vita*-PAMP vor für Moleküle, welche dem Immunsystem Lebendigkeit von Mikroorganismen anzeigen können⁹.

Später wurde gezeigt, dass c-d-AMP, ein bakterieller second Messenger, der in gram-positiven Bakterien vorkommt ebenfalls als vita-PAMP fungieren kann¹⁰. Dieser führt über die Bindung an den zytosolischen Rezeptor STING zur Ausschüttung von Typ 1 Interferonen¹⁰.

Abgesehen von Antigenpräsentierenden Zellen (APC), können auch neutrophile Granulozyten zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden und in Abhängigkeit davon die sogenannten NETs (Neutrophil Extracellular Traps = *neutrophile extrazelluläre Fallen*) bilden¹¹ und Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen (MAIT Zellen) erkennen ein Zwischenprodukt des Vitamin B Stoffwechsels, welches nur in lebenden Bakterien vorkommt¹².

Die Erkennung der mikrobiellen Lebendigkeit durch antigenpräsentierende Zellen hat aber auch Auswirkungen auf adaptive Immunantworten¹³. Ugolini¹³ *et al.* und Barbet¹⁴ *et al.* konnten zeigen, dass die Erkennung von bakterieller RNA aus lebenden Bakterien durch APC zur Differenzierung von folliculären T-Helferzellen (T_{FH}) führt. Diese spielen eine entscheidende Rolle in den Keimzentren der Lymphfollikel, wo sie die Affinitätsreifung von Antikörpern und die Entstehung von Gedächtnis B-Zellen unterstützen¹⁵.

In Zellen von Menschen und Schweinen war dieser Mechanismus abhängig von TLR8¹³. Dieser endosomale Mustererkennungsrezeptor erkennt Degradationsprodukte von RNA¹⁶. Ugolini *et al.* konnten außerdem zeigen, dass die Impfung von Schweinen mit einem lebenden, bakteriellen Salmonellen-Impfstoff im Gegensatz zum selben Hitze-inaktivierten Impfstoff zur vermehrten Differenzierung von folliculären T-Helferzellen und zur Bildung von Antikörpern führte¹³. Außerdem zeigte sich eine höhere protektive Immunität nach Impfung mit dem lebenden Tuberkuloseimpfstoff BCG bei einer Kohorte mit einem TLR8 Polymorphismus, welcher mit erhöhter Rezeptoraktivität assoziiert war¹³.

5.3 Mustererkennungsrezeptoren für mikrobielle RNA

Wie im letzten Absatz beschrieben, ist mikrobielle RNA das bisher am besten untersuchte vita-PAMP. Für die Erkennung dieser in Zellen der angeborenen Immunität sind verschiedene Mustererkennungsrezeptoren verantwortlich, die im Folgenden kurz beschrieben werden und die zunächst vor allem für die Erkennung von Viren bekannt waren¹⁷.

Im Zytosol finden wir unter anderem die Proteine MDA5 und RIG-I, die zu den RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) gehören und das Adapterprotein MAVS benötigen¹⁸.

Während MDA5 Doppelstrang-RNA erkennt, ist RIG-I für die Erkennung von 5'-triphosphat RNA verantwortlich¹⁸. NOD-like Rezeptoren (NLR) und im speziellen das NLRP3-Inflammasom werden weiter unten diskutiert.

Endosomale RNA-Rezeptoren hingegen gehören zur Familie der Toll-like Rezeptoren¹⁸. TLR3 erkennt Doppelstrang-RNA und verwendet im Gegensatz zu den anderen TLRs, die über MyD88 ihre Signale weiterleiten, das Adapterprotein TRIF¹⁸. TLR13 wird in murinen, nicht aber in menschlichen Immunzellen exprimiert und erkennt ribosomale RNA¹⁸. TLR7 und TLR8 schließlich erkennen Degradationsprodukte von Einzelstrang-RNA¹⁸.

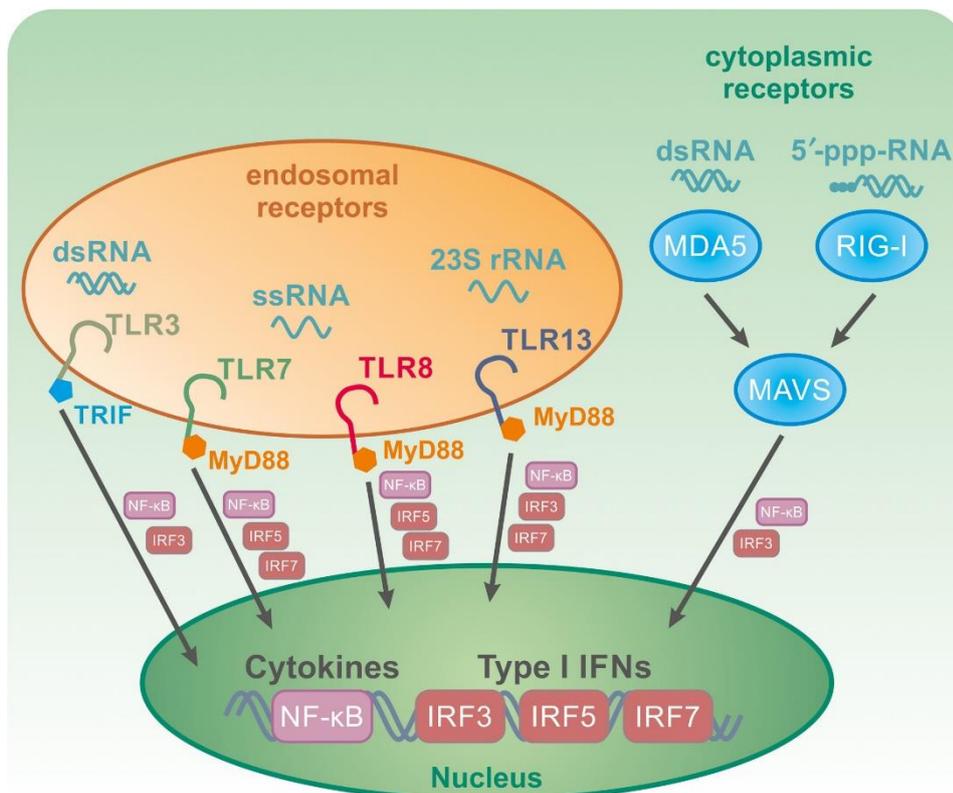


Abbildung 1: Wichtige endosomale und zytosomatische RNA-Rezeptoren der angeborenen Immunität

Abbildung 1 aus der Publikation¹⁸ von Vierbuchen et al., RNA is taking its Toll: Impact of RNA-specific Toll-like receptors on health and disease., Allergy, 2019: Für die Verwendung in dieser Promotion wurde die Erlaubnis des Verlages eingeholt (Lizenznummer: 5044881472398).

Den endosomalen RNA-Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR13 stehen die zytosomatischen RNA-Rezeptoren MDA5 und RIG-I gegenüber. Während erstere mit Ausnahme von TLR3 über das Adapterprotein MyD88 zur Aktivierung von NF-kB führen, sind letztere zur Signalweitergabe auf das Adapterprotein MAVS angewiesen¹⁸. (dsRNA = Doppelstrang-RNA, ssRNA = Einzelstrang-RNA, rRNA = ribosomale RNA, IRF = Interferon regulierender Faktor)

5.4 Vesikel der äußeren Membran (Outer membrane vesicles = OMV) als mögliche Carrier von bakterieller RNA

Wir stellten uns die Frage, wie bakterielle RNA von prädominant extrazellulären Bakterien zytosolische Rezeptoren aktivieren könnte und wollten deshalb die Rolle von OMV genauer beleuchten.

OMV schnüren sich von der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien ab und können Bestandteile aus dem bakteriellen Zytoplasma enthalten¹⁹. Ihnen werden diverse Funktionen zugeschrieben. So können sie beispielsweise Virulenzfaktoren oder Enzyme zum Abbau von Antibiotika enthalten¹⁹. Der Inhalt von OMV kann gegenüber dem Zytoplasma der Bakterien mit bestimmten Molekülen angereichert sein, die zum Transport zwischen den Bakterien vorgesehen sind¹⁹.

Aber dieser Transport findet nicht nur zwischen den Bakterien selber statt, sondern kann auch die Wirtszellen miteinbeziehen¹⁹. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass OMV von *Pseudomonas aeruginosa* bestimmte kurze RNAs (sRNAs) anreichern und ins Zytosol von Wirtszellen transportieren²⁰. Diese stören Funktion und Stabilität von mRNA des Wirtes und sorgen so für eine verminderte Immunantwort des Wirtes²⁰.

5.5 Die Inflammasome – zentrale Schalter der angeborenen Immunität

Im Folgenden wird das Inflammasom als zentraler Schalter der Erkennung von lebenden Bakterien näher beleuchtet⁹.

Inflammasome sind Multiproteinkomplexe, die sich im Zytosol von Zellen der angeborenen Immunität bilden und dort als molekulare Plattformen für pro-inflammatorische Caspasen fungieren²¹. Aktivierte Caspasen spalten Vorläuferformen pro-inflammatorischer Zytokine in deren aktive Form, als prominentestes Beispiel IL-1 β ²². Die Nomenklatur von Inflammasomen richtet sich nach dem Sensorprotein. Neben dem AIM2- und dem Pyrin Inflammasom, bilden die NLR Inflammasome eine größere Familie, zu denen unter anderem das NLRP1B-, das NLRC4/NAIP5- und das NLRP3-Inflammasom gehören²¹.

Das NLRP3-Inflammasom ist sicherlich das am intensivsten untersuchte, aber auch in seiner Funktion komplexeste Inflammasom²¹. Aus Experimenten in murinen

Immunzellen ist zudem bekannt, dass das NLRP3-Inflammasom an der Detektion von vitalen Bakterien beteiligt ist⁹.

Auf molekularer Ebene lässt sich das NLRP3-Inflammasom in seine Bestandteile NLRP3, ASC und Caspase-1 aufteilen²³. Dabei fungiert NLRP3 als der Sensor, ASC als das Adapterprotein und Caspase-1 als das Effektorprotein²³.

NLRP3 ist ein zytosolischer Sensor, der durch eine Vielzahl von exogenen und endogenen Stimuli aktiviert werden kann²³. Es werden verschiedene Aktivierungsmechanismen von NLRP3 unterschieden. Am besten bekannt und studiert ist die sogenannte „kanonische“ NLRP3-Inflammasomaktivierung²³. Diese erfolgt als zweiseitiger Prozess²³. Durch ein Priming Signal über einen Toll-Like-Rezeptor, den TNF-Rezeptor oder den IL-1-Rezeptor kommt es zur Aktivierung von NF- κ B und damit zur vermehrten Transkription und Translation von pro-IL-1 β , pro-IL-18 und NLRP3²³. Die eigentliche Aktivierung von NLRP3 erfolgt über ein zweites Signal. Im Gegensatz den meisten anderen Mustererkennungsrezeptoren erkennt NLRP3 dabei nicht nur ein paar wenige konservierte Strukturen, sondern reagiert auf eine große Anzahl von strukturell sehr diversen Molekülen, welche PAMPs von Viren, Bakterien oder Pilzen oder endogene DAMPs als Folge von Zellschädigung sein können²³. Aktuell geht man davon aus, dass am ehesten zelluläre Stresssignale auf konservierten Signalwegen zusammenlaufen und zu einer NLRP3-Aktivierung führen²³. Hierbei werden verschiedene zugrundeliegende Mechanismen diskutiert. Zu diesen gehören Ausstrom von intrazellulärem Kalium aus der Zelle²⁴ und andere Ionenflüsse, Ruptur der Lysosomen und metabolische und mitochondriale Veränderungen²³. Kürzlich wurde berichtet, dass nach Stimulation durch unterschiedliche Signale ein desintegriertes Trans-Golgi-Netzwerk als Gerüst für NLRP3 fungiert²⁵.

Nach Aktivierung bilden sich NLRP3-Oligomere, welche zusammen mit dem Protein ASC große Proteinkomplexe bilden²³. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass die Kinase NEK7 essentiell an dem Prozess der kanonischen NLRP3-Inflammasomaktivierung beteiligt ist²⁶. ASC bildet einen molekularen Adapter für Caspase-1, welche sich autokatalytisch prozessiert und dadurch aktiviert²³. Die Vorstufen von IL-1 β und IL-18 sind Substrate für die aktive Caspase-1, welche die Pro-Zytokine proteolytisch aktiviert. Bei der sogenannten kanonischen Form der NLRP3-Inflammasomaktivierung bildet sich pro Zelle ein einzelner makromolekularer Proteinkomplex, der ASC-Speck²⁷, der aufgrund der Funktion beim

inflammatorischen Zelltod (=Pyroptose) auch Pyroptosom genannt wird²³. Bei der Pyroptose aktiviert Caspase-1 Gasdermin D²⁸, welches sich in die Zellmembran einbaut, dadurch Poren formt und so zum inflammatorischen Zelltod (Pyroptose) führt. Auf diese Weise vermittelt Gasdermin D auch die Freisetzung von IL-1 β ²⁸. Neben dieser kanonischen NLRP3-Inflammasomaktivierung existiert auch die sogenannte nicht-kanonische NLRP3-Inflammasomaktivierung²⁹. Hierbei wird zytosolisches LPS erkannt²⁹. In murinen Zellen ist dafür Caspase-11 verantwortlich²⁹, in humanen Zellen Caspase-4 oder Caspase-5³⁰. Diese Effektor-Caspasen spalten Gasdermin D, welches nach Einbau in die Zellmembran und Porenbildung zur Pyroptose führt. Der dabei entstehende Kaliumefflux, aktiviert zudem das NLRP3-Inflammasom wie oben bereits beschrieben²³.

Neben der kanonischen und der nicht-kanonischen Inflammasomaktivierung existiert eine dritte Variante der NLRP3-Inflammasomaktivierung³¹. Diese „alternative“ Inflammasomaktivierung benötigt nur einen einzelnen Stimulus zur Aktivierung, führt jedoch im Gegensatz zur kanonischen und nicht-kanonischen Inflammasomaktivierung nicht zum Zelltod³¹. In menschlichen und porcinen Monozyten, aber nicht in Mauszellen, reicht extrazelluläres LPS aus, um dieses alternative NLRP3-Inflammasom zu aktivieren³¹. LPS aktiviert über TLR4 eine intrazelluläre Signalkaskade über TRIF, RIPK1, FADD und Caspase-8, welche durch einen noch nicht vollständig geklärten Mechanismus zur Aktivierung von NLRP3 führt³¹. Interessanterweise kommt es bei dieser sogenannte alternativen NLRP3 Inflammasomaktivierung nicht zum Kaliumefflux³¹. Es bilden sich keine ASC Specks und es kommt auch nicht zur Pyroptose, jedoch werden große Mengen IL-1 β und IL-18 produziert³¹.

Die physiologische Bedeutung, insbesondere der alternativen Inflammasomaktivierungen ist nicht geklärt. Zudem ist unklar, ob neben LPS weitere Stimuli zu einer alternativen Inflammasomaktivierung führen und welche Signalwege dafür verantwortlich sind.

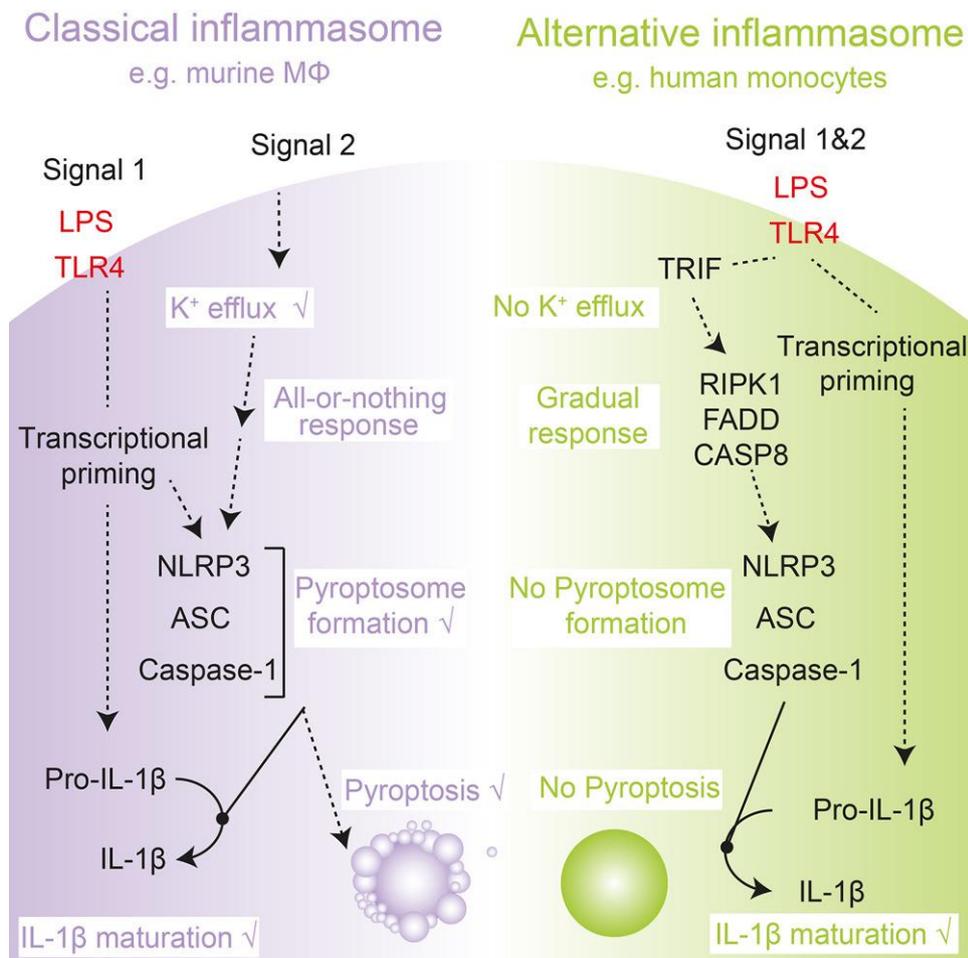


Abbildung 2: Gegenüberstellung von kanonischer und alternativer NLRP3-Inflammasomaktivierung

Abbildung aus der Publikation³¹ von Gaidt et al., Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway, *Immunity*, 2016: Für die Verwendung in dieser Promotion wurde die Erlaubnis von Elsevier eingeholt (Lizenznummer: 5038311076678).

Klassische (=kanonische) Inflammasomaktivierung benötigt ein Priming- und ein Aktivierungssignal. Es kommt zum Kaliumausstrom aus der Zelle und zum inflammatorischen Zelltod (Pyroptose). Demgegenüber ist die alternative Inflammasomaktivierung ein gradueller Prozess, für den ein einzelnes Aktivierungssignal ausreicht.

Die Wirkungen von IL-1β sind vielfältig³². Sie reichen von der Stimulation von Akutphase-Proteinen in der Leber über die Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark bis zur Induktion von Fieber im Hypothalamus, um nur einige prominente Beispiele zu nennen³². IL-1β ist zentral an vielen chronisch oder akut entzündlichen Krankheitsprozessen beteiligt, wie z.B. der bakteriellen Sepsis, der rheumatoiden Arthritis oder der Gicht³³.

Im Kontext von Infektionen mit pathogenen Bakterien wird das NLRP3-Inflammasom häufig durch porenformende Toxine aktiviert³⁴. Im Falle einer Infektion mit

Streptococcus pneumoniae, dem häufigsten Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie und einem wichtigen Auslöser der bakteriellen Meningitis, führt das porenbildende Exotoxin Pneumolysin zur NLRP3 Aktivierung³⁵. In einem Mausmodell der Lungenentzündung konnte hierbei gezeigt werden, dass NLRP3 protektiv wirkt³⁵. Abgesehen von seiner Rolle bei Infektionen, spielt NLRP3 auch bei sterilen, inflammatorischen Erkrankungen eine wichtige Rolle³³. Aktivierende Mutationen im NLRP3 Gen führen zum sogenannten Cryopyrin-assoziierten periodischen Syndrom, einer Gruppe von drei monogenetischen, autoinflammatorischen Erkrankungen^{23, 36}. Außerdem spielt NLRP3 eine Rolle in der Pathogenese von vielen multifaktoriellen Erkrankungen, wie beispielsweise Typ 2 Diabetes, Gicht, Atherosklerose oder Multiple Sklerose³⁷.

5.6 NLRP3-Inflammasomaktivierung durch Erkennung von bakterieller Vitalität

Die Forschung zur Wirkweise und Signalkaskaden der Inflammasomaktivierung basiert zu einem großen Teil auf Mausmodellen oder murinen Zellsystemen²³. Auch die Arbeit in der Sander *et al.* zeigen konnten, dass Zellen der angeborenen Immunität bakterielle Lebendigkeit anhand prokaryotischer RNA erkennen können und daraufhin das NLRP3 Inflammasom aktivieren, stützt sich auf Experimente mit Mäusen und Mauszellen⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Detektion lebender Bakterien und die Mechanismen der Inflammasomaktivierung in humanen Monozyten untersucht. In der Dissertation von Elisa Helbig konnte gezeigt werden, dass auch humane Monozyten, humane dendritische Zellen und humane Alveolarmakrophagen bakterielle Vitalität erkennen und auf die Detektion von lebenden *E. coli* mit einer starken Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und der Produktion von IL-1 β reagieren³⁸. Das in dieser und vorherigen Arbeiten eingesetzte Modellbakterium *E. coli* K12 DH5 α besitzt keine bekannten Virulenzfaktoren, wie z.B. Exotoxine, die zu einer kanonischen NLRP3-Inflammasomaktivierung führen⁹.

Die Mechanismen der NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende, apathogene Bakterien oder durch bakterielle RNA in humanen Monozyten waren bislang unklar.

Ebenso war ungeklärt, ob dies ein generelles Phänomen ist und speziesübergreifend für alle Bakterien zutrifft.

Dafür untersucht wird folgende Hypothesen:

1. Lebende, im Gegensatz zu toten Bakterien aktivieren das NLRP3-Inflammasom in humanen Monozyten.
2. Bakterielle RNA ist für die NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen Monozyten durch lebende *E. coli* verantwortlich.
3. Vesikel der äußeren Membran (Outer membrane vesicles=OMV) schnüren sich von der äußeren Membran der *E. coli* ab und transportieren bakterielle RNA ins Zytosol der Monozyten, woraufhin diese das NLRP3-Inflammasom aktiviert.

Daraus ergaben sich folgende weitere Forschungsfragen:

1. Führen lebende *E. coli*, bakterielle RNA und OMV zu einer kanonischen, nicht-kanonischen oder alternativen NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen Monozyten?
2. Welche Rezeptoren und Adaptermoleküle sind notwendig, damit das NLRP3-Inflammasom in humanen Monozyten nach Infektion mit lebenden *E. coli* oder Stimulation mit OMV aktiviert wird?

6 Methoden:

6.1 Allgemeiner Experimentaufbau:

Primäre, humane Monozyten wurden aus Buffy Coats oder Leukapharesefiltern von gesunden Blutspendern isoliert. Humane Monozyten wurden *in vitro* mit Bakterien infiziert oder mit verschiedenen Bakterienbestandteilen stimuliert. Die Experimente wurden in der Regel nach 18 Stunden gestoppt und die Zellantwort gemessen, meistens mittels Zytokinmessung aus den Überständen.

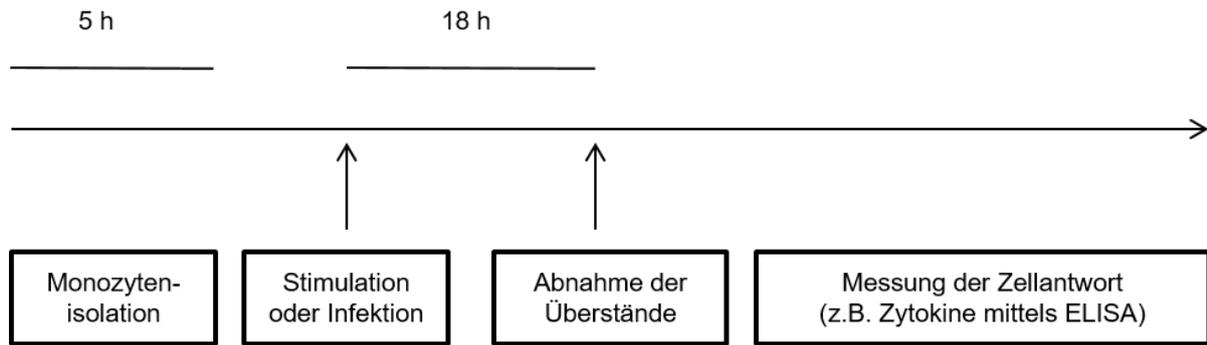


Abbildung 3: Stimulationsexperimente mit primären, humanen Monozyten

Da genetische Modifizierung primärer, humaner Monozyten schwierig ist, verwendeten wir als Modell die BlaER1 Zelllinie^{39, 40}. Hierbei handelt es sich um eine B-Zelllinie, die durch transgene Expression von C/EBP α in Kultur mit IL-3, M-CSF und Estradiol in einen monozytären Phänotyp transdifferenziert werden kann. Tim Vierbuchen erzeugte stabile Knock-out Klone der BlaER1-Zelllinie für verschiedene relevante Gene des angeborenen Immunsystems. Nach der Transdifferenzierung stimulierten oder infizierten wir die BlaER1-Zellen genau wie die primären, humanen Monozyten und werteten die Experimente mittels ELISA aus.

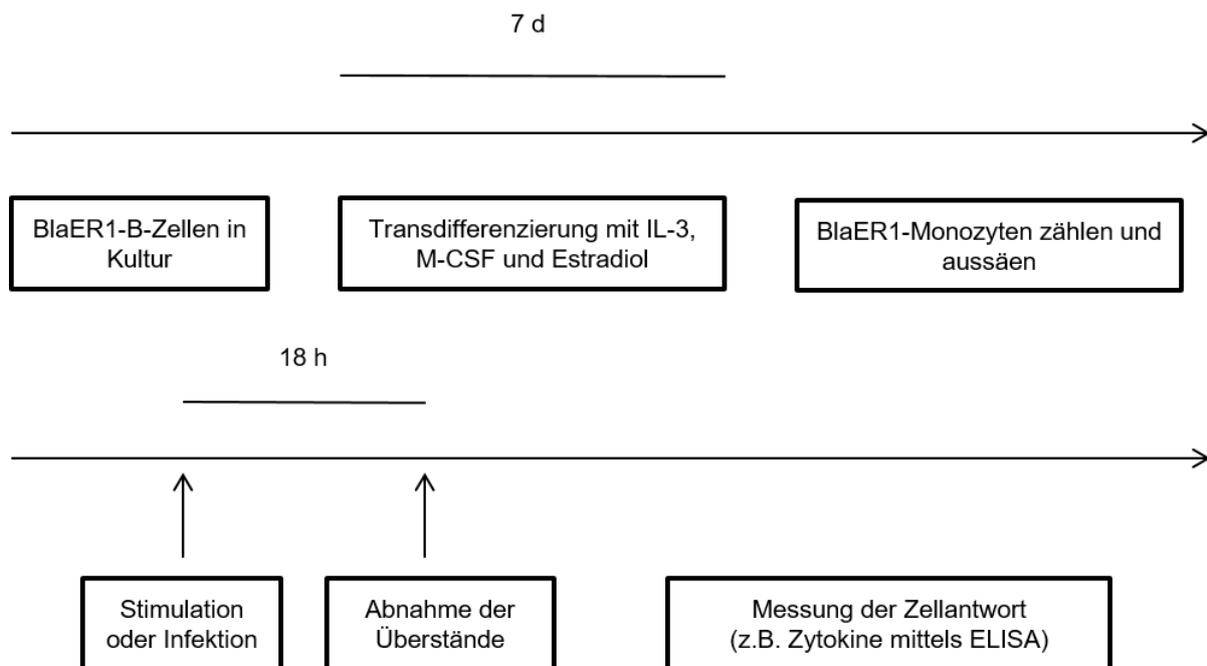


Abbildung 4: Stimulationsexperimente mit BlaER1-Monozyten

6.2 Isolation von primären, humanen Monozyten:

Primäre, humane CD14⁺CD16⁻ Monozyten isolierten wir aus Buffy-Coats oder aus Leukozytapharesefiltern, die als Nebenprodukt der Blutspende gewonnen und als Forschungspräparate kommerziell bezogen wurden.

Zuerst wurden mononukleare Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert. Die Zellen der Buffy-Coats oder Leukozytapharesefiltern wurden mit komplettem RPMI Medium ausgewaschen und bei 800 g für 25 Minuten über der Trennlösung Pancoll zentrifugiert. Durch ihre spezifische Dichte von 1.077 g/ml trennt sie Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen, die durch die Lösung wandern und mononukleare Zellen des peripheren Blutes, die als Film auf der Trennlösung verbleiben. Dieser Film von PBMC wurde anschließend abgetrennt, in PBS aufgenommen und durch mehrfache Zentrifugationsschritte (300-120 g, 10 min) mit PBS gewaschen, um verbleibende Thrombozyten zu entfernen.

Die Isolation der Monozyten erfolgte mithilfe einer immunomagnetischen Negativselektion mit dem EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit, streng nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei werden die Zellen, die keine CD14⁺CD16⁻ Monozyten sind mit einem tetrameren Antikörper-Komplex markiert, der ebenfalls an danach hinzuzufügende magnetische Partikel bindet. Mithilfe eines Magneten werden so die nicht gewünschten Zellen gebunden und die Monozyten können in ein neues Röhrchen eluiert werden.

Die so isolierten, primären, humanen Monozyten wurden in kompletten RPMI Medium aufgenommen und auf 96-Well-Platten aufgeteilt, 10⁶ Zellen/ml, 100 µl/Well. Davor wurden die Zellen mithilfe einer Zählkammer mikroskopisch oder mit dem Durchflusszytometer BD Accuri C6 gezählt. Vor der Stimulation wurden die Monozyten in der Regel eine Stunde im Inkubator belassen.

6.3 BlaER1 Zelllinie:

Als Modell für humane Monozyten verwendeten wir die BlaER1 Zelllinie^{39, 40}. Diese wurde uns freundlicherweise von Tim Vierbuchen und Prof. Dr. Holger Heine (Forschungszentrum Borstel) zur Verfügung gestellt. Die BlaER1 Zelllinie ist ein neues Modell für humane Monozyten und wurde von Rapino *et al.* eingeführt⁴⁰. Sie wurde aus der RCH-ACV Zelllinie durch Einbringen des Transkriptionsfaktor C/EBPα

erzeugt. Dieser wurde an den Estradiolrezeptor und GFP gekoppelt und mithilfe eines Retrovirus in die Zellen eingebracht. GFP positive Zellen wurden durchflusszytometrisch einzeln sortiert. BlaER1 steht dabei für Klon 1 der B-Zell Leukämie C/EBP α ER Zelllinie. Interessanterweise kann die Expression von C/EBP α einige, und speziell diese B-Zelllinie zur Transdifferenzierung zu Monozyten-ähnlichen Zellen anregen. Transdifferenzierte BlaER1-Zellen, hiernach „BlaER1-Monozyten“, beginnen zu phagozytieren, hören auf sich weiter zu teilen und werden adhärent in der Zellkulturplatte. Außerdem ähnelt ihr Transkriptom dem primärer Monozyten, klassische B-Zell-Marker wie CD19 werden herunterreguliert und monozytäre Marker werden hochreguliert^{39, 40}.

Für unsere Zwecke von besonderer Bedeutung ist auch, dass die klassische durch LPS + Nigericin ausgelöste, wie auch die alternative durch LPS allein ausgelöste Inflammation in BlaER1-Monozyten zu beobachten ist³¹. Damit kommen sie den primären, humanen Monozyten deutlich näher, als andere Modelle für primäre, humane Monozyten, wie beispielsweise THP-1 Zellen³¹.

6.4 Herstellung der verschiedenen BlaER1 Knock-out Klone:

Tim Vierbuchen erzeugte für verschiedene einzelne Gene stabile Knockout Klone der BlaER1 Zelllinie mithilfe von CRISPR/Cas9 und teilte sie freundlicherweise mit uns. Sein genaues Verfahren ist hier beschrieben⁴¹.

Er designte für die einzelnen Gene spezifische gRNA. Diese wurden in ein Plasmid geklont, welches ebenfalls Gensequenzen von Cas9 und BFP enthielt. Mittels Nukleofektion wurde das Plasmid in BlaER1-Zellen eingebracht und einzelne BFP⁺ Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie sortiert und klonal expandiert. Die Kontrolle des Genknockout in klonal expandierten Zelllinien erfolgte mittels PCR und Amplicon Sequenzierung auf DNA-Ebene, sowie mittels Westernblot auf Protein- oder mittels ELISA auf funktioneller Ebene.

6.5 Zellkultur und Transdifferenzierung von BlaER1 Zellen:

BlaER-1 Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert, hiernach „BlaER1 Medium“.

Die Transdifferenzierung der BlaER-1 B-Zellen in BlaER-1 Monozyten erfolgte über eine Woche in 6-Well-Platten, 3 ml Medium/Well, $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well. Das Medium für die Transdifferenzierung enthielt außerdem 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml M-CSF und 100 nM β -Estradiol. Die Hälfte des Mediums wurde an Tag zwei und Tag fünf gewechselt. Mit zunehmender Transdifferenzierung der Zellen begannen diese an der Zellkulturplatte zu haften und teilten sich nicht weiter. Am Tag des Experimentes wurden die adhärennten Zellen mit PBS abgelöst, gezählt und zur Stimulation in 96-Well-Platten aufgeteilt, 10^6 Zellen/ml, 100 μ l/Well. Zur Kontrolle der Transdifferenzierung bestimmten wir CD14, CD11b und CD19 mittels FACS (BD Accuri C6).

6.6 Stimulation:

Die Stimulation der Monozyten erfolgte in 96-Well-Platten in Duplikaten für 18 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂.

Abkürzung	Stimulus	Funktion
LPS	Lipopolysaccharid	Alternative Inflammasomaktivierung über TLR4 und TRIF ³¹
LPS + Nig.	Lipopolysaccharid + Nigericin	Klassische Inflammasomaktivierung ²³
P3	Pam3CSK4	TLR1/TLR2 Agonist ⁴²
P3 + Nig.	Pam3CSK4 + Nigericin	Klassische Inflammasomaktivierung ohne TLR4
CL075	CL075	TLR7/8 Agonist, Inflammasomaktivierung über TLR8 ⁴¹
Transf. LPS	Transfiziertes Lipopolysaccharid	Nicht-kanonische Inflammasomaktivierung über Caspase-4 ⁴³
Transf. DNA	Transfizierte Desoxyribonukleinsäure	Aktiviert cGAS-STING abhängiges DNA-Inflammasom ⁴⁴
Transf. Poly I:C	Transfiziertes Polyinosinic:polycytidylic acid	Zytosolisches Poly I:C aktiviert das Inflammasom über MAVS ⁴⁵ .

Stimulus	Konzentration	
	Primäre, humane Monozyten	BlaER1-Monozyten
<i>E. coli</i> RNA	10 µg/ml	10 µg/ml
<i>ClearColi</i> RNA		2,39 µg/ml
OMV	1 µg/ml	5 µg/ml
Pam3CSK4	2 µg/ml	10 µg/ml
CL075		1 µg/ml
LPS	100 ng/ml	100 ng/ml
Nigericin	6,5 µM	6,5 µM
Transfiziertes LPS		1 µg/ml
Transfizierte DNA		10 µg/ml
Transfiziertes Poly I:C		2 µg/ml

Kombinierte Stimuli:	Protokoll:
LPS + Nigericin	LPS alleine für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Nigericin
Pam3 + Nigericin	Pam3 alleine für 4 Stunden, dann Hinzugabe von Nigericin
Pam3 + CC	Pam3 alleine für 4 Stunden, dann Infektion mit <i>ClearColi</i>

6.7 Bakterien:

Mit *E. coli* ist in der Regel das Bakterium *Escherichia coli* K12, DH5α gemeint. Nur in dem Experiment aus **Abbildung 13**, in dem die *E. coli* mit unterschiedlich ausgeprägter OMV Produktion verglichen wurden und dem Experiment aus **Abbildung 17**, sind die weiteren unten genannten *E. coli* verwendet worden.

Weitere verwendete Bakterien befinden sich ebenfalls in der folgenden Tabelle.

Bakterium:	Zusatzinformationen:
<i>Escherichia coli</i> K12, DH5 α	Invitrogen
<i>Salmonella typhimurium</i>	IDT Biologika „Salmoporc“
ClearColi® BL21(DE3)	Lucigen – 60810-1
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC - 29213
<i>Listeria innocua</i> CLIP 11262 (Serovar 6a) ⁴⁶	von Dr. Mobarak Mraheil aus Gießen
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e (Serovar 1/2a) ⁴⁶	von Dr. Mobarak Mraheil aus Gießen
<i>Escherichia coli</i> DH10 β	Normale OMV Produktion – von Dr. Mobarak Mraheil aus Gießen
<i>Escherichia coli</i> DH10 β + unpublizierte genetische Veränderung	Hohe OMV Produktion – von Dr. Mobarak Mraheil aus Gießen
<i>Escherichia coli</i> H16	niedrige OMV Produktion - von Dr. Mobarak Mraheil aus Gießen

6.7.1 Hitzeinaktivierung:

Die Bakterien wurden über Nacht in ihrem entsprechenden Medium kultiviert. Es erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Daraufhin wurden sie für 90 Minuten bei 60°C im Wasserbad inaktiviert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde 30% steriles Glycerol hinzugefügt und die Hitze-getöteten Bakterien bei -80°C gelagert bis zur Durchführung des Experimentes.

6.7.2 Infektion:

Die Bakterien wurden in LB-Medium kultiviert bis sie ihre mittlere logarithmische Wachstumsphase erreichten. Sofern auch Hitze-getötete Bakterien verwendet wurden, wurden diese aufgetaut, und die folgenden Schritte erfolgten parallel für Hitze-getötete und lebende Bakterien. Die Bakterien wurden drei Mal mittels Zentrifugation (4000 g, 6 min) mit PBS gewaschen und in PBS aufgenommen. Die Konzentration der Bakterien wurde photometrisch bestimmt und mithilfe einer Wachstumskurve auf die Kolonie-bildenden Einheiten (CFU) umgerechnet. Auf 10⁵ Zellen wurden 10⁵ oder 10⁶ Bakterien in jedes einzelne Well gegeben (MOI 1 oder

MOI 10). Es erfolgte eine kurze Zentrifugation der gesamten Zellkulturplatte (1180 g, 1 min). Daraufhin wurde die Zellkulturplatte zurück in den Inkubator (37°C und 5 % CO₂) gestellt.

Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von Antibiotika (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml). Im Experiment mit den *E. coli* Stämmen mit unterschiedlich hoher Produktion von OMV wurde die Infektion bereits nach 30 Minuten durch Zugabe von Gentamycin (50 µg/ml) gestoppt. Die Abnahme der Überstände erfolgte 18 Stunden nach Infektion.

6.8 RNA Isolation:

Die Isolation bakterieller RNA erfolgte mittels dem E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit (Omega biotek), streng nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Bakterien wurden kultiviert bis sie die mittlere logarithmische Wachstumsphase erreichten. Zur Eröffnung der Bakterien erfolgte ein enzymatischer Abbau der Bakterienwand mittels Lysozym und mechanischer Stress durch Schütteln in Anwesenheit von kleinen Beads. RNasen wurden deaktiviert durch einen Puffer, der β-Mercaptoethanol enthielt. Die RNA wurde mittels kleiner Säulen aus der Lösung isoliert und anschließend in Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels NanoDrop 2000.

6.9 Transfektionen:

Für die Transfektion verwendeten wir Transfektionsreagenzien und orientierten uns an den Protokollen der Hersteller.

In allen Experimenten wurde die RNA transfiziert und nicht ohne Transfektionsreagenz auf die Zellen gegeben. LPS wurde in der Regel nicht transfiziert, außer in den speziell gekennzeichneten Versuchen mit den CASPASE-4^{-/-} BlaER1-Zellen.

Für die gesamte *E. coli* RNA verwendeten wir Viomer Red. Pro 10⁵ Monozyten ließen wir 0,2 µl Viomer Red und 10 µl von bakterieller RNA in Nuklease-freiem Wasser mit einer Konzentration von 100 ng/µl für 15 Minuten bei Raumtemperatur

komplexieren. Daraufhin wurden die Zellen mit einer finalen RNA-Konzentration von 10 µg/ml stimuliert.

Für die Transfektion von *ClearColi* RNA in die BlaER1-Monozyten verwendeten wir Poly-L-Arginine (pLa). Das Protokoll stammt dabei aus dieser Veröffentlichung⁴⁷. 280 ng pLa ließen wir mit 239 ng RNA für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Nuklease-freiem Wasser komplexieren. Daraufhin wurden die Zellen mit einer finalen RNA-Konzentration von 2,39 µg/ml stimuliert.

LPS wurde wie folgt transfiziert. 5 µl Fugene wurden mit 5 µl einer 100 µg/ml LPS in Wasser Lösung in 40 µl Opti-Mem Medium aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Daraufhin wurden 10 µl/Well von diesem Ansatz zu den Zellen gegeben.

Für die DNA Transfektion wurden die Zellen 4 Stunden mit Pam3CSK4 vorstimuliert. Pro Well, also 10^5 Zellen, wurde 1 µg Herring-DNA zusammen mit 0,4 µl Lipofectamine 2000 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 10 µg/ml.

Poly I:C wurde wie folgt transfiziert. Pro Well, wurden 200 ng Poly I:C mit 0,4 µl Lipofectamine 2000 für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Opti-Mem Medium inkubiert und dann zu den Zellen gegeben.

6.10 Membranvesikel:

Die Membranvesikel wurden uns von PD Dr. Mobarak Abu Mraheil (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) zugeschickt. Das genaue Protokoll der Isolation ist hier beschrieben⁴⁸.

Die Bakterien wurden kultiviert bis sie ihre mittlere logarithmische Wachstumsphase erreichten. Die Kultur wurde zentrifugiert, um Bakterien von Überständen zu trennen. Die Überstände wurden abgenommen und mit einer Porengröße von 0,22 µm filtriert, um verbleibende Bakterien in den Überständen zu entfernen. Die Überstände wurden danach mehrfach ultrazentrifugiert, um die Membranvesikelfraktion zu isolieren.

Diese wurde in PBS aufgenommen und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt. Die Proteinkonzentration benutzten wir als Proxy für die Menge der Membranvesikel.

6.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA):

Die Zytokine IL-1 β und IL-6 wurden aus den Überständen der durchgeführten Experimente mittels ELISA bestimmt. Dabei hielten wir uns streng an das Protokoll des Herstellers.

6.12 Messung des Zelltodes:

Die Messung des Zelltodes erfolgte mithilfe des ToxiLight non-Destructive Cytotoxicity Bio Assay Kit von Lonza. Dabei hielten wir uns streng an das Protokoll des Herstellers. Das Kit basiert auf einer Freisetzung von Adenylat-Kinase in den Überstand, sofern Zellen sterben. Das Enzym phosphoryliert ADP zu ATP. Das ATP wird daraufhin mithilfe der Luciferasereaktion zu AMP umgesetzt und das dabei emittierte Licht gemessen. Anhand der gemessenen relativen Lichteinheiten kann auf den Zelltod zurückgeschlossen werden. In der Regel wurde durch Lyse der Zellen in einer Bedingung der maximale Zelltod bestimmt und die relativen Lichteinheiten darauf bezogen.

6.13 Mikroskopische Darstellung der Pyroptosome:

Als ein Kriterium für die Unterscheidung zwischen kanonischer und alternativer Inflammasomaktivierung gilt die Ausbildung von Pyroptosomen⁴⁹. Das Pyroptosom ist ein großer, intrazellulärer Komplex aus ASC Molekülen⁵⁰.

Primäre, humane Monozyten wurden in 8-Well-Ibidi-Objektträger ausgesät, $2 \cdot 10^5$ Zellen/Well, 200 μ l/Well komplettes RPMI Medium. Die Stimulation der Monozyten erfolgte in den 8-Well-Ibidi-Objektträgern. Nach 18 Stunden wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden fixiert und permeabilisiert. Der Zellkern wurde mit Dapi gefärbt, die Pyroptosome mit dem primären Antikörper Anti-ASC (TMS-1), Biolegend, 653902. Für die mikroskopische Darstellung wurde ein LSM 780 von ZEISS verwendet mit dem Plan-Apochromat 63x/1.40 Öl-Objektiv. Die Zellen in 16 mikroskopischen Feldern wurden gezählt, im Schnitt ca. 100 Zellen/Bedingung. Bei jeder Zelle wurde entschieden, ob sie ein Pyroptosom ausgebildet hat oder ob ASC diffus über die ganze Zelle verteilt vorlag. Die Färbung und die Erzeugung der

mikroskopischen Bilder hat Dr. Maren Mieth aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Hocke (Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charite – Universitätsmedizin Berlin) durchgeführt. Die Durchführung der Experimente bis zum Fixieren der Zellen und das Durchzählen der Zellen erfolgte durch den Autor dieser Dissertation.

6.14 Statistische Auswertung:

Bildliche Darstellung und statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism, Version 6.00. Die durchgeführten statistischen Tests sind in den Abbildungen angegeben. Aufgrund von Unsicherheit über die zugrundeliegende Verteilung der Daten wurden in der Regel nicht-parametrische statistische Tests ausgewählt. Sofern es sich um gepaarte Daten handelte, wurden statistische Tests ausgewählt, die diese Tatsache berücksichtigen. In den BlaER1-Experimenten, in denen sowohl verschiedene Gene, als auch verschiedene Stimuli gleichzeitig untersucht wurden, erfolgte die statistische Analyse mithilfe einer Zweiweg-Varianzanalyse gefolgt von einem Post-Hoc-Test.

Wenn in einem Experiment mehrere Gruppen untereinander verglichen wurden, erfolgten Post-Hoc-Tests für Mehrfaches Testen. Dabei wurden immer nur die Gruppen untereinander verglichen, die unserer Fragestellung entsprachen. Die Kontrollbedingungen wurden dabei in der Regel nicht in die statistische Analyse mit einbezogen. Die Signifikanzniveaus dieser Unterschiede sind in den Abbildungen dargestellt. Aufgrund der kleinen Stichprobengrößen, die in der Regel $n=4-6$ betragen, ist die statistische Auswertung mit Vorsicht zu genießen. Aussagen haben wir immer versucht mit verschiedenen Experimentdesigns zu belegen, um mehr Sicherheit zu gewinnen.

7 Materialien:

7.1 Medien:

BlaER1 Medium (Kultivierung)	RPMI 1640 10 % Hitze-inaktiviertes FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
BlaER1 Medium (Transdifferenzierung)	RPMI 1640 10 % Hitze-inaktiviertes FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 10 ng/ml IL-3 10 ng/ml M-CSF 100 nM β -Estradiol
Komplettes RPMI Medium	RPMI 1640 10 % Hitze-inaktiviertes FCS 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren 1 % HEPES 1 % Glutamin +/- 1 % Penicillin/Streptomycin
Luria Bertani (LB) Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid 1 l destilliertes Wasser

7.2 Kommerziell erworbene KITS:

Name	Firma	Katalognummer
EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit	StemCell Technologies	19359
E.Z.N.A.® Bacterial RNA Kit	Omega Biotek	R6950-01
Humanes IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	88-7261-77
Humanes IL-6 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience	88-7066-77
ToxiLight non-Destructive Cytotoxicity Bio Assay Kit + Corning® 96 well NBS™ Microplate	Lonza Sigma	LT07-117 CLS3995-25EA

7.3 Weitere Materialien:

Name	Firma	Katalognummer
Anti-CD11b-PE	Biolegend	101207
Anti-CD19-PerCP	Biolegend	302228
Anti-CD14-APC	BD Biosciences	555399
CL075	Invivogen	tlrl-c75
Deoxyribonucleic acid	SIGMA	D6898-250MG

sodium salt from herring testes		
Estradiol	Sigma	E8875-250MG
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega	E2311
Gentamycin	ThermoFischer	15750060
Gibco® GlutaMAX™	ThermoFischer	35050-038
HEPES Buffer 1M	Sigma	H0887
lipofectamine 2000	thermofischer	11668027
LPS - ultrapure	Invivogen	tIrl-smlps
MPLA	Invivogen	tIrl-mpls
Nicht-essentielle Aminosäuren	Sigma	M7145-100ML
Nigericin	Sigma	N7143-5MG
Opti-MEM® I Reduced Serum Medium	Life technologies	31985-062
Pam3CSK4	Invivogen	tIrl-pms
Pancoll	Panbiotech	P04-60500
Penicillin-Streptomycin	Sigma	P4333-100ML
Poly-L-Arginine HCL MOL WT 15000-70000 (pLA)	Sigma	P7762
Poly(I:C)	Invivogen	TIrl-pic
Potassium chloride	Sigma	P9333-500G
Rekombinantes, humanes IL-3	Biologend	200-03
Rekombinantes, humanes M-CSF	Peptotech	300-25
Viromer® RED	Lipocalyx	VR-01LB-01
Viromer BLUE	Lipocalyx	VB-01LB-01

8 Ergebnisse:

8.1 Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien und bakterielle RNA

Es ist bekannt, dass Immunzellen aus Mäusen lebende Bakterien von toten unterscheiden⁹. Unsere Arbeitsgruppe hat zudem bereits gezeigt, dass menschliche Immunzellen zwischen lebenden und toten Bakterien unterscheiden können, und dass sich das Muster der gebildeten Zytokine von Monozyten nach Stimulation mit lebenden oder toten Bakterien unterscheidet, unter anderem in der Produktion von

IL-12, TNF und IL-1 β ¹³. Wie Elisa Helbig in ihrer Dissertation zeigen konnte, findet sich dieses Phänomen nicht nur in Monozyten, sondern auch in aus Monozyten differenzierten Dendritische Zellen (moDC) und Alveolarmakrophagen³⁸.

Um die bereits publizierten Befunde zu *E. coli* und *Bacillus subtilis* auf weitere Bakterienspezies zu erweitern, stimulierten wir primäre, humane Monozyten mit den folgenden lebenden oder toten Bakterien: *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* und *Enterococcus faecalis*. Auch wenn statistisch nicht in allen Fällen signifikant, bestätigte sich, dass eine robuste Induktion von IL-1 β nur nach Stimulation mit lebenden Bakterien beobachtet wurde (**Abbildung 5**). IL-6 verwenden wir im Folgenden als interne Kontrolle. Bei diesem Zytokin war der Effekt weniger stark ausgeprägt, zumal auch mit toten Bakterien sehr hohe Werte für IL-6, d.h. >10ng/ml, gemessen wurden (**Abbildung 5**).

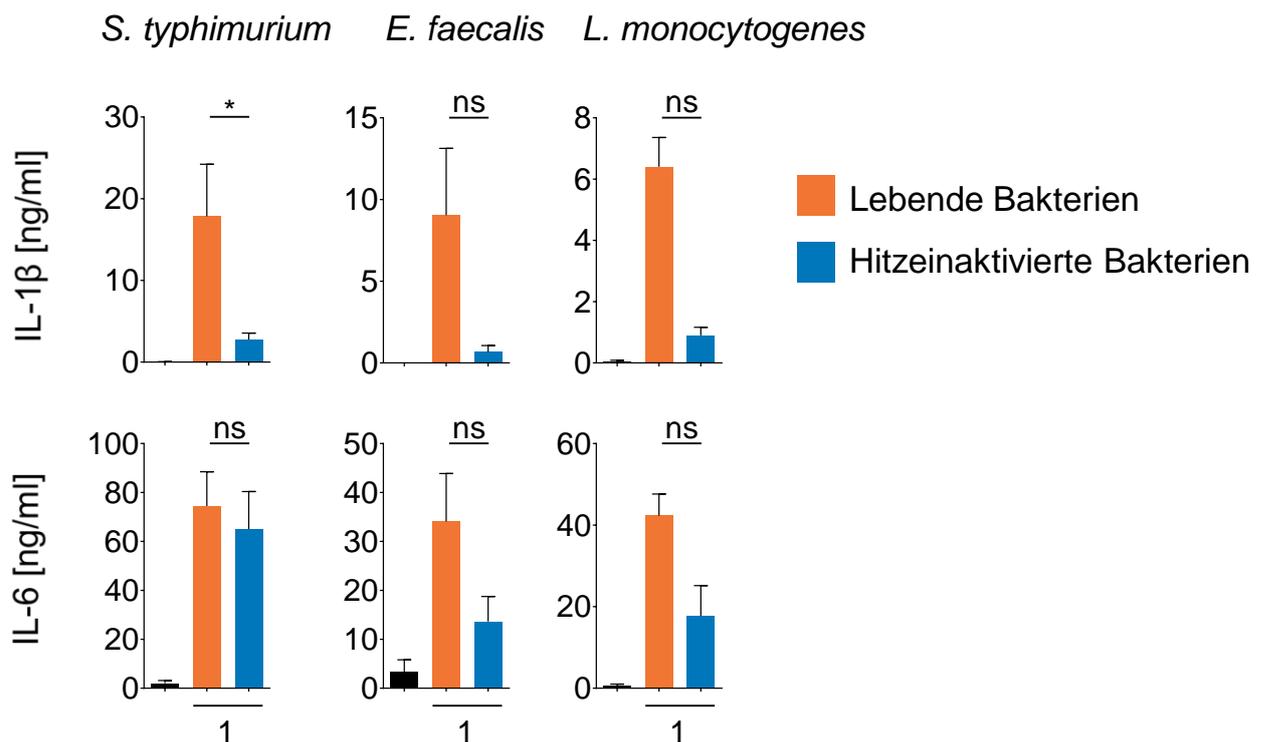


Abbildung 5: Robuste Produktion von IL-1 β durch humane Monozyten nach Stimulation mit lebenden Bakterien

Primäre, humane Monozyten wurden mit lebenden (orange) oder getöteten (blau) *Salmonella typhimurium* (n=6), *Listeria monocytogenes* (n=4) oder *Enterococcus faecalis* (n=4) infiziert (MOI=1). Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. (ns; nicht signifikant, *; p<0.05).

Da LPS als Stimulus für IL-1 β in humanen Monozyten bekannt ist³¹, verwendeten wir zum Vergleich genetisch modifizierte *E. coli* Bakterien, die kein funktionelles LPS bilden (sogenannte *ClearColi*)⁵¹. Sie bilden ein LPS mit nur vier anstatt der normalerweise sechs Acylketten, sogenanntes Lipid IV_a⁵¹, welches nicht mehr zur Aktivierung von TLR4 führt⁵¹.

Trotz der defekten LPS-Produktion und damit fehlender TLR4-Stimulation, konnten lebende *ClearColi* weiterhin IL-1 β induzieren (**Abbildung 6**). Somit scheint funktionelles LPS nicht essentiell für die Induktion von IL-1 β durch lebende, avirulente Bakterien zu sein. Im Gegensatz zu den anderen Hitze-inaktivierten Bakterien, induzierten Hitze-inaktivierte *ClearColi* kaum messbares IL-1 β (**Abbildung 6**). Um ein stärkeres „priming“ zu erreichen, wurden Monozyten mit dem TLR1/TLR2 Agonist Pam3CSK4 vorstimuliert. Dadurch konnte die Induktion von IL-1 β deutlich gesteigert werden (**Abbildung 6**). Zelltodbestimmung durch Messung der Adenylat-Kinase-Freisetzung zeigte keine Erhöhung des Zelltods durch Stimulation mit *ClearColi* (**Abbildung 6**).

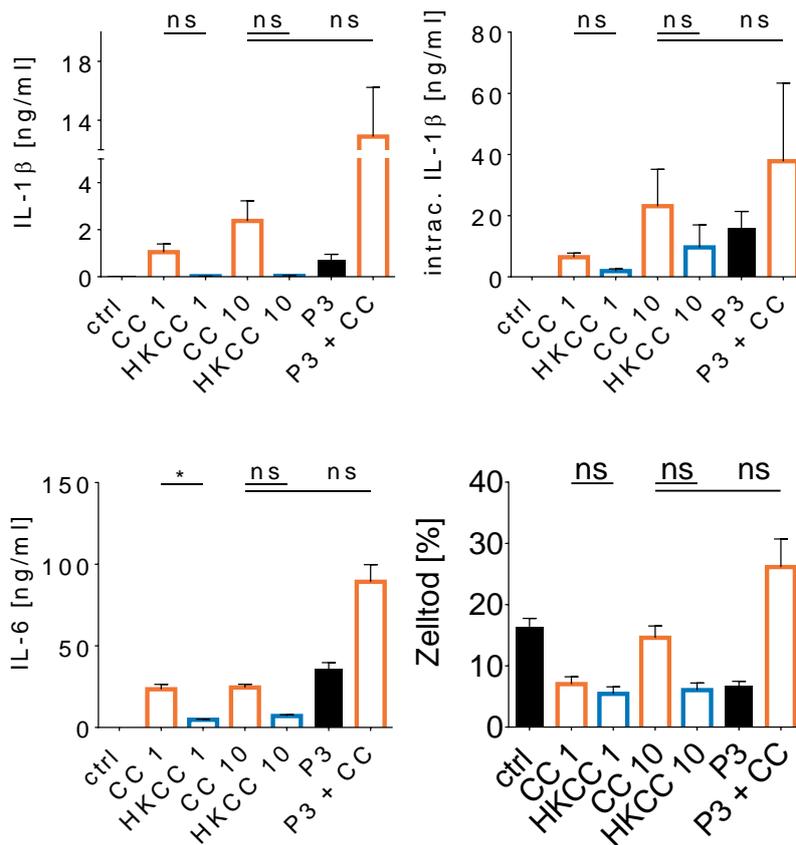


Abbildung 6: IL-1 β Induktion durch lebende Bakterien ist unabhängig von LPS und TLR4-Stimulation.

Primäre, humane Monozyten wurden mit lebenden (CC) oder toten (HKCC) *ClearColi* mit einer MOI von 1 oder 10 infiziert. In der Bedingung P3 + CC wurden die Monozyten zuerst mit Pam3CSK4 voraktiviert und danach mit *ClearColi* infiziert. IL-1 β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen, intrazelluläres IL-1 β wurden aus den Zelllysaten nach Abnahme der Überstände mittels ELISA gemessen. Der Zelltod wurde mittels Adenylat-Kinase-Freisetzungssassay bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=6 für IL-1 β und IL-6, n=4 für intrazelluläres IL-1 β und Zelltod. (ns; nicht signifikant, *; p<0.05).

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass Mausmakrophagen bakterielle Vitalität anhand von prokaryotischer RNA detektieren können und daraufhin das NLRP3-Inflammasom aktivieren⁹. Daher untersuchten wir den Effekt von bakterieller RNA auf die Produktion von IL-1 β in humanen Monozyten. Dazu transfizierten wir aufgereinigte bakterielle RNA aus *E. coli* in humane Monozyten. Dies führte zu einer deutlichen Produktion von IL-1 β und IL-6 (**Abbildung 7**), wie auch schon in anderen Studien gezeigt⁵². Im nächsten Experiment behandelten wir die RNA mit verschiedenen RNAsen vor der Transfektion und erwarteten eine klare Reduktion von IL-1 β . Hier zeigten sich keine eindeutigen Resultate (**Daten nicht gezeigt**). Dies könnte entweder an einer Kontamination der betreffenden Chargen gelegen haben, oder daran, dass

auch Degradationsprodukte von RNA für die Aktivierung von humanen Monozyten noch ausreichend sind¹⁶.

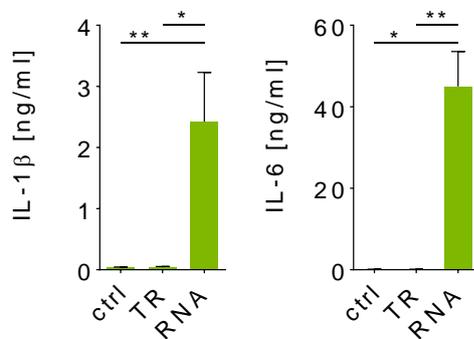


Abbildung 7: Bakterielle RNA induziert IL-1β in humanen Monozyten.

Aufgereinigte bakterielle RNA aus *E. coli* (grün) wurde in humane Monozyten transfiziert. In der Kontrollbedingung wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz (TR) behandelt. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=7. (*; p<0.05, **; p<0.01).

Um den Einfluss von bakterieller RNA auf die Immunantwort humaner Monozyten auf lebende Bakterien weiter zu untersuchen, verglichen wir Bakterien mit unterschiedlichem RNA-Gehalt. Mendelsohn und Tissières zeigten 1959, dass die transkriptionelle Aktivität und damit die Menge an RNA in Bakterien in Abhängigkeit von der Wachstumsphase variiert, und dass der RNA-Gehalt abnimmt, wenn Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase in verschiedenen nährstoffarmen Puffern inkubiert werden⁵³. Wir machten uns diese Beobachtung zu Nutze und stimulierten Monozyten mit lebenden und toten *E. coli*, die in normalem LB-Medium gezogen wurden, sowie mit *E. coli* aus verschiedenen Wachstumsphasen und mit *E. coli*, die nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase für mehrere Stunden in Tris-NaCl oder PBS Puffern inkubiert wurden. Wir bestimmten den RNA-Gehalt der Bakterien. Anschließend korrelierten wir den RNA-Gehalt der Bakterien mit der resultierenden IL-1β und IL-6 Produktion. Die IL-1β, IL-6-Menge und der RNA-Gehalt wurde zudem auf die MOI normalisiert. Im Gegensatz zu IL-6 zeigte sich für IL-1β eine positive Korrelation zwischen dem RNA-Gehalt der Bakterien und der resultierenden Zytokinproduktion in Monozyten (**Abbildung 8**).

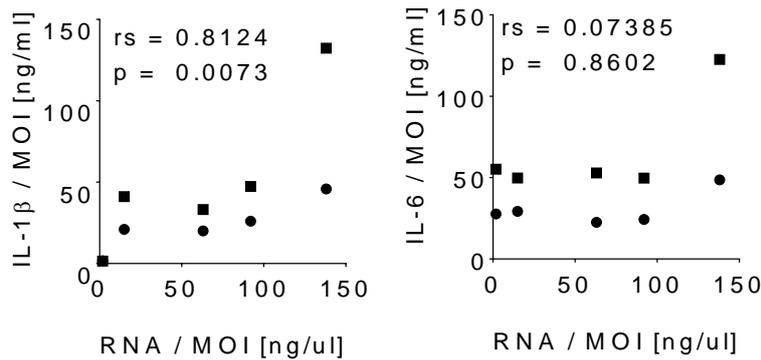


Abbildung 8: Korrelation zwischen RNA Gehalt der Bakterien bei Infektion und Zytokinproduktion in Monozyten

Monozyten wurden mit toten und mit lebenden *E. coli* infiziert, die sich bei Infektion in verschiedenen Wachstumsphasen befanden oder nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase in unterschiedlichen Puffern inkubiert wurden. Aus einem definierten Aliquot der Bakterien wurde RNA isoliert und quantifiziert und aus einem anderen Aliquot wurde die genaue Bakterienzahl (CFU) bestimmt. Die RNA Menge und die Zytokinproduktion wurden auf die MOI bezogen. n=2. Berechnet wurde der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient (rs).

Wir konnten somit zeigen, dass IL-1 β Produktion durch lebende Bakterien hervorgerufen wird (**Abbildung 5**) und unabhängig von funktionellem LPS ist (**Abbildung 6**). Bakterielle RNA hingegen ist ein starker Stimulus für IL-1 β Produktion (**Abbildung 7**) und der RNA-Gehalt in lebenden Bakterien korreliert mit der resultierenden IL-1 β Produktion (**Abbildung 8**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Detektion von prokaryoter RNA ein wichtiger Stimulus für die Induktion von IL-1 β durch lebende Bakterien ist.

8.2 Die Rolle von bakteriellen Membranvesikeln in der Inflammation durch lebende Bakterien

Aus Vorarbeiten war bekannt, dass IL-1 β Stimulation durch lebende Bakterien NLRP3-abhängig ist^{9, 38}. Da NLRP3 ein zytosolischer Sensor ist, stellte sich daher die Frage, wie bakterielle RNA aus extrazellulären Bakterien wie *E. coli* in das Zytosol gelangt, bzw. ob eine zytosolische Translokation für die Aktivierung von NLRP3 notwendig ist.

Sander *et al.* hatten gezeigt, dass die Phagozytose von *E. coli* zu einer gewissen Durchlässigkeit der Phagolysosome führt und deshalb vorgeschlagen, dass die bakterielle RNA von dort ins Zytosol gelangen könnte, um das NLRP3 Inflammasom

zu aktivieren⁹. Als alternative Hypothese wollten wir testen, ob die bakterielle RNA via OMV ins Zytosol transloziert wird und dort direkt das NLRP3-Inflammasom aktiviert.

Um dies zu überprüfen stimulierten wir humane Monozyten mit aufgereinigten OMV von *E. coli*. Dies führte zu einer starken Produktion von IL-1 β und IL-6 (**Abbildung 9**).

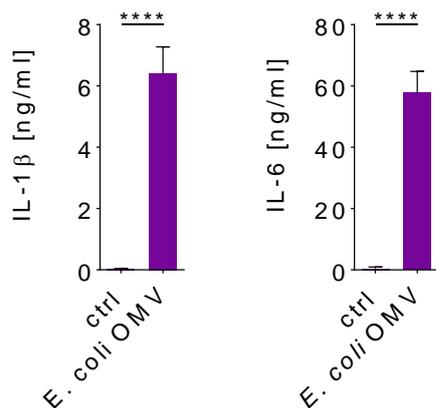


Abbildung 9: OMV induzieren IL-1 β und IL-6 in Monozyten.

Primäre, humane Monozyten wurden mit OMV von *E. coli* stimuliert (lila). Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Die hier dargestellten Bedingungen sind ein Ausschnitt von dem Experiment, welches in **Abbildung 11** dargestellt wird. Statistisch getestet wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=20. (****; p<0.0001)

Um zu überprüfen ob die in OMV enthaltene RNA für die Induktion von IL-1 β eine Rolle spielt, wurde bakterielle RNA aus *E. coli* OMV isoliert. Die Isolation wurde durch Kooperationspartner der Justus-Liebig-Universität Gießen (Priv.-Doz. Dr. Mobarak Abu Mraheil) durchgeführt und die RNA wurde uns für Experimente zur Verfügung gestellt. Wir transfizierten die OMV-RNA in Monozyten und beobachteten auch bei vergleichsweise niedrigen RNA-Konzentrationen eine deutliche Induktion von IL-1 β (**Abbildung 10**).

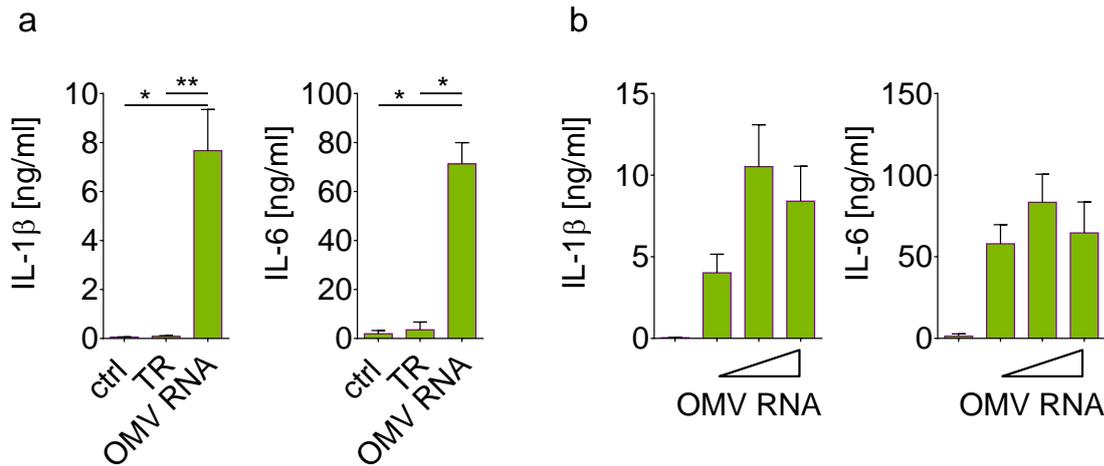


Abbildung 10: Isolierte RNA aus OMV induziert IL-1 β und IL-6 in primären, humanen Monozyten.

Aus OMV isolierte RNA wurde in Monozyten transfiziert. Die Konzentration der OMV RNA betrug bei Stimulation 100 ng/ml (a), bzw. 10 ng/ml, 100 ng/ml und 250 ng/ml (b). Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=7 links, n=3 rechts. (ns; nicht signifikant, *, $p < 0.05$, **).

Als nächstes stimulierten wir Monozyten mit OMV oder LPS in Anwesenheit des Antibiotikums Polymyxin-B. Dieses wird regelmäßig in Zellkulturversuchen zur LPS Neutralisation verwendet, da es mit hoher Affinität an LPS bindet. Gleichzeitig wirkt es durch die Permeabilisation der äußeren Membran gram-negativer Bakterien bakterizid⁵⁴. Wir beobachteten eine deutlich reduzierte Induktion von IL-1 β in Anwesenheit von Polymyxin-B nach Stimulation mit OMV oder LPS. Zelltod und IL-6 Produktion waren durch Polymyxin-B nicht wesentlich verändert (**Abbildung 11**).

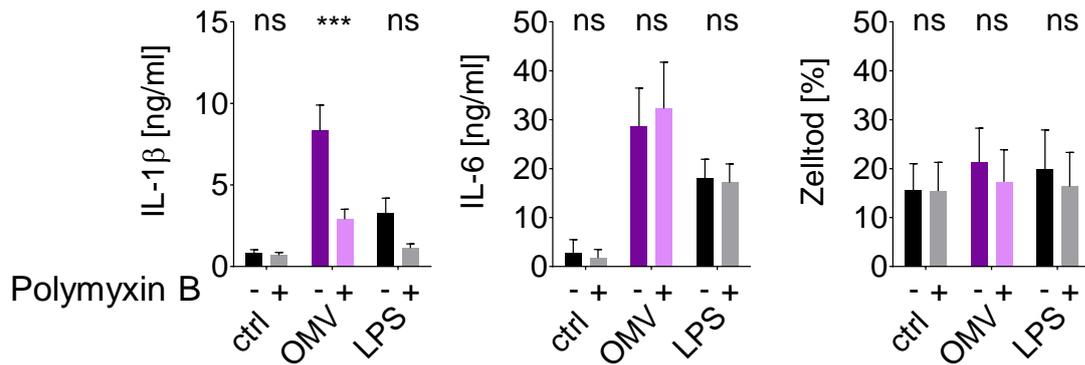


Abbildung 11: Reduzierte Induktion von IL-1 β in Anwesenheit von Polymyxin-B (LPS Inhibitor)

Humane Monozyten wurden mit OMV oder LPS stimuliert (\pm 10 μ g/ml Polymyxin B). IL-1 β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Der Zelltod wurde mittels Adenylat-Kinase-Freisetzungssassay bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Sidak's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4 für IL-1 β und Zelltod, n=2 für IL-6. (ns; nicht signifikant, ***; p<0.001).

Wir verglichen daraufhin die Induktion von IL-1 β durch OMV von herkömmlichen K12 *E. coli* und LPS defizienten *ClearColi* sowie Membranvesikeln (MV) von gram-positiven Bakterien *Listeria innocua* und *Listeria monocytogenes*, welche ebenfalls kein LPS enthalten. Alle eingesetzten Membranvesikel induzierten IL-1 β , allerdings waren die IL-1 β Level durch alle Vesikel deutlich reduziert verglichen mit OMV aus wildtyp K12 *E. coli* (Abbildung 12). Die reduzierten IL-1 β Level sind nicht auf einen Priming-Defekt, d.h. auf reduziertes pro-IL-1 β zurückzuführen, da die Level an intrazellulärem IL-1 β in allen Bedingungen ungefähr gleich waren (Abbildung 12). Entgegen unserer Hypothese, schein somit LPS das dominante PAMP für die Induktion von IL-1 β durch *E. coli* OMV zu sein und die OMV RNA scheint eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Allerdings ist festzuhalten, dass auch LPS-defiziente OMV und MV zu einer relevanten IL-1 β Produktion führten.

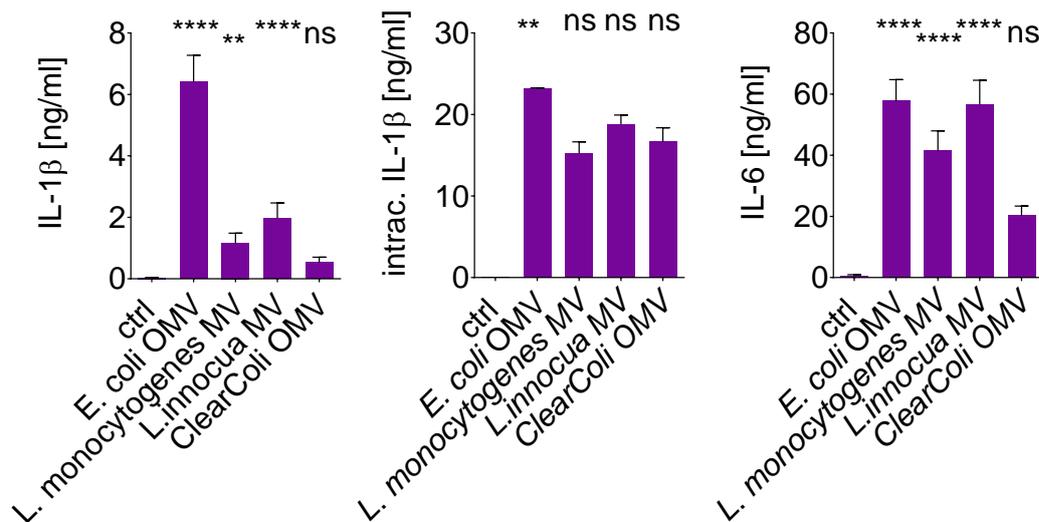


Abbildung 12: Induktion von IL-1β durch Membranvesikel von verschiedenen Bakterien

Primäre, humane Monozyten wurden mit Membranvesikeln von *E.coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* und LPS-defizienten *E. coli* (*ClearColi*) stimuliert. IL-1β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen, intrazelluläres IL-1β wurde aus den Zelllysaten nach Abnahme der Überstände mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. Für IL-1β und IL-6 wurde statistisch getestet mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. Im Falle des intrazellulären IL-1β mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. Getestet wurde die Fragestellung, ob sich die einzelnen Gruppen von der Bedingung „ctrl“ unterscheiden. n=9-20 für IL-1β und IL-6, n=4 für intrazelluläres IL-1β. (ns; nicht signifikant, **, p<0.01, ****; p<0.0001).

Im Anschluss verglichen wir die IL-1β Produktion nach Stimulation mit drei verschiedenen Stämmen von *E. coli*, die sich in der Menge der produzierten OMV unterscheiden. Dabei zeigte sich, dass der hypovesikulierende Stamm deutlich weniger IL-1β produzierte als unser Kontrollstamm, obwohl die IL-6 Produktion nicht erniedrigt war (**Abbildung 13**).

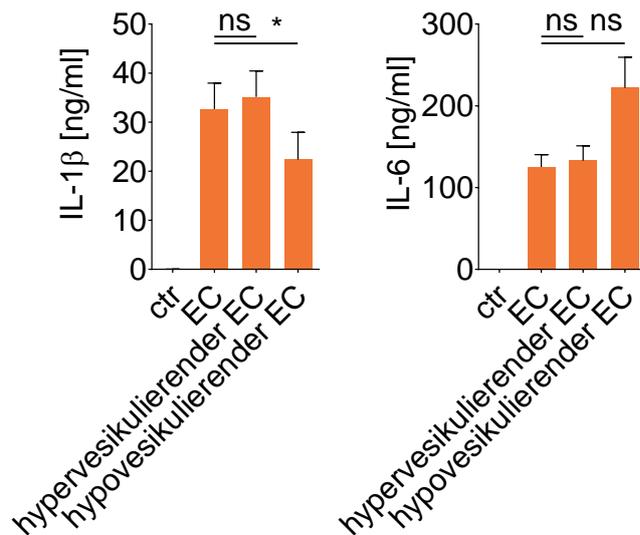


Abbildung 13: Ein hypovesikulierender *E. coli* Stamm induziert weniger IL-1β als sein Kontrollstamm.

Primäre, humane Monozyten wurden mit drei verschiedenen *E. coli* Stämmen infiziert. Diese unterschieden sich in der Menge der produzierten OMV. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. $n=12$. (ns; nicht signifikant, *; $p < 0.05$).

8.3 Alternative Inflammasomaktivierung durch lebende *E. coli*

Die Produktion und Freisetzung von aktivem IL-1β setzt in der Regel die katalytische Prozessierung durch Caspase-1 und somit die Aktivierung des Inflammasoms voraus²³. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, dass lebende Bakterien das NLRP3-Inflammasom aktivieren^{9, 38}. Aufgrund der komplexen Signalmechanismen und unterschiedlichen Modi der NLRP3-Aktivierung (kanonisch vs. non-kanonisch vs. alternativ), waren die zugrundeliegenden Mechanismen der Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien in humanen Monozyten weitgehend unklar. In den bisherigen Experimenten hatten wir durchgehend eine deutliche Induktion von IL-1β jedoch nur niedrige Zelltodraten beobachtet (**Abbildung 6, Abbildung 17**). Dies deutete daraufhin, dass es sich eher nicht um eine kanonische oder non-kanonische Form der Inflammasomaktivierung, sondern möglicherweise um eine alternative Inflammasomaktivierung handelt³¹. Allerdings war die alternative Inflammasomaktivierung bislang nur für LPS und TLR4 beschrieben³¹. Wir hatten aber zuvor herausgefunden, dass LPS eine eher untergeordnete Rolle für die IL-1β Produktion nach Detektion von lebenden Bakterien spielt (**Abbildung 6**).

Kennzeichen einer kanonischen Inflammasomaktivierung sind Pyroptose, Kalium-Efflux getriggerte IL-1 β Sekretion und die Ausbildung von Pyroptosomen (ASC-Specks)²³. Bei der kanonischen Inflammasomaktivierung lässt sich in der Regel ein makromolekulares Pyroptosom pro Zelle nachweisen⁵⁰.

Für die alternative Inflammasomaktivierung reicht ein einzelnes Signal, sie führt nicht zur Pyroptose und sie ist Kalium-Efflux unabhängig³¹.

Wir untersuchten daher diese Merkmale der kanonischen und alternativen Inflammasomaktivierung in Monozyten nach Stimulation mit verschiedenen bakteriellen Stimuli.

Wir stimulierten Monozyten mit lebenden oder toten *E. coli*, bakterieller RNA, OMV, LPS oder LPS+Nigericin (klassischer Stimulus für kanonische NLRP3-Inflammasomaktivierung) und führten anschließend eine Immunfluoreszenzfärbung für ASC zum Nachweis von Pyroptosomen durch. Bei einer kanonischen Inflammasomaktivierung aggregiert das zelluläre ASC in einer punktförmigen Struktur, regulär in Nähe des Zellkerns bzw. des trans-Golgi-Netzwerks²⁵. Bei fehlender Stimulation bzw. alternativer Inflammasomaktivierung bildet sich kein solcher ASC-Speck und ASC ist weiterhin diffus im Zytosol verteilt³¹.

Wir konnten eine deutliche Pyroptosom-Bildung nur in der Positivkontrolle für klassische Inflammasomaktivierung (LPS+Nigericin) nachweisen (**Abbildung 14**). Hier zeigte sich auch eine deutliche Dekondensation (Schwellung) der Zellkerne als Zeichen des Zelltods. Für die Quantifizierung der Pyroptosombildung zählten wir Zellen und Pyroptosome in 16 mikroskopischen Blickfeldern aus (**Abbildung 15**).

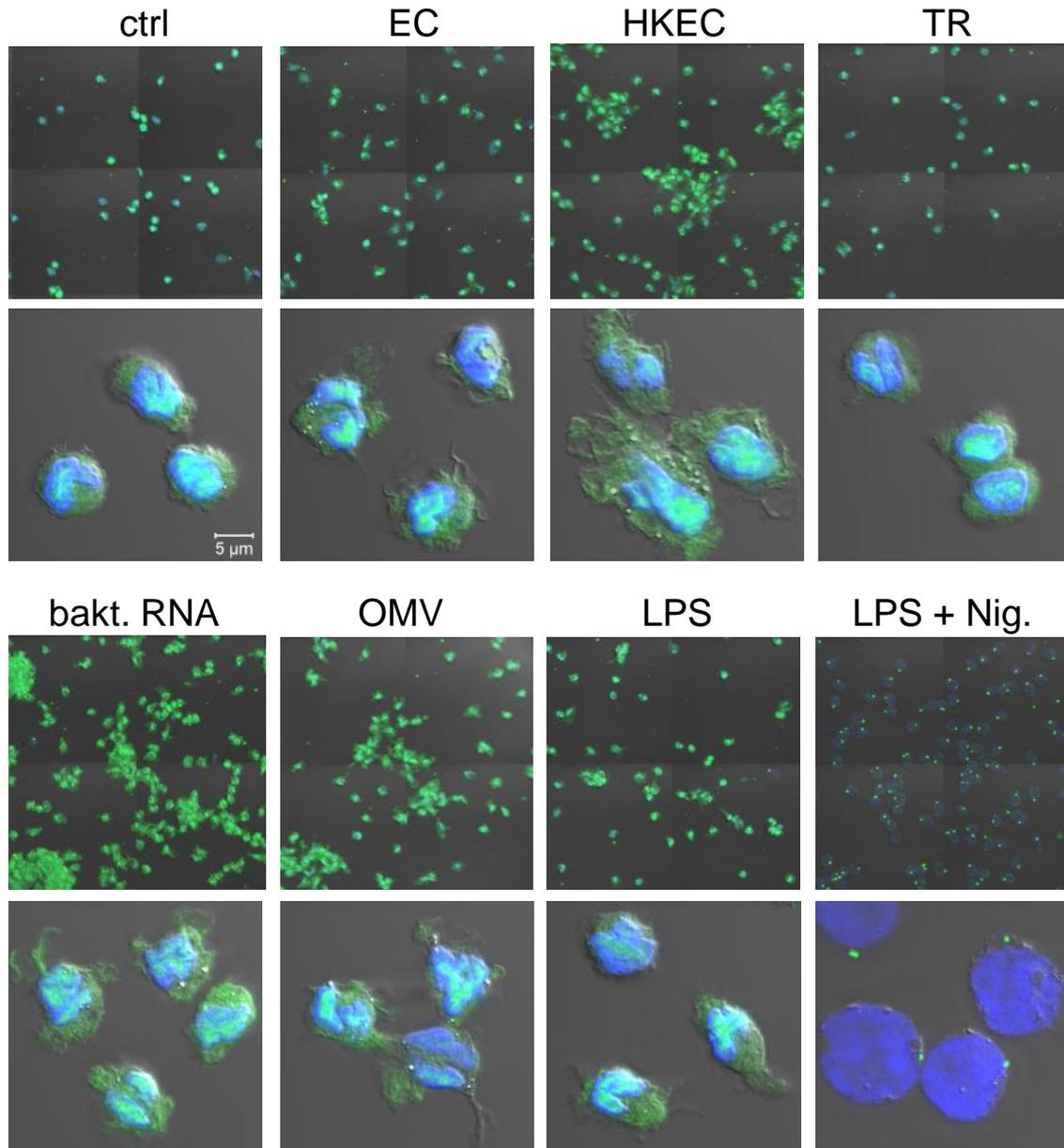


Abbildung 14: Nachweis von Pyroptosomen (ASC-Specks) in humanen Monozyten

Primäre, humane Monozyten wurden mit den angegebenen Stimuli aktiviert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit einem Anti-ASC-Antikörper (grün) und mit DAPI (blau) für den Zellkern gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Repräsentative Bildausschnitt aus einem von insgesamt vier (n=4) unabhängigen Experimenten sind dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

Pyroptosome stellen sich als kleine, grüne Punkte in Nähe des Zellkerns dar und sind vor allem in der Bedingung LPS+Nig. zu sehen.

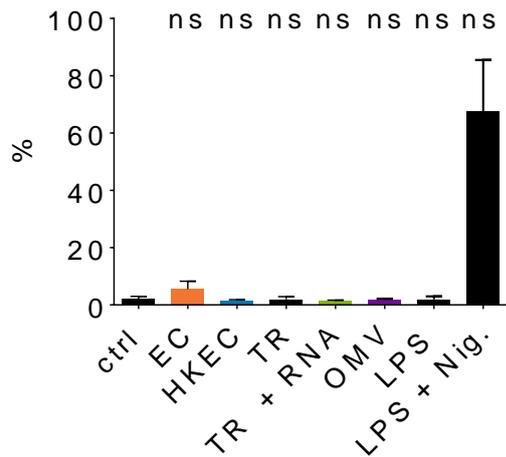


Abbildung 15: Quantifizierung der Pyroptosombildung in Monozyten nach Stimulation mit bakteriellen Stimuli

Zellen aus 16 visuellen Feldern (insgesamt ca. 100 Zellen/Bedingung) wurden gezählt und der Anteil der pyroptosompositiven an der Gesamtzahl der Zellen kalkuliert. Statistisch getestet wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen, wobei der Unterschied zur Kontrollgruppe dargestellt wurde. n=4. (ns; nicht signifikant)

Um den Mechanismus der Inflammasomaktivierung weiter einzugrenzen untersuchten wir die Abhängigkeit der IL-1 β Produktion vom Kaliumionen-Efflux. Zu diesem Zweck variierten wir die extrazelluläre Kaliumkonzentration (5 und 50 mM) durch Zugabe von Kaliumchlorid. Eine hohe extrazelluläre Kaliumkonzentration sollte den Kaliumionen-Efflux verhindern. Auch in diesem Ansatz zeigte sich nur in der Positivkontrolle für kanonische Inflammasomaktivierung (Pam3+Nigericin) eine deutliche Reduktion der IL-1 β Sekretion bei der höheren extrazellulären Kaliumkonzentration (**Abbildung 16**). Ebenfalls zeigte sich eine, wenn auch statistisch nicht signifikante, Erhöhung der IL-6 Induktion in allen Bedingungen mit hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration (**Abbildung 16**).

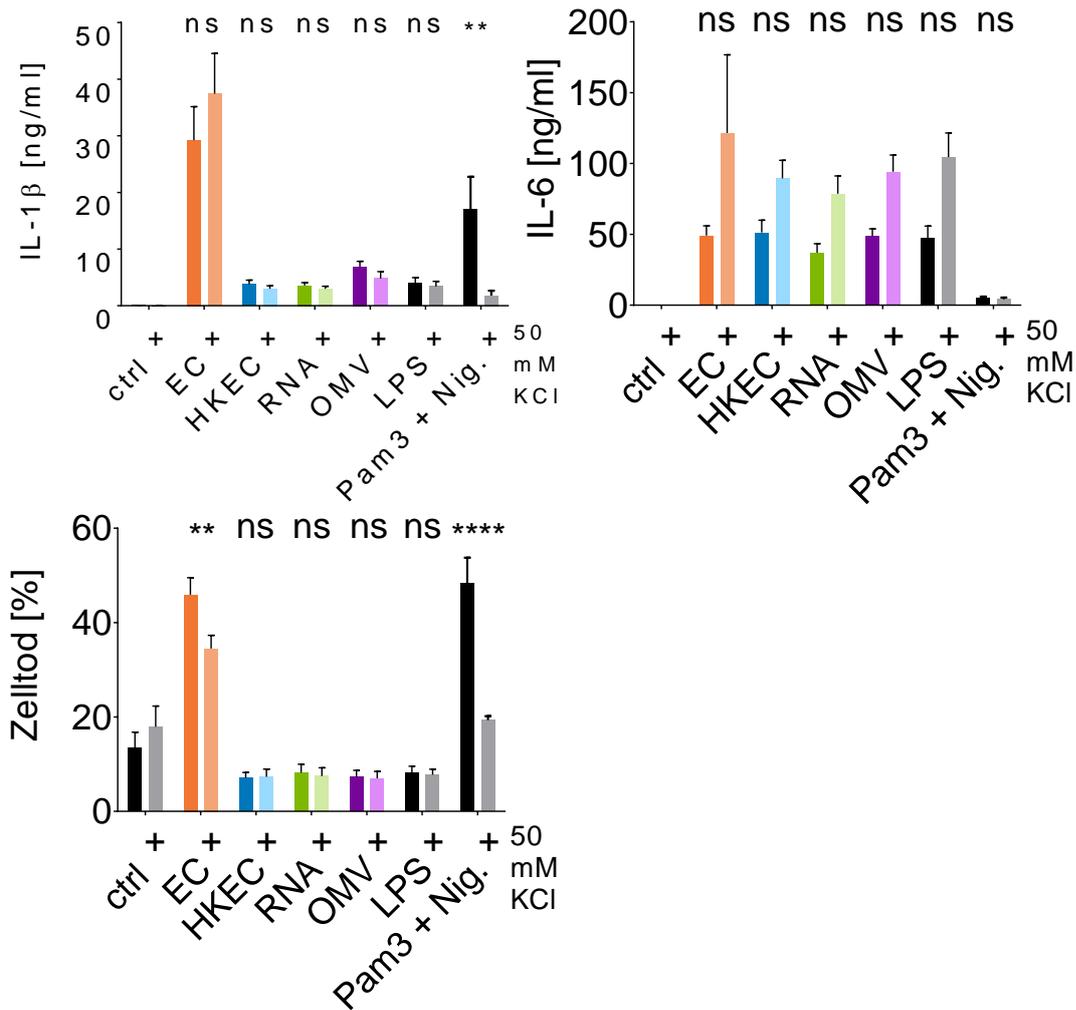


Abbildung 16: Einfluss von Kaliumionen-Efflux auf die Inflammasomaktivierung

Primäre, humane Monozyten wurden mit den angegebenen Stimuli bei physiologischer extrazellulärer Kaliumkonzentration (5 mM) oder erhöhter Konzentration (50 mM = +) stimuliert. Zytokine und Zelltod wurden aus den Überständen mittels ELISA oder Adenylat-Kinase-Freisetzungssassay gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Sidak's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. N=6-8 für IL-1 β und Zelltod und n=4-6 für IL-6. (ns; nicht signifikant, **, p<0.01, ****; p<0.0001).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass *E. coli*, isolierte bakterielle RNA, OMV und extrazelluläres LPS zu einer alternativen Inflammasomaktivierung führen. Bei der alternativen Inflammasomaktivierung bleibt zudem die zelluläre Vitalität erhalten, d.h. es kommt nicht zur Pyroptose³¹. Passend zu den vorherigen Beobachtungen zeigte sich, dass tote *E. coli*, RNA, OMV und LPS keinen relevanten Zelltod induzieren (**Abbildung 16**). Lebende *E. coli* induzierten in diesem speziellen Experiment erhöhte Zelltodlevel (**Abbildung 16**). Es zeigte sich aber, dass der Zelltod in Abhängigkeit von der MOI steigt, die IL-1 β Produktion aber nicht (**Abbildung 17**).

Auch LPS-defiziente *ClearColi* induzierten bei MOIs von 1 und 10 keinen Zelltod oberhalb des Kontrolllevels (**Abbildung 6**). Deshalb halten wir es für am wahrscheinlichsten, dass der Zelltod nicht notwendig ist für die Induktion von IL-1 β .

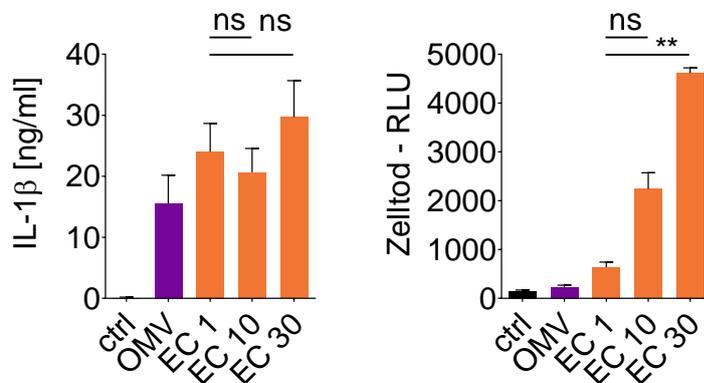


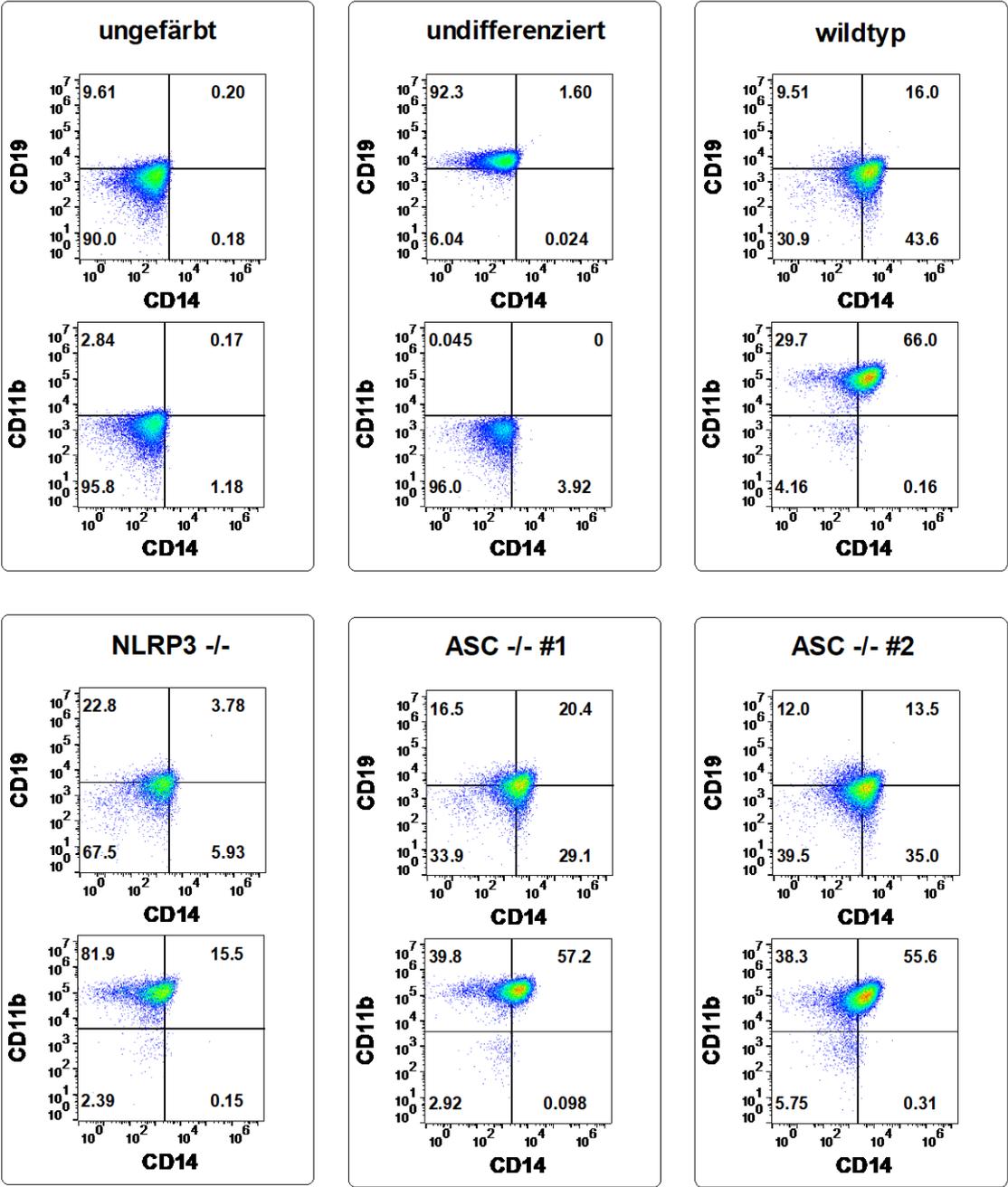
Abbildung 17: Zelltod und IL-1 β Produktion bei unterschiedlicher MOI

Primäre, humane Monozyten wurden mit *E. coli* DH10 β (hier ausnahmsweise nicht die sonst verwendeten EC DH5 α) bei MOIs von 1, 10 und 30 infiziert und zur Kontrolle mit OMV stimuliert. Der Zelltod wurde mittels Adenylat-Kinase-Freisetzungssassay bestimmt, (RLU = relative Lichteinheiten). Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit dem Friedman-Test, gefolgt von Dunn's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4. (ns; nicht signifikant, **; p<0.01).

8.4 Lebende *E. coli*, bakterielle RNA und OMV aktivieren das NLRP3-Inflammasom in BlaER-1 Monozyten

Um die Rolle der bakteriellen RNA und der involvierten Rezeptoren in der Inflammasomaktivierung durch lebende Bakterien weiter zu untersuchen, verwendeten wir im Folgenden eine genetisch manipulierbare monozytäre Zelllinie. Zu diesem Zweck verwendeten wir BlaER1-Monozyten, da genetische Modifizierung in primären, humanen Monozyten schwer zu erreichen ist. In den Experimenten verglichen wir dabei immer wildtyp (wt) BlaER1-Monozyten mit Klonen, die mittels CRISPR/Cas9-vermittelter Geneditierung in einzelnen Signalmolekülen oder Rezeptoren defizient waren. Wie im Methodenteil dargelegt, wurden die BlaER1-Zellen für eine Woche transdifferenziert, um einen monozytären Phänotyp zu induzieren. Als Kontrolle der erfolgreichen Transdifferenzierung wurde die Expression der B-Zell-Marker CD19 und der Monozytenmarker CD11b und CD14 durchflusszytometrisch bestimmt. Ein Beispielexperiment ist in (**Abbildung 18**) dargestellt. Während undifferenzierte BlaER-B-Zellen CD19 positiv, CD11b und

CD14 negativ sind, regulieren die unterschiedlichen BLaER1-Klone nach Transdifferenzierung CD19 mehrheitlich herunter und CD11b herauf. Die Expression von CD14 ist zwischen den einzelnen Klonen etwas unterschiedlich, lediglich der hier verwendete *NLRP3*^{-/-} Klon und der *CASPASE1*^{-/-} #1 Klon wurden nicht überwiegend CD14 positiv (**Abbildung 18**).



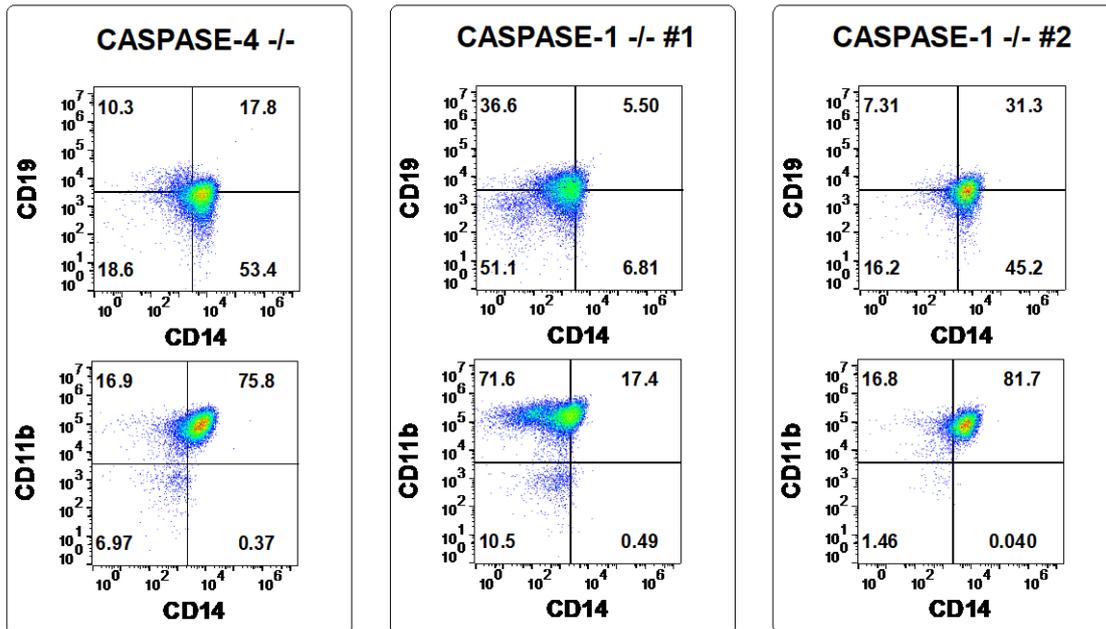


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Kontrolle der monozytären Transdifferenzierung

Beispielhafte Darstellung eines Einzelversuchs aus den Experimenten der **Abbildung 19**. Dargestellt sind prozentuale Angaben in den einzelnen Quadranten. Das Gating erfolgte anhand der ungefärbten und der undifferenzierten BlaER1-Zellen.

Wir infizierten BlaER1-Monozyten mit lebenden *E. coli* und stimulierten diese zum Vergleich mit OMV oder transfizierten sie mit bakterieller RNA.

Wie erwartet, waren NLRP3, ASC und Caspase-1 notwendig für die IL-1 β Produktion in allen drei Bedingungen (**Abbildung 19**, **Abbildung 20**). IL-6 wurde unabhängig von diesen Inflammassommolekülen gebildet und war daher durch die genetischen Defekte nicht verändert (**Abbildung 19**, **Abbildung 20**). Im gleichen Experiment untersuchten wir auch das Molekül Caspase-4, welches die non-kanonische Inflammassomaktivierung durch zytosolisches LPS in humanen myeloiden Zellen vermittelt⁴³. Im Gegensatz zu lebenden *E. coli* war die IL-1 β Produktion bei Stimulation mit OMV überwiegend Caspase-4 abhängig (**Abbildung 20**). Dies bestätigt publizierte Befunde aus murinen Zellen, die zeigen, dass OMV bakterielles LPS in das Zytosol von myeloiden Zellen transferieren können und so zu einer nicht-kanonischen Inflammassomaktivierung führen⁵⁵. LPS+Nigericin, als Kontrollbedingung für die kanonische Inflammassomaktivierung, war wie erwartet abhängig von NLRP3, ASC und Caspase-1 (**Abbildung 19**, **Abbildung 20**). Jedoch war die Induktion von IL-1 β durch transfiziertes LPS, eigentlich als Positivkontrolle für nicht-kanonische Inflammassomaktivierung inkludiert, unabhängig von Caspase-4 (**Abbildung 21**). Dies

deckt sich mit Berichten anderer Wissenschaftler (persönliche Kommunikation) und wir gehen daher am ehesten von einer insuffizienten Transfektion des LPS aus. Zumal sich bei den OMV wie erwartet eine deutliche Caspase-4 abhängige Reduktion in der Produktion von IL-1 β zeigte (**Abbildung 20**).

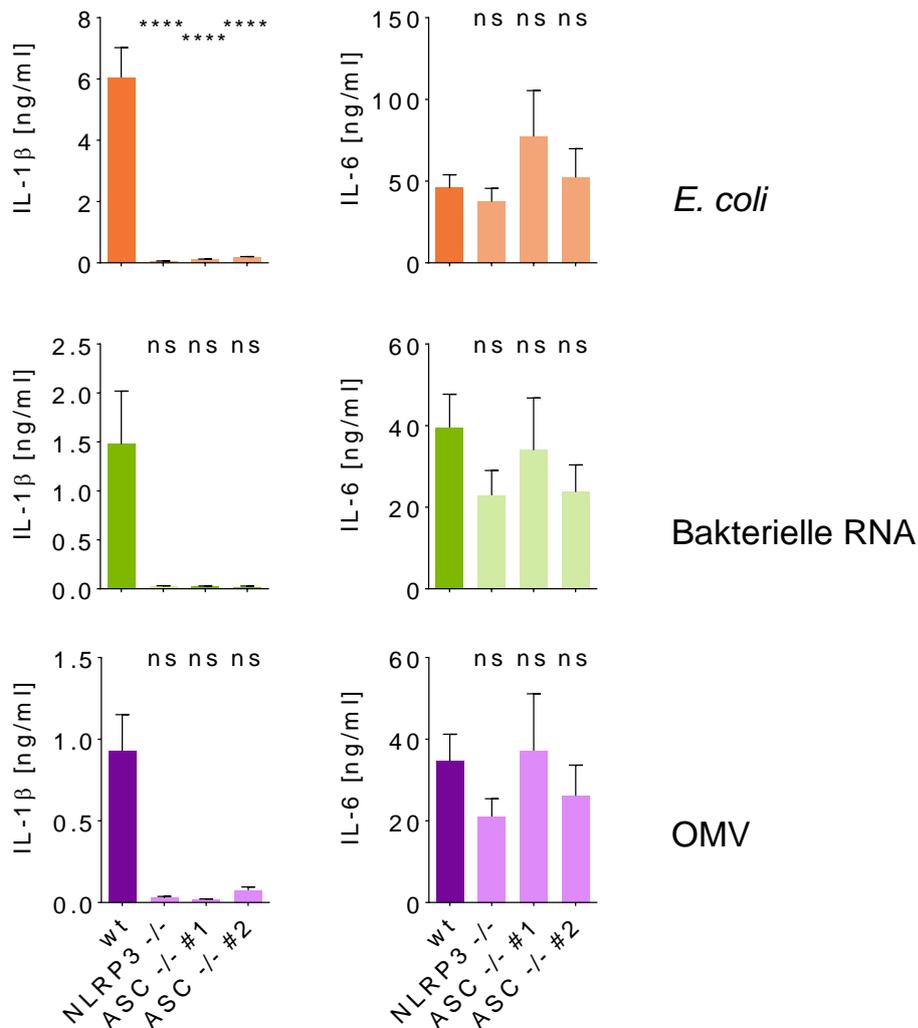


Abbildung 19: NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen BlaER1-Monozyten

BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli*, bakterieller RNA oder mit *E. coli* OMV stimuliert. Verglichen wurden wildtyp (wt) BlaER1-Monozyten mit BlaER1-Monozyten, in denen die angegebenen Gene deletiert wurden. **Abbildung 19**, **Abbildung 20** und **Abbildung 21** stammen aus dem gleichen Experiment, wurden auch gemeinsam statistisch ausgewertet, sind hier aber zur besseren Lesbarkeit separat dargestellt. Für manche Gene, wie ASC, verwendeten wir zwei verschiedene Klone mit einem Knockout für das gleiche Gen (#1 bzw. #2). Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweifweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=8 für wt, *NLRP3*^{-/-} und *CASPASE-4*^{-/-}, n=4 für *ASC*^{-/-} und *CASPASE-1*^{-/-} BlaER1-Monozyten. (ns; nicht signifikant, ****; p<0.0001).

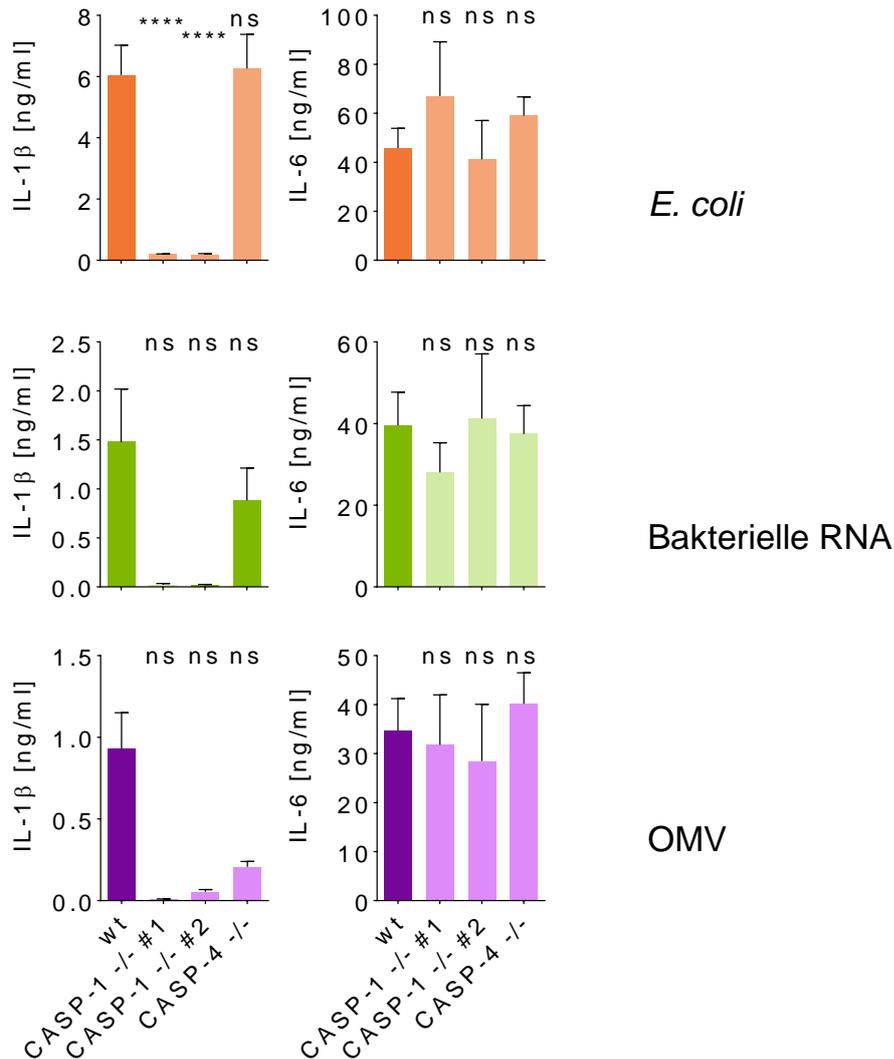


Abbildung 20: NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen BlaER1-Monozyten

BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli*, bakterieller RNA oder mit *E. coli* OMV stimuliert. Verglichen wurden wildtyp (wt) BlaER1-Monozyten mit BlaER1-Monozyten, in denen die angegebenen Gene deletiert wurden. **Abbildung 19**, **Abbildung 20** und **Abbildung 21** stammen aus dem gleichen Experiment, wurden auch gemeinsam statistisch ausgewertet, sind hier aber zur besseren Lesbarkeit separat dargestellt. Für manche Gene, wie ASC, verwendeten wir zwei verschiedene Klone mit einem Knockout für das gleiche Gen (#1 bzw. #2). Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweifweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. $n=8$ für wt, $NLRP3^{-/-}$ und $CASPASE-4^{-/-}$, $n=4$ für $ASC^{-/-}$ und $CASPASE-1^{-/-}$ BlaER1-Monozyten. (ns; nicht signifikant, ****; $p<0.0001$).

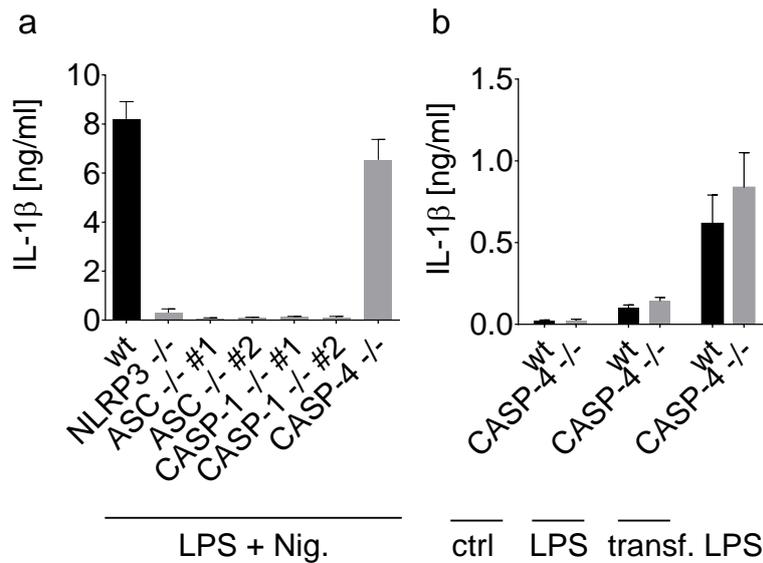


Abbildung 21: Kontrollbedingungen aus dem Experiment der Abbildung 19 und der Abbildung 20

BlaER1-Monozyten wurden mit LPS + Nigericin, LPS oder transfiziertem LPS stimuliert. Verglichen wurden wildtyp (wt) BlaER1-Monozyten mit BlaER1-Monozyten, in denen die angegebenen Gene deletiert wurden. **Abbildung 19**, **Abbildung 20** und **Abbildung 21** stammen aus dem gleichen Experiment, sind hier aber zur besseren Lesbarkeit separat dargestellt. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler.

8.5 Adaptermoleküle oberhalb von NLRP3

Das NLRP3-Inflammasom stellt eine molekulare Plattform dar, die Signale von vorgeschalteten zellulären Rezeptoren und Signalwegen integriert²³. Um daher die vorgeschalteten („upstream“) Signalwege einzugrenzen, testeten wir die Rolle von Adaptermolekülen der angeborenen Immunität. Hierbei testeten wir die Rolle von TLR-Signaling (MyD88 / TRIF), DNA-Sensoren bzw. di-Nukleotid-Sensoren (STING) und zytosolischen RNA-Sensoren (MAVS).

8.5.1 Lebende *E. coli* aktivieren das NLRP3-Inflammasom unabhängig von STING.

In humanen myeloiden Zellen vermittelt STING die Inflammasomaktivierung durch zytosolische DNA⁴⁴. In unseren Experimenten war STING nicht an der Inflammasomaktivierung nach Infektion mit lebenden *E. coli* oder nach Stimulation

mit OMV beteiligt (**Abbildung 22**). Im Gegenteil beobachteten wir eine leichte aber statistisch signifikant gesteigerte IL-1 β Produktion in STING-defizienten BLaER1 Zellen (**Abbildung 22**). Die Kontrollbedingungen für alternative und klassische Inflammassomaktivierung waren ebenfalls unabhängig von STING (**Abbildung 23**). Allerdings zeigte die Positivkontrolle für STING-abhängige Inflammassomaktivierung, transfizierte DNA, keine signifikante IL-1 β Induktion in diesem System (**Abbildung 23**).

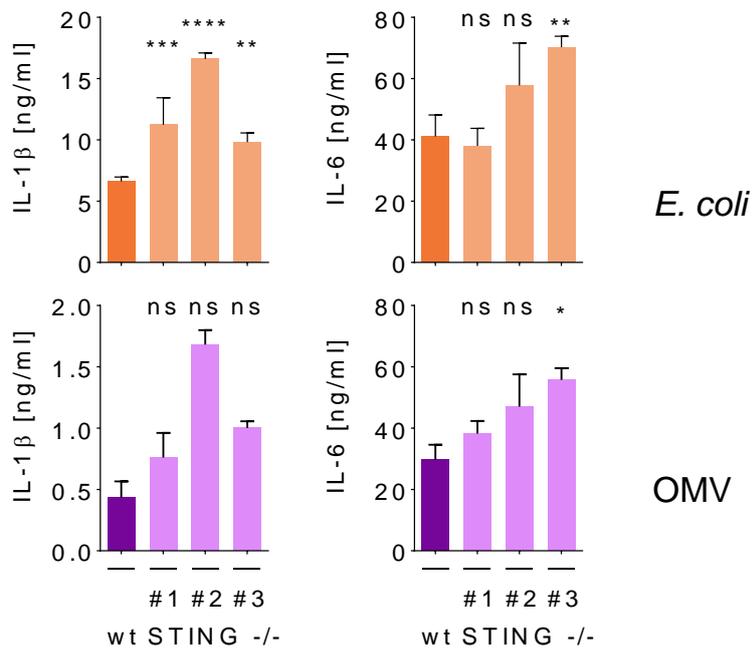


Abbildung 22: STING-unabhängige IL-1 β Produktion in BLaER-1 Zellen nach Stimulation mit lebenden *E. coli*

Wildtyp und *STING*^{-/-} BLaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* infiziert oder mit OMV stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4. (ns; nicht signifikant, *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001, ****; p<0.0001).

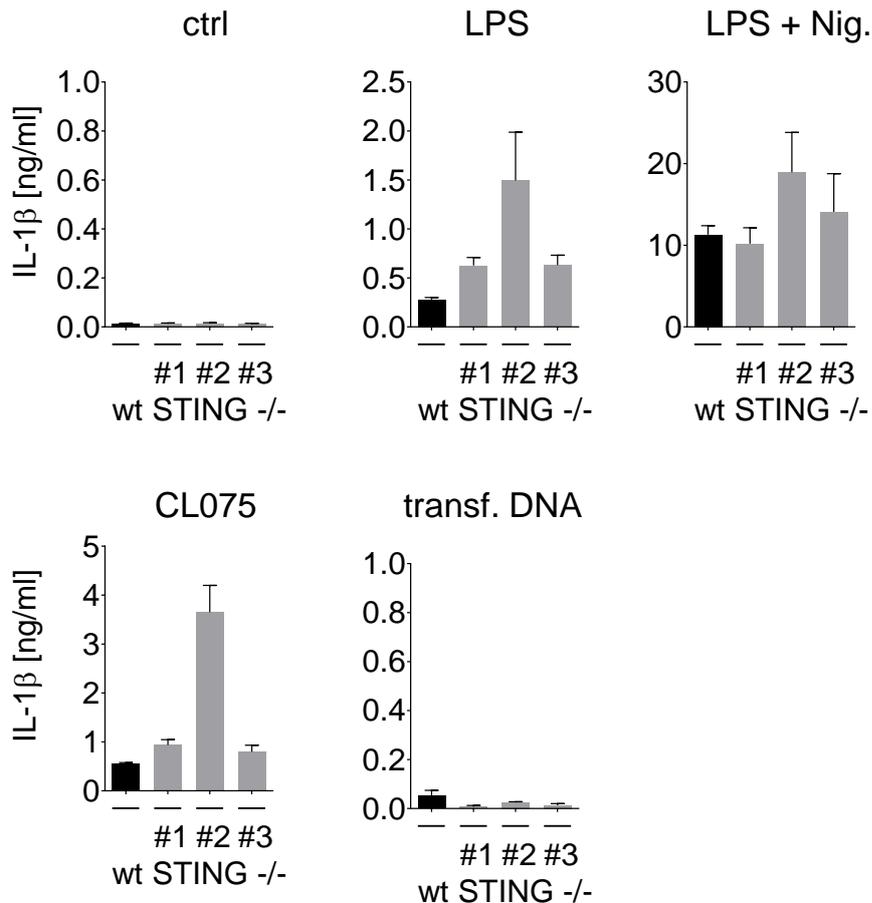


Abbildung 23: Kontrollbedingungen des Experimentes aus Abbildung 22

Wildtyp und *STING*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, LPS + Nigericin, CL075 (=TLR8 Agonist) oder transfizierter DNA stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. n=4.

8.5.2 Lebende *E. coli* aktivieren das NLRP3-Inflammasom unabhängig von MAVS.

In murinen Zellen wurde gezeigt, dass das Adaptermolekül MAVS notwendig ist für die Inflammasomaktivierung durch zytosolische doppelsträngige RNA⁴⁵. In unseren Experimenten war MAVS nicht notwendig für die Produktion von IL-1β nach Infektion mit lebenden *E. coli* oder nach Stimulation mit OMV (**Abbildung 24**). Die Kontrollbedingungen für alternative und klassische Inflammasomaktivierung waren ebenfalls unverändert. Jedoch beobachteten wir in BLaER1 Zellen keine signifikante IL-1β Produktion durch transfiziertes Poly I:C (**Abbildung 24**). Außerdem zeigte sich in einem Experiment bereits eine IL-1β Produktion ohne Stimulation (**Abbildung 24**).

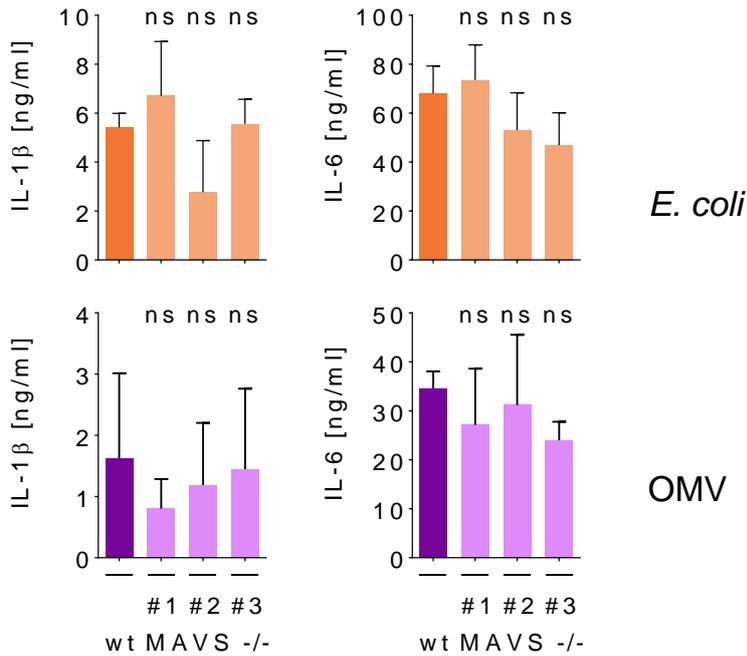


Abbildung 24: MAVS-unabhängige IL-1β Produktion in BLaER-1 Zellen nach Stimulation mit lebenden *E. coli*

Wildtyp und *MAVS*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* infiziert oder mit OMV stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=3. (ns; nicht signifikant).

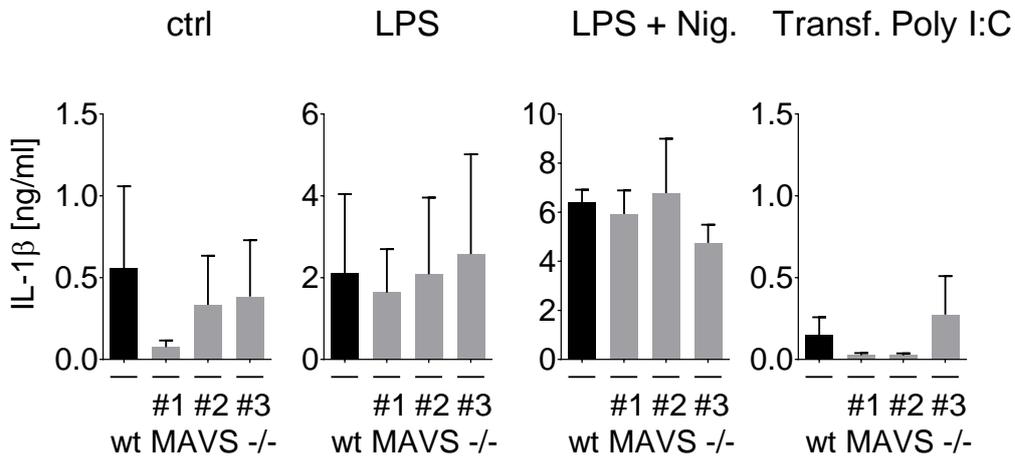


Abbildung 25: Kontrollbedingungen des Experimentes aus Abbildung 24

Wildtyp und *MAVS*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, LPS + Nigericin oder transfiziertem Poly I:C stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. n=3.

8.5.3 Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende *E. coli* ist partiell abhängig von TRIF.

Die bisher beschriebene alternative Inflammasomaktivierung in humanen myeloiden Zellen wird durch LPS ausgelöst und benötigt TLR4 und TRIF als sein Adaptermolekül³¹. Da lebende *E. coli* und OMV hohe Mengen LPS enthalten, wollten wir nochmals die Rolle von LPS, sowie von TLR4 und TRIF adressieren. In *TRIF*^{-/-} BlaER1-Monozyten zeigte sich eine moderate Reduktion der IL-1 β Produktion nach Stimulation mit lebenden *E. coli* und eine fast komplette Aufhebung der IL-1 β Produktion nach Stimulation mit OMV (**Abbildung 26**). Die Kontrollbedingungen zeigten keine Auffälligkeiten (**Abbildung 27**). Die Menge an intrazellulärem IL-1 β war in den *TRIF*^{-/-} BlaER1-Monozyten nicht vermindert (**Abbildung 26**), sodass wir die Reduktion der IL-1 β Produktion auf eine defiziente Inflammasomaktivierung und nicht auf ein gestörtes Priming zurückführen.

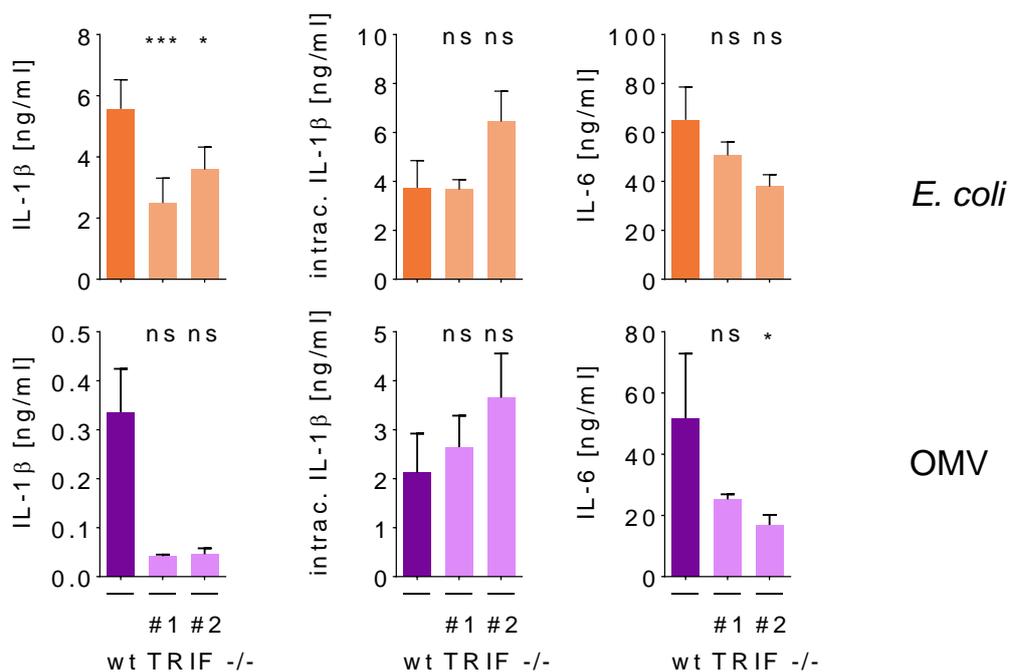


Abbildung 26: Partielle Rolle für TRIF in der Induktion von IL-1 β durch lebende *E. coli*

Wildtyp und *TRIF*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* oder mit OMV stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweifweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4-5. (ns; nicht signifikant, *, p<0.05, ***, p<0.001).

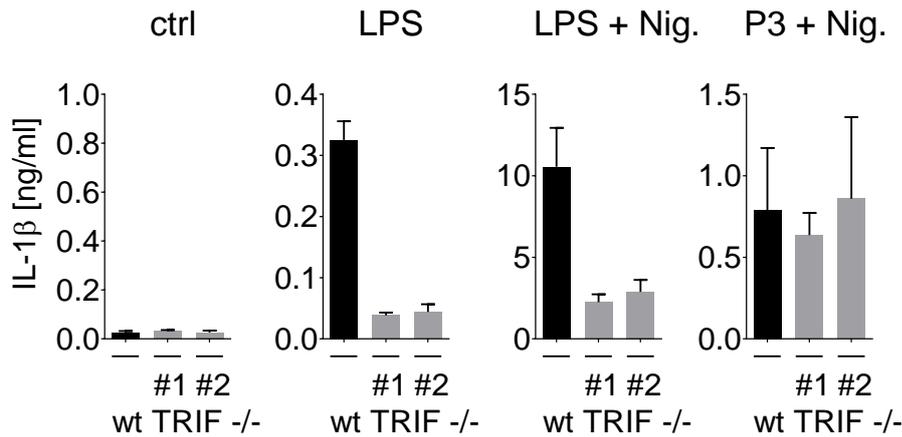


Abbildung 27: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 26

Wildtyp und *TRIF*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, LPS + Nigericin oder P3(=Pam3CSK) + Nigericin stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. n=4-5.

8.5.4 Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende *E. coli* ist partiell abhängig von MyD88.

Toll-like Rezeptoren sind zentral in der Erkennung von Bakterien involviert⁵⁶. Das Adaptermolekül MyD88 vermittelt die Signale aller TLRs, mit Ausnahme von TLR3⁵⁶. Daher untersuchten wir die Rolle von MyD88 in der IL-1β Produktion. *MYD88*^{-/-} BlaER1-Monozyten produzierten in allen unseren Kontrollbedingungen und nach Stimulation mit OMV kein IL-1β (**Abbildung 28**). Lediglich nach Stimulation mit lebenden *E. coli* produzierten sie etwa die Hälfte der wildtyp BlaER1-Monozyten (**Abbildung 28**). Es zeigte sich, dass MyD88 sowohl notwendig war für die Induktion von pro-IL-1β nach Stimulation mit LPS alleine, als auch für die Induktion von IL-1β durch den TLR8-Agonisten CL075. Lebende *E. coli* hingegen konnten auch in den *MYD88*^{-/-} BlaER1-Monozyten noch intrazelluläres pro-IL-1β induzieren (**Abbildung 28**). Da MyD88 als Adaptermolekül von TLR4 und TLR8 fungiert, untersuchten wir die Funktion dieser Rezeptoren bei der Aktivierung des Inflammasoms durch lebende Bakterien.

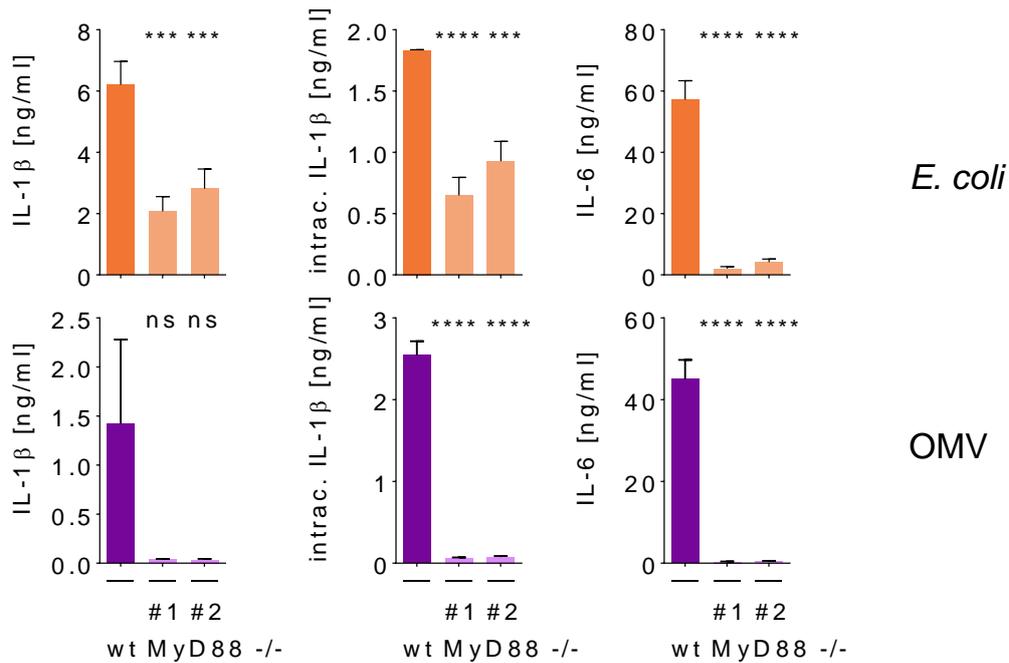


Abbildung 28: Partielle Abhängigkeit von MyD88 in der Induktion von IL-1 β durch lebende *E. coli*

Wildtyp und *MyD88*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* oder mit OMV stimuliert. Zytokine wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweifweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4-5 für IL-1 β und IL-6, n=2 für intrazelluläres IL-1 β (ns; nicht signifikant, ***, p<0.001, ****; p<0.0001).

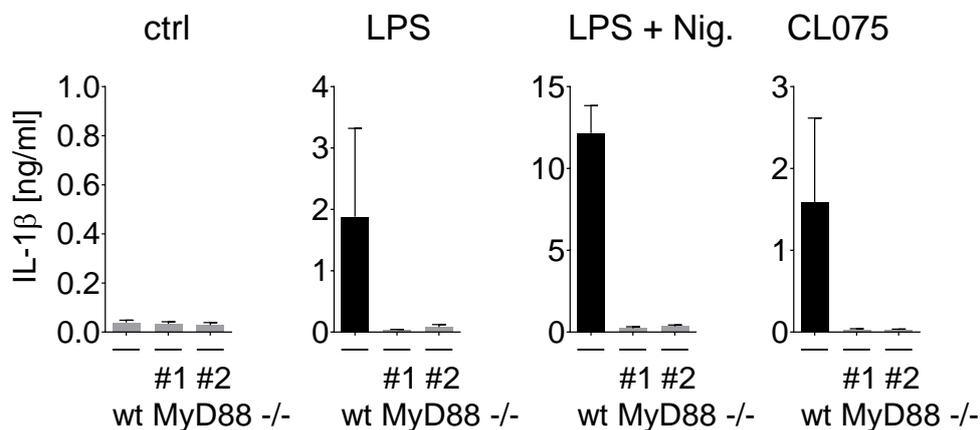


Abbildung 29: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 28

Wildtyp und *MyD88*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, CL075 oder LPS + Nigericin stimuliert. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. n=4-5.

8.6 TLR4 ist anteilig an der Induktion von intrazellulärem pro-IL-1 β durch lebende *E. coli* beteiligt und essentiell für die OMV-induzierte Inflammasonaktivierung.

Die IL-1 β Produktion in *TLR4*^{-/-} BlaER1-Monozyten nach Stimulation mit OMV und toten *E. coli* ist aufgehoben und deutlich reduziert nach Infektion mit lebenden *E. coli* (**Abbildung 30**). In den Kontrollbedingungen zeigte sich wie erwartet keine IL-1 β Produktion nach Stimulation mit LPS und LPS + Nigericin in *TLR4*^{-/-} BlaER1-Monozyten (**Abbildung 31**). Pam3CSK + Nigericin (TLR2-Agonist + NLRP3 Stimulus) sollte in *TLR4*^{-/-} BlaER1-Monozyten eigentlich die gleiche Menge an IL-1 β induzieren wie in den wildtyp BlaER1-Monozyten, es zeigte sich jedoch eine Reduktion (**Abbildung 31**). Daher ist davon auszugehen, dass der gesamte TLR4-Effekt in diesem Experiment eher überschätzt wird.

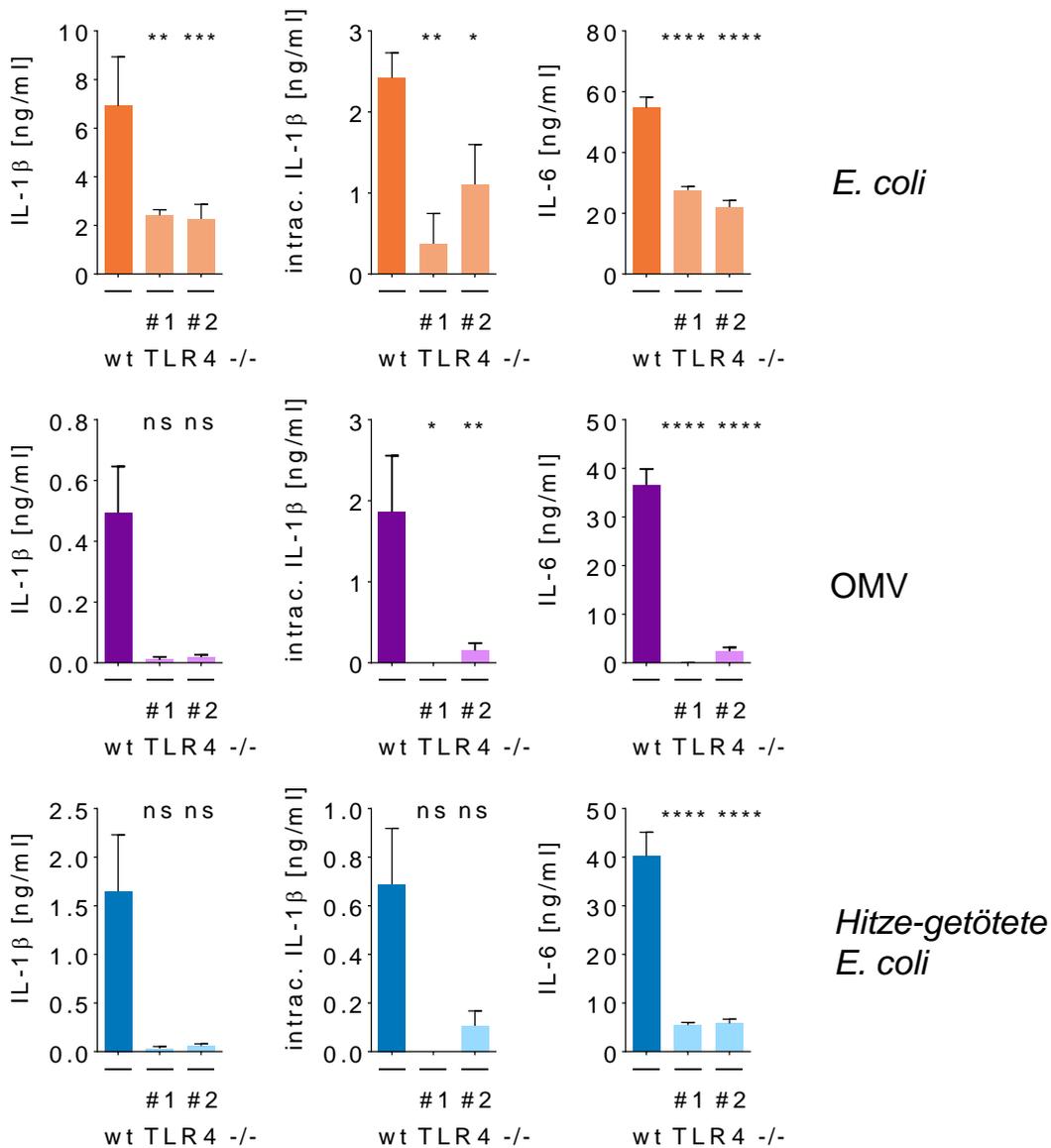


Abbildung 30: Rolle von TLR4 in der Induktion von IL-1 β durch lebende *E. coli*, OMV und Hitze-getötete *E. coli*

Wildtyp und *TLR4*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden oder toten *E. coli* infiziert oder mit OMV stimuliert. IL-1 β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen, intrazelluläres IL-1 β wurden aus den Zelllysaten nach Abnahme der Überstände mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=2-3 für *TLR4*^{-/-} Klon #1, n=4-5 für wt und *TLR4*^{-/-} Klon #2. (ns; nicht signifikant, *; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001).

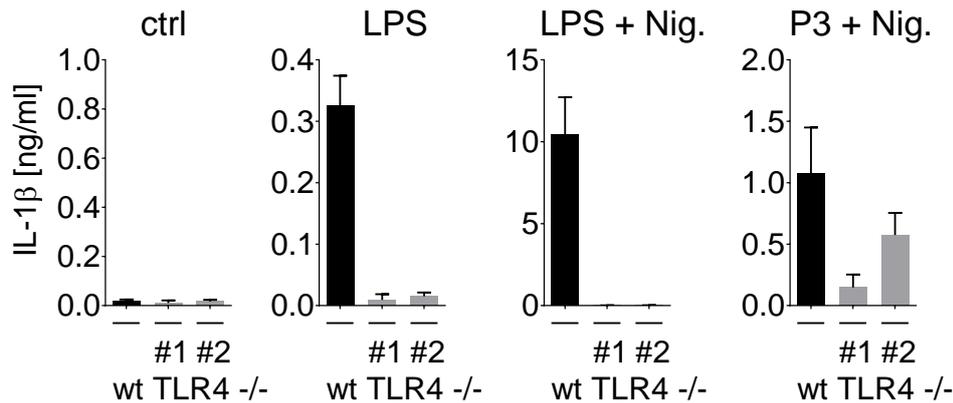


Abbildung 31: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 30

Wildtyp und *TLR4*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, LPS + Nigericin oder Pam3CSK + Nigericin stimuliert. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. n=4-5.

Folgerung lässt sich daraus, dass LPS in toten *E. coli* und in OMV wohl das dominante Molekül für die Inflammation in humanen Monozyten ist. Dazu passen auch die Befunde aus den primären, humanen Monozyten, die zeigen, dass *E. coli* OMV deutlich mehr IL-1β induzieren als LPS defiziente (*ClearColi*)-OMV und dass tote *ClearColi* im Gegensatz zu toten wildtyp K12 *E. coli* überhaupt kein IL-1β induzieren (Abbildung 6, Abbildung 12).

8.7 Lebende Bakterien aktivieren ein alternatives NLRP3-Inflammasom via TLR8.

TLR8 ist ein endosomaler Rezeptor, der Degradationsprodukte von RNA erkennt¹⁸. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass menschliche Monozyten lebende von toten Bakterien durch TLR8-vermittelte Detektion von bakterieller RNA unterscheiden¹³. Die Rolle von TLR8 bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms war weitgehend unklar. Die Produktion von IL-1β war circa um die Hälfte reduziert nach Infektion von *TLR8*^{-/-} mit lebenden *E. coli* im Vergleich zu wildtyp BlaER1-Monozyten (Abbildung 32). Die Reduktion konnte nicht auf eine fehlendes pro-IL-1β (Priming) in *TLR8*^{-/-} BlaER1-Monozyten zurückgeführt werden, da das intrazelluläre IL-1β nicht vermindert war (Abbildung 32). Bei OMV ließ sich keine TLR8 Abhängigkeit der IL-1β Produktion feststellen (Abbildung 32). Alternative, LPS vermittelte Inflammation und klassische Inflammation mittels LPS +

Nigericin war wie erwartet unabhängig von TLR8, während die IL-1 β Produktion nach Stimulation mit dem TLR8-Liganden CL075 in *TLR8*^{-/-} Zellen vollständig aufgehoben war (Abbildung 33).

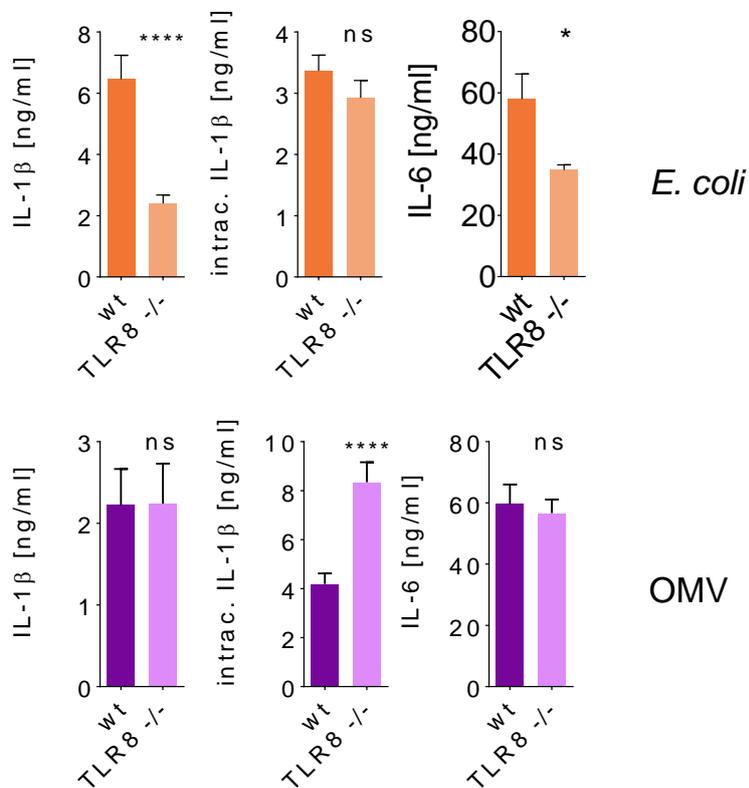


Abbildung 32: IL-1 β Produktion nach Stimulation mit lebenden *E. coli* ist partiell abhängig von TLR8.

Wildtyp und *TLR8*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* infiziert oder mit OMV stimuliert. IL-1 β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen, intrazelluläres IL-1 β wurde aus den Zelllysaten nach Abnahme der Überstände mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Sidak's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=6. (ns; nicht signifikant, *; p<0.05, ****; p<0.0001).

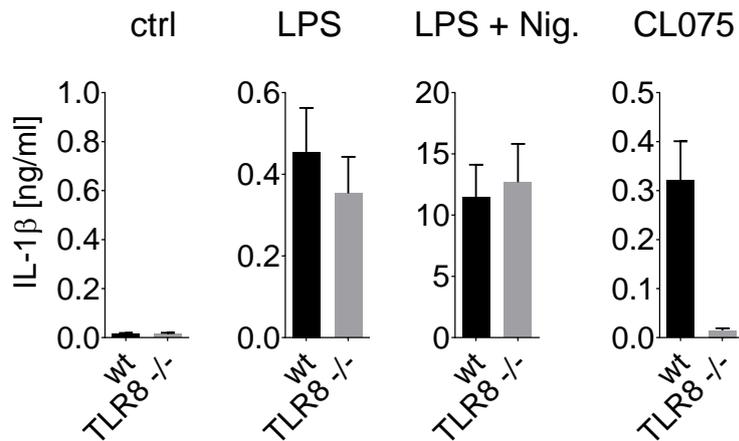


Abbildung 33: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 32

Wildtyp und *TLR8*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit LPS, LPS + Nigericin oder dem TLR7/8 Agonist CL075 stimuliert. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. n=6.

Neben TLR8 ist zelltypabhängig auch TLR7 an der Erkennung von einzelsträngiger RNA beteiligt¹⁸. Daher untersuchten wir, ob TLR7 auch einen Einfluss auf die IL-1β Produktion in Reaktion auf lebende Bakterien hat. Nach Infektion mit lebenden *E. coli* zeigte sich in TLR7+TLR8 Doppelknockout-BlaER1 Monozyten jedoch keine weitere Reduktion der IL-1β Level im Vergleich zu einfachen *TLR8*^{-/-} Zellen (**Abbildung 34**). In diesem Experiment zeigte sich auch, dass, im Gegensatz zur IL-1β Produktion, Zelltod nach Infektion mit lebenden *E. coli* oder nach Stimulation mit dem TLR8 Agonisten CL075 nicht abhängig von TLR8 war (**Abbildung 34**). IL-1β Produktion nach LPS, als alternativer TLR4-Inflammasom Trigger und LPS+Nigericin, als Stimulus für kanonische NLRP3-Inflammasomaktivierung, waren unbeeinträchtigt in *TLR7x8*^{-/-} Zellen (**Abbildung 35**).

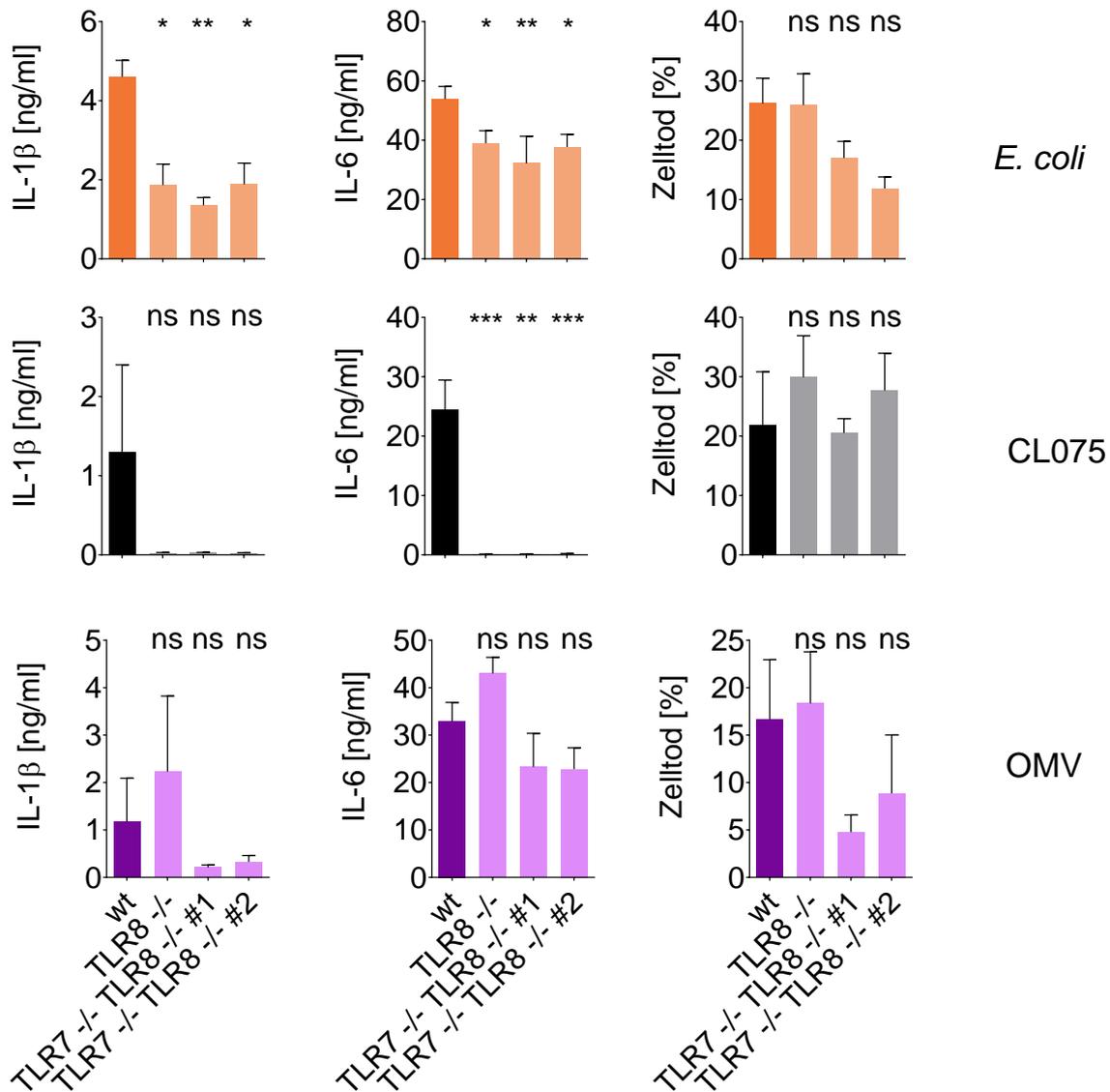


Abbildung 34: Zelltodinduktion von lebenden *E. coli* ist nicht abhängig von TLR8.

Wildtyp-, TLR8 Knockout-, und TLR7+TLR8 Doppelknockout-BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *E. coli* infiziert oder mit OMV oder dem TLR8 Liganden CL075 stimuliert. IL-1β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen. Der Zelltod wurde mittels Adenylat-Kinase-Freisetzungssassay bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Dunnet's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4-5. (ns; nicht signifikant, *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

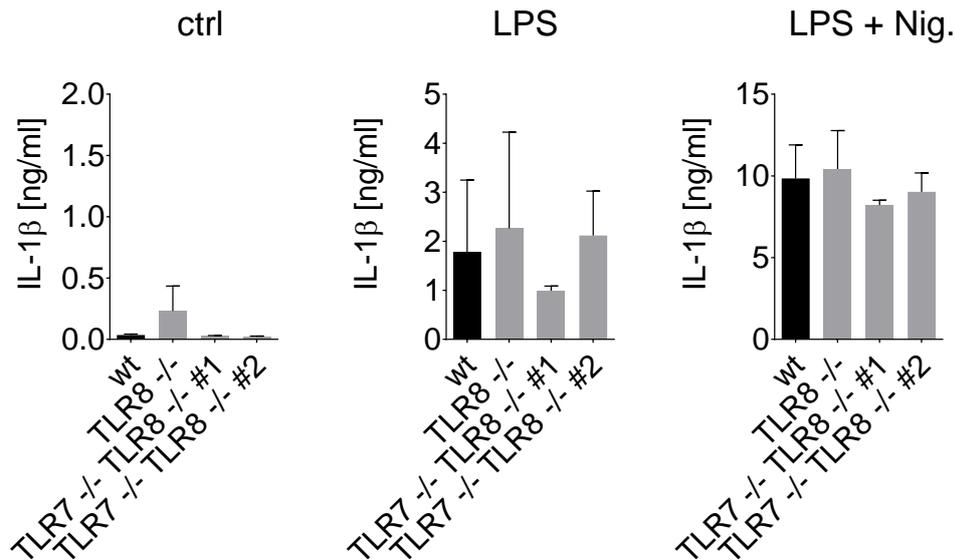


Abbildung 35: Kontrollbedingungen für das Experiment aus Abbildung 34

Wildtyp-, TLR8 Knockout-, und TLR7+TLR8 Doppelknockout-BlaER1-Monozyten wurden mit LPS oder mit LPS + Nigericin stimuliert. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert \pm Standardfehler. n=4-5.

Da wir bereits einen Effekt von LPS auf die alternative Inflammassomaktivierung – unabhängig von bakterieller Vitalität – nachgewiesen hatten, jedoch die RNA- und Vitalitäts-abhängige Inflammassomaktivierung selektiv untersuchen wollten, verwendeten wir ein LPS-unabhängiges System. Dazu führten wir das gleiche Experiment noch einmal mit LPS-defizienten *E. coli* (*ClearColi*) durch. Außerdem isolierten wir bakterielle RNA aus *ClearColi*, um eine mögliche Kontamination bakterieller RNA mit LPS auszuschließen.

Die IL-1 β Produktion nach Infektion mit *ClearColi* war nahezu komplett TLR8 abhängig (**Abbildung 36**). Ebenso zeigte sich, dass die Induktion von IL-1 β durch transfizierte *ClearColi* RNA fast komplett TLR8 abhängig ist (**Abbildung 36**). Die Kontrollbedingungen LPS und MPLA, beides selektive TLR4-Agonisten, zeigten keine TLR8-Abhängigkeit (**Abbildung 36**).

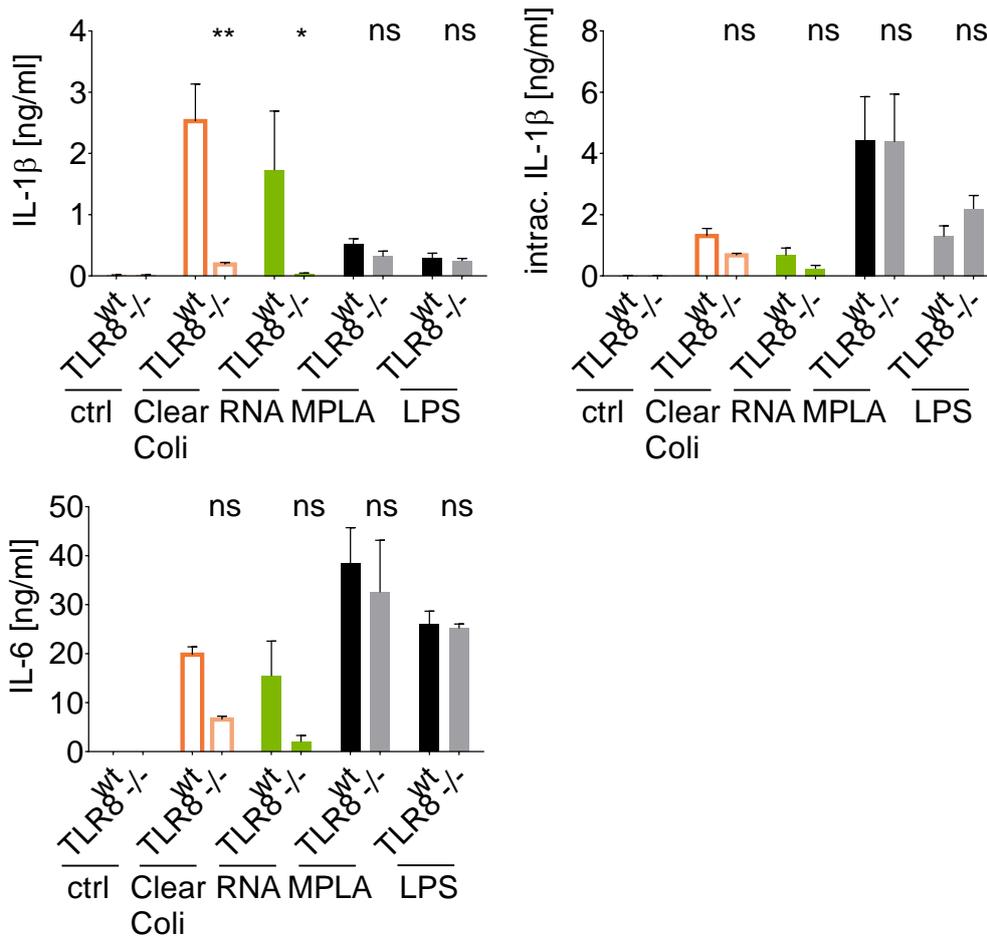


Abbildung 36: LPS-defiziente *E. coli* (*ClearColi*) und *ClearColi*-RNA induzieren TLR8-abhängig IL-1β.

Wildtyp und *TLR8*^{-/-} BlaER1-Monozyten wurden mit lebenden *ClearColi*, *ClearColi* RNA oder als Kontrolle mit den TLR4 Agonisten LPS oder MPLA stimuliert. IL-1β und IL-6 wurden aus den Überständen mittels ELISA gemessen, intrazelluläres IL-1β wurde aus den Zelllysaten nach Abnahme der Überstände mittels ELISA gemessen. Die Fehlerbalken repräsentieren Mittelwert ± Standardfehler. Statistisch getestet wurde mit einer Zweiweg-Varianzanalyse, gefolgt von Sidak's Post-Hoc Test für Mehrfaches Testen. n=4-6. (ns; nicht signifikant, *, p<0.05, **, p<0.01).

9 Diskussion:

9.1 Zusammenfassung und Einschränkungen der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit haben wir die Mechanismen der Inflammasomaktivierung in menschlichen Monozyten durch bakterielle Stimuli, insbesondere durch lebende Bakterien und durch bakterielle RNA untersucht.

Hierbei konnten wir eine bisher wenig untersuchte TLR8-vermittelte Variante der „alternativen“ Inflammasomaktivierung beschreiben. Lebende Bakterien aktivieren über bakterielle RNA in menschlichen Monozyten den endosomalen RNA-Rezeptor TLR-8. Dies führt über bislang noch unvollständig geklärte Mechanismen zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und Freisetzung von großen Mengen IL-1 β , jedoch ohne Bildung eines Pyroptosoms und ohne relevante Pyroptose.

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene lebende Bakterien in menschlichen Monozyten eine deutlich robustere IL-1 β Produktion stimulieren, als Hitze-inaktivierte, d.h. tote Bakterien (**Abbildung 5**). Für diese starke IL-1 β Freisetzung wird das NLRP3-Inflammasom aktiviert. Es zeigte sich, dass bakterielle RNA, welche nur in relevanter Menge in lebenden Bakterien vorkommt, für die NLRP3-Inflammasomaktivierung eine zentrale Rolle spielt (**Abbildung 36**). Aufgereinigte bakterielle RNA kann ebenfalls das NLRP3-Inflammasom aktivieren (**Abbildung 7**). Die NLRP3-Inflammasomaktivierung in primären, humanen Monozyten durch bakterielle RNA, OMV und lebende *E. coli* zeigt Charakteristika der alternativen Inflammasomaktivierung (**Abbildung 14**, **Abbildung 16**).

Es ist bekannt, dass LPS in humanen Monozyten ein alternatives NLRP3-Inflammasom über TLR4 und TRIF aktivieren kann³¹. Lebende und tote *E. coli* enthalten funktionelles LPS⁹ und aktivieren daher, wie erwartet, ebenfalls diesen Signalweg in humanen BlaER1-Monozyten (**Abbildung 26**, **Abbildung 30**).

Zusätzlich aktivieren jedoch lebende *E. coli* durch Ihre RNA einen TLR8- und MyD88-abhängigen Signalweg, welcher für die Erkennung von bakterieller Vitalität verantwortlich ist¹³(**Abbildung 32**). Zusammen führt dies zu einer deutlich stärkeren NLRP3-Inflammasomaktivierung von lebenden im Vergleich zu toten Bakterien (**Abbildung 5**).

OMV, die neben Nukleinsäuren und Proteinen v.a. große Mengen LPS enthalten¹⁹, aktivieren auch den Signalweg über TLR4 und TRIF (**Abbildung 26**, **Abbildung 30**). Wir sahen aber ebenfalls eine partielle Abhängigkeit der IL-1 β Freisetzung durch *E. coli* OMV von Caspase-4 (**Abbildung 20**), was eine nicht-kanonische NLRP3-Inflammasomaktivierung nahelegt. Jedoch fehlten die dafür typischen Charakteristika Zelltod, Abhängigkeit vom Kaliumefflux und Pyroptosomformierung (**Abbildung 14**, **Abbildung 16**).

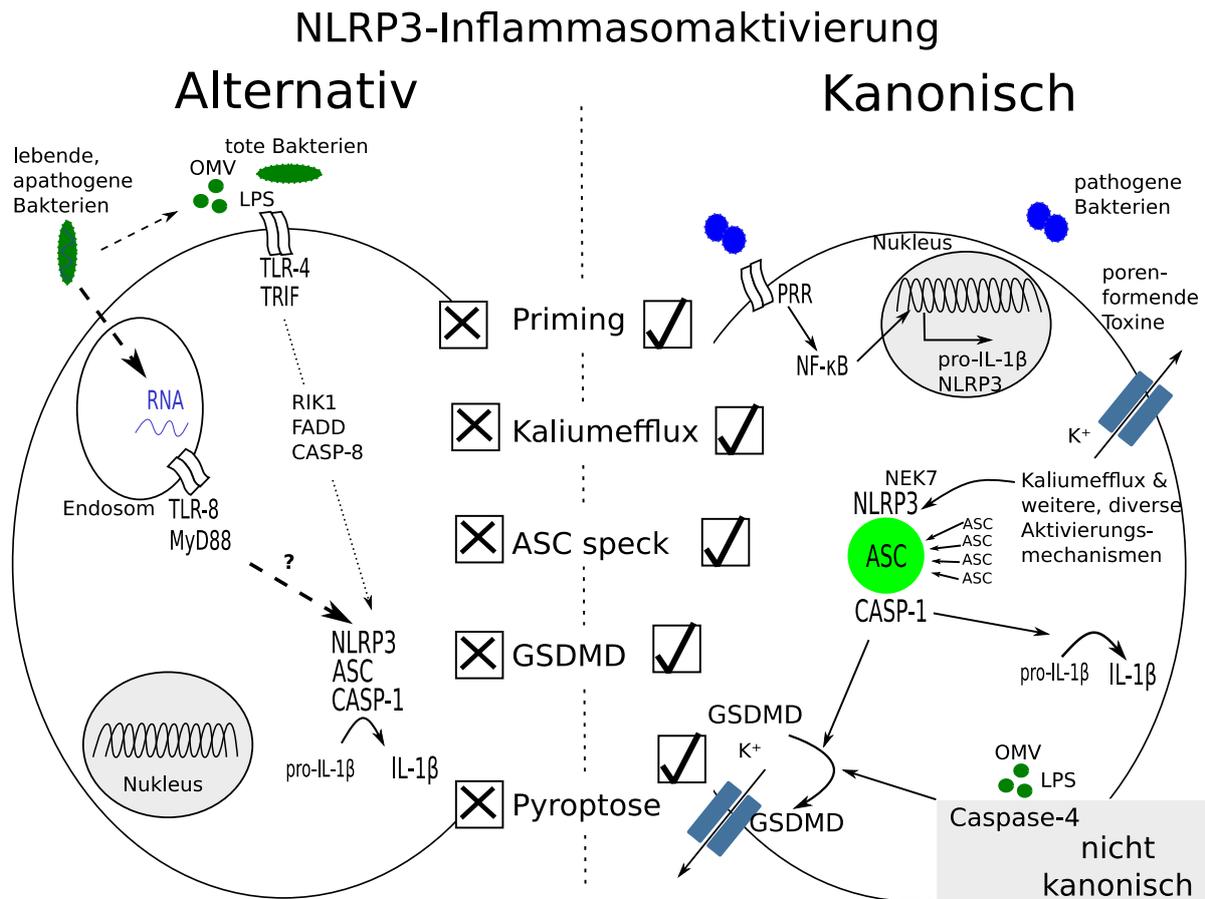


Abbildung 37: Lebende Bakterien aktivieren ein alternatives NLRP3-Inflammasom via TLR8

In unseren Experimenten zeigte sich, dass lebende *E. coli* in humanen Monozyten über ihre RNA ein alternatives Inflammasom via TLR8 und MyD88 aktivieren. Zusätzlich aktivieren sie genauso wie tote *E. coli* über ihr LPS, welches sich in der äußeren Membran und damit auch in ihren OMVs befindet, ein alternatives Inflammasom über TLR4, TRIF, RIPK1, FADD und CASP-8 wie bereits bei Gaidt *et al.* beschrieben³¹. Diese alternative Inflammasomaktivierung benötigt nur ein Signal, keinen Kaliumefflux und führt nicht zur Bildung eines ASC Speck (= Pyroptosom). Bei der alternativen Inflammasomaktivierung wird Gasdermin D (=GSDMD) nicht aktiviert und führt somit nicht zum inflammatorischen Zelltod (=Pyroptose)⁴⁹. Alle diese Merkmale gelten nun genau gegenteilig für die kanonische und nicht-kanonische Inflammasomaktivierung. Ein Primingsignal bspw. über einen Mustererkennungsrezeptor (=PRR) wird benötigt und führt über NF-κB zur Transkription von pro-IL-1β und NLRP3²³. Die Aktivierungsmechanismen von NLRP3 sind vielfältig und komplex, wobei der Kaliumefflux durch porenformende Toxine ein Beispiel ist²³. NEK7 ist ebenfalls essentieller Bestandteil des NLRP3-Inflammasoms²⁶. Intrazelluläres LPS, z.B. durch OMV, aktiviert das nicht-kanonische Inflammasom über CASP-4^{43, 55}.

Im Folgenden möchte ich einige Einschränkungen der Ergebnisse diskutieren. Der Großteil unserer Experimente wurde mit *E. coli* durchgeführt. Wir glauben, dass die Ergebnisse zur alternativen, TLR8-vermittelten Inflammasomaktivierung auch auf andere apathogene Bakterien zutreffen werden. Dies haben wir aber noch nicht gezeigt und bleibt eine Aufgabe für die Zukunft.

Die Aussagen über die beteiligten Rezeptoren und Adaptermoleküle wurden in einer Zelllinie durchgeführt. Weitere Validität könnten sie dadurch erhalten, dass die Experimente in primären, humanen Monozyten wiederholt werden und der Einfluss der beteiligten Rezeptoren und Adapterproteine durch Inhibitoren³¹ oder siRNA¹³ untersucht wird.

Zur Messung der Inflammasomaktivierung gibt es verschiedene Möglichkeiten²³. Man kann das Resultat bestimmen, also beispielsweise IL-1 β oder IL-18 messen, man kann die ASC Specks (Pyroptosome) mikroskopisch darstellen, man kann einen Western Blot für die prozessierte Caspase-1 (p10, p20) oder für prozessiertes IL-1 β durchführen⁵⁷. Langjährige Erfahrungen der Arbeitsgruppe und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass es eine sehr gute Korrelation dieser Messungen gibt^{9, 38}. In dieser Arbeit haben wir bevorzugt die Sekretion von IL-1 β gemessen und das als Korrelat für Inflammasomaktivierung gewertet. Zusätzliche Western Blots der aktivierten Caspase-1 haben wir nicht durchgeführt. Diese würden das Bild vervollständigen. Häufig haben wir als Kontrolle intrazelluläres IL-1 β gemessen und dies als Proxy für pro-IL-1 β genommen. Hier zeigten sich häufig keine signifikanten Unterschiede zwischen verschiedenen Stimulationsbedingungen, wohingegen große Unterschiede in der Sekretion von IL-1 β bestanden (**Abbildung 30**, **Abbildung 32**, **Abbildung 36**). Dies ist ein weiteres deutliches Indiz für die selektive Inflammasomaktivierung, Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β . In einigen Experimenten haben wir Bildung von ASC-Specks mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen und quantifiziert (**Abbildung 14**).

In einigen Experimenten fielen die Kontroll-Stimulationen unerwarteter Weise negativ aus (**Abbildung 20**, **Abbildung 22**, **Abbildung 24**). Zu nennen sind publizierte Stimuli für Caspase-4⁴³, MAVS⁴⁵ und STING⁴⁴, die zumindest in unserem in vitro System mit BLaER1 Zellen nicht die erwarteten Effekte zeigten. Durch persönliche Kommunikation mit anderen Arbeitsgruppen wurde uns bestätigt, dass dies auch in anderen Laboren auffiel. Die korrekte genetische Deletion wurde über genetische Sequenzierung und Western Blot bestätigt (Daten von Tim Vierbuchen, nicht gezeigt). Am Beispiel von Caspase-4 wurde auch deutlich, dass zwar die eigentlich eingesetzte Positivkontrolle, transfiziertes LPS, nicht zur gewünschten Inflammasomaktivierung in BLaR1 Zellen führte, jedoch OMV eine deutliche,

Caspase-4 abhängige IL-1 β Sekretion induzierten (**Abbildung 20**). Dies legt nahe, dass die Caspase-4 Deletion funktionell ist, publizierte Positivkontrollen in unseren Händen jedoch nicht immer im BLaER1 System funktionieren.

9.2 Erkennung der Lebendigkeit - Rolle für OMV?

Das Immunsystem ist in der Lage mit einer skalierten Immunantwort auf Mikroorganismen zu reagieren¹. Die Lebendigkeit ebendieser ist dabei ein entscheidender Faktor für den Umfang der Immunreaktion¹.

In wie fern OMV dabei eine Rolle spielen war eine Frage der vorliegenden Arbeit. OMV sind in der Lage das NLRP3-Inflammasom in Mauszellen zu aktivieren⁵⁵. Die Autoren beschrieben, dass OMV das in ihnen enthaltene LPS ins Zytosol der Immunzellen beförderten und dort zu einer nicht-kanonischen NLRP3-Inflammasomaktivierung über Caspase-11 führten⁵⁵. Tote *E. coli* führten nicht zur NLRP3-Inflammasomaktivierung, diese konnte aber wiederhergestellt werden, wenn die Bakterienlysate in das Zytosol der Immunzellen transfiziert wurden. Deshalb schlugen die Autoren OMV Produktion als ein Merkmal von lebenden Bakterien (vita-PAMP) vor⁵⁵. Dieser Weg wurde weiter untersucht und es konnte gezeigt werden, dass GBP (= guanylate-binding proteins) für die Interaktion zwischen LPS und Caspase-11 entscheidend sind⁵⁸. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass OMV von *Salmonella typhimurium* Flagellin ins Zytosol von murinen Immunzellen befördern können⁵⁹. Dieses führte zu einer robusten, kanonischen NLRC4-Inflammasomaktivierung⁵⁹. OMV können auch als Carrier von Virulenzfaktoren fungieren, die eine mitochondriale Dysfunktion auslösen und über Zwischenschritte zur NLRP3-Inflammasomaktivierung führen⁶⁰.

Wir betrachteten jedoch ein Setting ohne Virulenzfaktoren. In unseren Experimenten an humanen Monozyten konnten wir, entgegen unserer ursprünglichen Hypothese bestätigen, dass OMV zwar das NLRP3-Inflammasom aktivieren, dass jedoch in der Tat LPS und nicht in OMV enthaltene RNA, das dominante Signal für die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch OMV ist (**Abbildung 11**). Dafür spricht, dass Membranvesikel von gram-positiven Bakterien und OMV von LPS-defizienten *ClearColi* Bakterien deutlich weniger IL-1 β induzieren, als OMV von *E. coli* (**Abbildung 12**). Bestätigt werden diese Ergebnisse auch durch die genetischen Daten aus den

Experimenten an BlaER1-Monozyten. Wir konnten zeigen, dass LPS-Erkennung über TLR4, TRIF und zum Teil auch Caspase-4 notwendig ist, um IL-1 β Produktion durch OMV anzuregen (**Abbildung 26**, **Abbildung 30**). Zu beachten ist aber, dass auch die Membranvesikel von gram-positiven Bakterien und die OMV der *ClearColi* ebenfalls noch geringe Mengen IL-1 β induzieren (**Abbildung 12**). Daher ist LPS zwar der dominante Reiz, jedoch nicht der einzige Bestandteil der Membranvesikel, welcher IL-1 β induziert. Passend dazu zeigten wir, dass auch die bakterielle RNA aus OMV zur Inflammasomaktivierung führen kann (**Abbildung 10**). Dies ist auch vor dem Hintergrund interessant, dass sRNAs aus OMV über RNA-Interferenz mit mRNA des Wirtes zur Immunevasion beitragen können²⁰. Hierbei könnte die NLRP3-Inflammasomaktivierung in Reaktion auf OMV RNA ein Gegenmechanismus sein. Für die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende *E. coli* scheinen OMV in unseren Experimenten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, wie der Vergleich der IL-1 β Produktion in Reaktion auf *E. coli* Stämme mit unterschiedlicher Vesikulationsrate zeigte (**Abbildung 13**). Außerdem war Caspase-4 zwar für OMV-induzierte IL-1 β Produktion essentiell, spielte aber für die IL-1 β Induktion durch lebende *E. coli* keine Rolle (**Abbildung 20**). Im Gegensatz dazu ist TLR8 für Inflammasomaktivierung durch lebende *E. coli* relevant, nicht aber für die IL-1 β Induktion durch OMV (**Abbildung 32**). Zusammengenommen sprechen diese beiden Befunde eher für eine untergeordnete Rolle der OMV bei der NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende gramnegative Bakterien in humanen Monozyten. Im Gegensatz dazu hatte sich in der Studie von Vanaja *et al.* eine große Relevanz der OMV für die NLRP3-Inflammasomaktivierung in murinen Immunzellen gezeigt⁵⁵.

9.3 TLR8 als Schlüsselrezeptor für die Erkennung bakterieller Vitalität

Unsere Daten reihen sich ein in zunehmende Publikationen zur Rolle von TLR8 als Sensor mikrobieller Lebendigkeit, wie in den Übersichtsarbeiten von Ugolini und Sander⁶ und Vierbuchen, Stein und Heine¹⁸ zusammengefasst, auf denen der folgende Absatz beruht.

TLR8 ist ein endosomaler Rezeptor und erkennt Einzelstrang-RNA⁶¹. Detaillierte strukturelle Analysen ergaben, dass TLR8 nicht intakte RNA-Moleküle, sondern

Degradationsproduktion von RNA erkennt¹⁶. Die Expression des Rezeptors in verschiedene Zelltypen variiert z.T. stark, in Abhängigkeit von der Spezies¹⁸. Aufgrund einer Deletion von fünf Aminosäuren, kann der TLR8 Rezeptor von Mäusen und Ratten nicht durch Einzelstrang-RNA oder andere bekannte TLR8 Agonisten aktiviert werden⁶². Auch wenn die Erkennung von Nukleinsäuren zu Beginn vor allem wichtig für die Erkennung von Viren schien, ist mittlerweile klar, dass RNA Erkennung über TLR8 auch für die Erkennung einer Reihe von pathogenen Bakterien von Bedeutung ist¹⁸. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Erkennung von bakterieller RNA via TLR8 für die Immunantwort humaner Monozyten gegenüber *Streptococcus pyogenes* essentiell ist⁶³. Eine weitere Studie zeigte, dass TLR8 ebenso ein entscheidender Rezeptor für die Erkennung von Gruppe B Streptokokken ist, kam aber im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zu dem Schluss, dass TLR8 für die Erkennung von lebenden *E. coli* nicht relevant ist⁶⁴. Dass TLR8 bakterielle Lebendigkeit erkennt und es in der Folge zur Differenzierung von folliculären T-Helferzellen kommt, konnten Ugolini *et al.* zeigen¹³. Für diesen Mechanismus ist die TLR8-abhängige Induktion von IL-12 essentiell¹³. Jedoch spielt IL-1 β möglicherweise eine unterstützende Rolle, da die Polarisierung von T folliculären Helferzellen durch humane Monozyten durch die Zugabe von IL-1 β neutralisierenden Antikörpern abgeschwächt werden konnte¹³. Somit scheint IL-1 β in diesem Prozess nicht ausreichend, aber verstärkend zu wirken¹³.

Spezifische TLR7/8 Agonisten werden zunehmend als Impfstoffadjuvantien diskutiert⁶. TLR8 Liganden zeigen z.B. eine starke Adjuvantwirkung in Rhesusaffen⁶⁵. Die Zugabe von TLR8 Agonisten konnte die Titer von spezifischen IgG-Antikörpern nach Impfung mit dem Pneumokokkenkonjugatimpfstoff PCV13 deutlich steigern⁶⁵. Wurden die Rhesusaffen direkt bei Geburt geimpft, erreichten sie deutlich früher als ohne zusätzlichen TLR7/8 Agonisten protektive Level an spezifischen IgG-Antikörpern⁶⁵. Dies ist besonders erstaunlich, da die Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität durch Adjuvantien bei Neugeborenen in der Regel sehr schwierig ist⁶⁵.

Dazu passend wurde aus einer Fall-Kontrollstudie berichtet, dass ein TLR8 Polymorphismus mit erhöhter Aktivität mit Schutz vor Pulmonaler Tuberkulose assoziiert ist¹³. Interessanterweise erklärte sich dieser Effekt durch die Subgruppe, die den Lebendimpfstoff BCG erhalten hatte¹³.

9.4 TLR8-vermittelte Inflammasomaktivierung

Zentraler Befund dieser Arbeit ist die TLR8-vermittelte „alternative“ NLRP3-Inflammasomaktivierung durch lebende, avirulente Bakterien wie *E. coli*.

TLR8-vermittelte Inflammasomaktivierung ist noch nicht lange bekannt. Vierbuchen *et al.* konnten zeigen, dass das Archaeon *Methanosphaera stadtmanae* das NLRP3-Inflammasom aktivieren kann⁴¹. Dabei wird genau wie in unseren Daten zu lebenden apathogenen Bakterien, die RNA des Archaeons über TLR8 erkannt⁴¹. Archaeen werden als eigene Domäne des Lebens neben den Bakterien und den Eukaryoten klassifiziert und es sind bis heute keine humanpathogenen Archaeen bekannt⁴¹. Dies passt zu unserem Befund, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasom durch RNA im Sinne einer skalierten Immunantwort unabhängig von der Virulenz des Mikroorganismus abläuft.

Vorher wurde bereits beschrieben, dass HIV-1 IL-1 β in humanen Monozyten induziert und dass dafür TLR8 und NLRP3 notwendig sind⁶⁶. Die Autoren interpretierten ihre Daten dahingehend, dass TLR8 entscheidend für die Induktion von pro-IL-1 β war⁶⁶. Im Gegensatz dazu induzieren in unseren Daten lebende *E. coli* in *TLR8*^{-/-} BlaER1-Monozyten vergleichbare Mengen an intrazellulärem IL-1 β , unserem Proxy für pro-IL-1 β , jedoch wird deutlich weniger IL-1 β freigesetzt verglichen mit TLR8-kompetenten wt-BlaER1-Monozyten (**Abbildung 32**). Ebenso induzieren TLR8-Agonisten wie CL075 alleine bereits IL-1 β ⁴¹. Dies spricht dafür, dass das NLRP3-Inflammasom über einen bisher unbekanntem Mechanismus direkt über TLR8 aktiviert werden kann.

Auch für die Erkennung von mit *Plasmodium falciparum* infizierten Erythrozyten (iRBC) und deren RNA war TLR8 in humanen Monozyten entscheidend⁶⁷. Neben IL-12 produzierten die Monozyten auch IL-1 β und IL-18 in Abhängigkeit von TLR8 nach Stimulation mit iRBC oder RNA von *Plasmodium falciparum*. Dabei kam es nicht zur Pyroptose und es wurde auch kein zweiter Stimulus für die Aktivierung benötigt⁶⁷, alles gut passend zur alternativen Inflammasomaktivierung.

An dieser Stelle bleibt offen, wie der Signalweg zwischen TLR8 und MyD88 auf der einen Seite und NLRP3 auf der anderen Seite abläuft. Zu testen wäre beispielsweise die RIPK1-FADD-CASP8 Achse, welche entscheidend ist für die alternative NLRP3 Inflammasomaktivierung via TLR4³¹ ist. Hier ist die Studie von Campbell *et al.* zu

erwähnen, die zeigt, dass von SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 und HIV-1 abgeleitete ssRNA Sequenzen das NLRP3-Inflammasom über TLR8 in humanen Makrophagen aktivieren⁶⁸. In ihrer Studie läuft der Signalweg dabei tatsächlich über Caspase-8 und RIPK1 und führt nicht zur Pyroptose⁶⁸. Dies passt gut zu unseren und den bisher publizierten Daten zur TLR8 vermittelten alternativen Inflammasomaktivierung. Im Gegensatz zu unseren Daten, zeigte sich allerdings eine Abhängigkeit von der extrazellulären Kaliumkonzentration in dieser Studie und somit eigentlich ein Merkmal der kanonischen Inflammasomaktivierung⁶⁸.

Da der murine TLR8 Rezeptor nicht durch bakterielle RNA und andere bekannte TLR8 Agonisten aktiviert werden kann⁶² sind *in vivo* Daten zur TLR8-vermittelten Inflammasomaktivierung bisher rar. Eine der wenigen Studien konnte zeigen, dass sich in Cynomolgus-Affen erhöhte Serumlevel von IL-1 β und IL-18 nach Administration des TLR8 Agonisten VTX-2337 dosisabhängig zeigen⁶⁹.

Es wäre essentiell zu klären, wie relevant die Rolle von TLR8 im Kontext verschiedener Infektionen für die Inflammasomaktivierung *in vivo* ist. Es gibt verschiedene bekannte TLR8 Polymorphismen, die beispielsweise mit der Suszeptibilität für pulmonale Tuberkulose oder Krim-Kongo-Fieber assoziiert sind⁷⁰. Die Rolle von IL-1 β in diesem Zusammenhang ist bisher aber unklar. Es wäre insbesondere von Interesse, den Einfluss von TLR8-Polymorphismen auf die IL-1 β Produktion bei bakteriellen Infektionen zu untersuchen.

9.5 Ist die „alternative“ Inflammasomaktivierung eher die Regel als die Ausnahme?

In unseren Untersuchungen zeigte sich, dass lebende Bakterien das NLRP3-Inflammasom aktivieren und zu einer robusten Sekretion von IL-1 β führen, aber ohne einen signifikanten Anstieg des inflammatorischen Zelltods zu verursachen, wie häufig bei pathogenen Bakterien oder Toxinen beobachtet³⁵. Diese Form der Inflammasomaktivierung wurde von Gaidt *et al.* als „alternatives“ Inflammasom bezeichnet und bislang nur in menschliche Zellen, nicht in Nagerzellen beschrieben³¹.

Insgesamt stellt sich jedoch die Frage, ob diese sogenannte „alternative“ Inflammasomaktivierung nicht deutlich relevanter und herkömmlicher ist als es der Name „alternativ“ nahelegt. Im Sinne einer skalierten Immunantwort scheint es

intuitiv, dass ein so wichtiges Zytokin wie IL-1 β auf zellulärer Ebene nicht nur über einen Alles-oder-Nichts Mechanismus freigesetzt werden kann, sondern auch in geringeren Mengen und vor allem ohne den unwiederbringlichen Zelltod der freisetzenden Zellen. Gaidt *et al.* beschrieben das alternative Inflammasom zum ersten Mal am Beispiel von TLR4 und LPS³¹. Die NLRP3-Inflammasomaktivierung durch RNA sowohl von Archaeen⁴¹, Viren⁶⁸, Plasmodien⁶⁷ und Bakterien via TLR8 zeigt nun ebenfalls Charakteristika der alternativen Inflammasomaktivierung, wie die Entkopplung von Pyroptose, der Unabhängigkeit von extrazellulären Kaliumkonzentrationen und eine fehlende Ausbildung von ASC Specks (Pyroptosomen) (**Abbildung 37**).

Zwei weitere Befunde von NLRP3-Inflammasomaktivierung ohne Pyroptose und Kaliumefflux heben Gaidt und Hornung in einem Meinungsartikel hervor⁴⁹. Ausgelöst einmal durch die Inhibition und nachfolgende Translokation von Hexokinase ins Zytosol nach der Erkennung von bakteriellem Peptidoglykan⁷¹ und zum zweiten durch oxPAPC, einem bekannten Immunmodulator, welcher Caspase-11 aktiviert⁷². Interessanterweise ist die alternative NLRP3-Inflammasomaktivierung über TLR4 und über TLR8 nicht in murinen Zellen observierbar⁴⁹, sodass Experimente mit humanen Zellen an Bedeutung gewinnen und ein relevanter Teil der bisherigen Inflammasomforschung, der primär an murinen Zellen und mit Stimulantien der „kanonischen“ Inflammasomaktivierung durchgeführt wurde³⁷, nur bedingt übertragbar scheint. Als genetische Definition für alternative Inflammasomaktivierung schlagen Gaidt und Hornung die Unabhängigkeit von Gasdermin D vor⁴⁹. Gasdermin D sorgt bei der klassischen Inflammasomaktivierung durch Porenbildung in der Zellmembran für die Pyroptose²⁸. Der Ausstrom von Kalium aus der Zelle sorgt dann für die Aktivierung von NLRP3²³. Ob die alternative Inflammasomaktivierung über TLR8 ebenfalls Gasdermin D unabhängig abläuft, wurde in der vorliegenden Arbeit noch nicht untersucht und sollte demnach vordringlich getestet werden.

Es erscheint essentiell zu untersuchen, welche Rolle der alternativen NLRP3-Inflammasomaktivierung im Rahmen der homöostatischen Wirts-Mikroorganismus Beziehung im menschlichen Körper zukommt. Es ist verlockend zu spekulieren, dass sie eine große Rolle einnimmt, da sie durch TLR4 und TLR8, zwei zentrale Mustererkennungsrezeptoren, ausgelöst wird (**Abbildung 37**). Wir schlagen vor, dass es sich bei der „alternativen“ Inflammasomaktivierung um einen streng regulierten

Prozess handelt, der im Gegensatz zu pathologischen Stimuli nicht zum inflammatorischen Zelltod wie bei der kanonischen und nicht-kanonischen Inflammasomaktivierung führt (**Abbildung 37**). Wir schlagen vor, dass „alternative“ Inflammasomaktivierung Ausdruck physiologischer Wirts-Mikroben-Interaktionen sein kann, während kanonische und nicht-kanonische Inflammasomaktivierung das Ergebnis pathologischer Prozesse sind (**Abbildung 37**). Es erscheint intuitiv, dass es für den Wirt deutliche Vorteile hat, wenn die Zellen der angeborenen Immunität nach Kontakt mit lebenden Bakterien nicht direkt sterben, sondern mit einer skalierten Immunantwort reagieren¹. So könnten beispielsweise antigenpräsentierende Zellen ihrer klassischen Funktion nachkommen, in den Lymphknoten migrieren und dort adaptive Immunantworten vorbereiten. Als Beispiel für die kanonische Inflammasomaktivierung wäre hingegen die Infektion mit Bakterien zu nennen, die porenformende Toxine produzieren und damit zu einer deutlichen Störung der physiologischen Homöostase führen⁷³.

Jedoch gibt es auch ein Beispiel für eindeutig pathologische alternative Inflammasomaktivierung⁷⁴. Erhöhte Spiegel von Apolipoprotein C3 (ApoC3) gehen mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einher und sie aktivieren ein alternatives NLRP3-Inflammasom in humanen Monozyten über Dimerisierung von TLR2 und TLR4⁷⁴.

9.6 Limitationen und Ausblick

Die wichtigste Limitation der Arbeit ist, dass unsere Aussagen auf reinen Zellkulturdaten beruhen und demnach in ihrer Geltung natürlich beschränkt sind. Sie in einem *in vivo* Modell zu bestätigen, um die Wichtigkeit des Mechanismus zu evaluieren, wäre der nächste Schritt. Allerdings ist hierbei die Wahl eines geeigneten Organismus zu beachten. Häufig verwendete Mausmodelle haben einige Schwächen für unsere Thematik, da alternative NLRP3-Inflammasomaktivierung in ihnen nicht vorkommt³¹. Die nicht-kanonische Inflammasomaktivierung läuft in Mäusen über Caspase-11²⁹, während Caspase-11 in Menschen fehlt und die Funktion durch Caspase-4 übernommen wird⁴³. Des Weiteren kann der TLR8 Rezeptor von Mäusen und Ratten im Gegensatz zum menschlichen TLR8 nicht durch Einzelstrang-RNA oder andere bekannte TLR8 Agonisten aktiviert werden.

Aus diesen Gründen halten wir Untersuchungen in Mäusen zur Funktion der hier beschriebenen Inflammasomaktivierung durch Bakterien und bakterielle RNA für nicht zielführend. Dies könnte auch ein kleiner Teil der Erklärung sein, warum viele Untersuchungen insbesondere zur bakteriellen Sepsis, die häufig in Mausmodellen erhoben wurden, nicht oder nur sehr bedingt auf den Menschen übertragbar sind⁷⁵. Eine Möglichkeit sind humanisierte Mausmodelle, wie sie bei Zewinger *et al.* verwendet wurden⁷⁴. Die Autoren transplantierten humane Monozyten in NOD-SCID (= Non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) Mäuse zur Untersuchung der Relevanz von ApoC3 für die alternative Inflammasomaktivierung und deren Relevanz im Kontext von vaskulären Organschäden⁷⁴. Die Alternative wären Untersuchungen bei Schweinen¹³, Affen⁶⁹ oder Menschen.

Da derzeit kein robuster Parameter zur eindeutigen Messung der alternativen Inflammasomaktivierung *in vivo* existiert, müssten wir uns mit Annäherungen behelfen. Diese könnte beispielsweise das Verhältnis von ASC Specks oder Gasdermin D Level zu IL-1 β sein. Dann könnten Patienten mit bakteriellen Kolonisation und manifesten Infektionen miteinander verglichen werden oder Infektion mit Bakterien, welche bekanntermaßen das kanonische Inflammasom aktivierende Virulenzfaktoren besitzen und solchen ohne jene.

10 Referenzen:

1. Blander, J.M. & Sander, L.E. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nature Reviews Immunology* **12**, 215 (2012).
2. Janeway, C.A. & Medzhitov, R. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology* **20**, 197-216 (2002).
3. Janeway, C.A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **54**, 1-13 (1989).
4. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C.V., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B. & Beutler, B. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 . *Gene. Science* **282**, 2085 (1998).
5. Matzinger, P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology* **12**, 991-1045 (1994).

6. Ugolini, M. & Sander, L.E. Dead or alive: how the immune system detects microbial viability. *Current Opinion in Immunology* **56**, 60-66 (2019).
7. WHO recommendations for routine immunization - summary tables. 3 April 2017 [cited] Available from: http://www.who.int/immunization/policy/immunization_tables/en/
8. Lauvau, G., Vijh, S., Kong, P., Horng, T., Kerksiek, K., Serbina, N., Tuma, R.A. & Pamer, E.G. Priming of Memory But Not Effector CD8 T Cells by a Killed Bacterial Vaccine. *Science* **294**, 1735 (2001).
9. Sander, L.E., Davis, M.J., Boekschoten, M.V., Amsen, D., Dascher, C.C., Ryffel, B., Swanson, J.A., Müller, M. & Blander, J.M. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* **474**, 385 (2011).
10. Moretti, J., Roy, S., Bozec, D., Martinez, J., Chapman, J.R., Ueberheide, B., Lamming, D.W., Chen, Z.J., Horng, T., Yeretssian, G., Green, D.R. & Blander, J.M. STING Senses Microbial Viability to Orchestrate Stress-Mediated Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Cell* **171**, 809-823.e813 (2017).
11. Rodriguez-Rodriguez, N., Castillo, L.A., Landoni, V.I., Martire-Greco, D., Milillo, M.A., Barrionuevo, P. & Fernández, G.C. Prokaryotic RNA Associated to Bacterial Viability Induces Polymorphonuclear Neutrophil Activation. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 306-306 (2017).
12. Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., Williamson, N.A., Purcell, A.W., Dudek, N.L., McConville, M.J., O'Hair, R.A.J., Khairallah, G.N., Godfrey, D.I., Fairlie, D.P., Rossjohn, J. & McCluskey, J. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* **491**, 717-723 (2012).
13. Ugolini, M., Gerhard, J., Burkert, S., Jensen, K.J., Georg, P., Ebner, F., Volkens, S.M., Thada, S., Dietert, K., Bauer, L., Schäfer, A., Helbig, E.T., Opitz, B., Kurth, F., Sur, S., Dittrich, N., Gaddam, S., Conrad, M.L., Benn, C.S., Blohm, U., Gruber, A.D., Hutloff, A., Hartmann, S., Boekschoten, M.V., Müller, M., Jungersen, G., Schumann, R.R., Suttorp, N. & Sander, L.E. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nature Immunology* **19**, 386-396 (2018).
14. Barbet, G., Sander, L.E., Geswell, M., Leonardi, I., Cerutti, A., Iliiev, I. & Blander, J.M. Sensing Microbial Viability through Bacterial RNA Augments T Follicular Helper Cell and Antibody Responses. *Immunity* **48**, 584-598.e585 (2018).
15. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132-1148 (2019).
16. Tanji, H., Ohto, U., Shibata, T., Taoka, M., Yamauchi, Y., Isobe, T., Miyake, K. & Shimizu, T. Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA. *Nature Structural & Molecular Biology* **22**, 109-115 (2015).

17. Eigenbrod, T. & Dalpke, A.H. Bacterial RNA: An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology* **195**, 411 (2015).
18. Vierbuchen, T., Stein, K. & Heine, H. RNA is taking its Toll: Impact of RNA-specific Toll-like receptors on health and disease. *Allergy* **74**, 223-235 (2019).
19. Schwechheimer, C. & Kuehn, M.J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* **13**, 605-619 (2015).
20. Koeppen, K., Hampton, T.H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S.A., Mielcarz, D.W., Demers, E.G., Dolben, E.L., Hammond, J.H., Hogan, D.A. & Stanton, B.A. A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLOS Pathogens* **12**, e1005672 (2016).
21. Broz, P. & Dixit, V.M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology* **16**, 407 (2016).
22. Howard, A.D., Kostura, M.J., Thornberry, N., Ding, G.J., Limjuco, G., Weidner, J., Salley, J.P., Hogquist, K.A., Chaplin, D.D. & Mumford, R.A. IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *The Journal of Immunology* **147**, 2964 (1991).
23. Swanson, K.V., Deng, M. & Ting, J.P.Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature Reviews Immunology* **19**, 477-489 (2019).
24. Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. & Bhakdi, S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *The EMBO Journal* **14**, 1607-1614 (1995).
25. Chen, J. & Chen, Z.J. PtdIns4P on dispersed trans-Golgi network mediates NLRP3 inflammasome activation. *Nature* **564**, 71-76 (2018).
26. Schmid-Burgk, J.L., Chauhan, D., Schmidt, T., Ebert, T.S., Reinhardt, J., Endl, E. & Hornung, V. A Genome-wide CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) Screen Identifies NEK7 as an Essential Component of NLRP3 Inflammasome Activation. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 103-109 (2016).
27. Schmidt, F.I., Lu, A., Chen, J.W., Ruan, J., Tang, C., Wu, H. & Ploegh, H.L. A single domain antibody fragment that recognizes the adaptor ASC defines the role of ASC domains in inflammasome assembly. *Journal of Experimental Medicine* **213**, 771-790 (2016).
28. Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F. & Shao, F. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660-665 (2015).
29. Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Walle, L.V., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., Zhang, J., Lee, W.P., Roose-Girma, M. & Dixit, V.M.

- Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117-121 (2011).
30. Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L. & Shao, F. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187 (2014).
 31. Gaidt, Moritz M., Ebert, Thomas S., Chauhan, D., Schmidt, T., Schmid-Burgk, Jonathan L., Rapino, F., Robertson, Avril A.B., Cooper, Matthew A., Graf, T. & Hornung, V. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* **44**, 833-846 (2016).
 32. Dinarello, C.A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* **281**, 8-27 (2018).
 33. Dinarello, C.A. The IL-1 family of cytokines and receptors in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* **15**, 612-632 (2019).
 34. Tartey, S. & Kanneganti, T.-D. Differential role of the NLRP3 inflammasome in infection and tumorigenesis. *Immunology* **156**, 329-338 (2019).
 35. Witzentrath, M., Pache, F., Lorenz, D., Koppe, U., Gutbier, B., Tabeling, C., Reppe, K., Meixenberger, K., Dorhoi, A., Ma, J., Holmes, A., Trendelenburg, G., Heimesaat, M.M., Bereswill, S., van der Linden, M., Tschopp, J., Mitchell, T.J., Suttorp, N. & Opitz, B. The NLRP3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* **187**, 434 (2011).
 36. Hoffman, H.M., Mueller, J.L., Broide, D.H., Wanderer, A.A. & Kolodner, R.D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome. *Nature Genetics* **29**, 301-305 (2001).
 37. Guo, H., Callaway, J.B. & Ting, J.P.Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine* **21**, 677 (2015).
 38. Helbig, E.T. Receptors and signaling pathways for the detection of viable bacteria by human phagocytes. (2018).
 39. Rapino, F., Robles, E.F., Richter-Larrea, J.A., Kallin, E.M., Martinez-Climent, J.A. & Graf, T. C/EBP α Induces Highly Efficient Macrophage Transdifferentiation of B Lymphoma and Leukemia Cell Lines and Impairs Their Tumorigenicity. *Cell Reports* **19**, 1281 (2017).
 40. Rapino, F., Robles, Eloy F., Richter-Larrea, Jose A., Kallin, Eric M., Martinez-Climent, Jose A. & Graf, T. C/EBP α Induces Highly Efficient Macrophage Transdifferentiation of B Lymphoma and Leukemia Cell Lines and Impairs Their Tumorigenicity. *Cell Reports* **3**, 1153-1163 (2013).
 41. Vierbuchen, T., Bang, C., Rosigkeit, H., Schmitz, R.A. & Heine, H. The Human-Associated Archaeon *Methanosphaera stadtmanae* Is Recognized through Its RNA and

Induces TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. *Frontiers in Immunology* **8** (2017).

42. Aliprantis, A.O., Yang, R.-B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P. & Zychlinsky, A. Cell Activation and Apoptosis by Bacterial Lipoproteins Through Toll-like Receptor-2. *Science* **285**, 736 (1999).
43. Schmid-Burgk Jonathan, L., Gaidt Moritz, M., Schmidt, T., Ebert Thomas, S., Bartok, E. & Hornung, V. Caspase-4 mediates non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *European Journal of Immunology* **45**, 2911-2917 (2015).
44. Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Ramshorn, K., Pinci, F., Zuber, S., O'Duill, F., Schmid-Burgk, J.L., Hoss, F., Buhmann, R., Wittmann, G., Latz, E., Subklewe, M. & Hornung, V. The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell* **171**, 1110-1124.e1118 (2017).
45. Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R., Ozkurede, U., Kim, Y.-G., Arindam, C., Gale, M., Jr., Silverman, R.H., Colonna, M., Akira, S. & Núñez, G. Cytosolic double-stranded RNA activates the NLRP3 inflammasome via MAVS-induced membrane permeabilization and K⁺ efflux. *J Immunol* **193**, 4214-4222 (2014).
46. Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Portillo, F.G.-D., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapat, G., Madueño, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J. & Cossart, P. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* **294**, 849 (2001).
47. Ablasser, A., Poeck, H., Anz, D., Berger, M., Schlee, M., Kim, S., Bourquin, C., Goutagny, N., Jiang, Z., Fitzgerald, K.A., Rothenfusser, S., Endres, S., Hartmann, G. & Hornung, V. Selection of Molecular Structure and Delivery of RNA Oligonucleotides to Activate TLR7 versus TLR8 and to Induce High Amounts of IL-12p70 in Primary Human Monocytes. *The Journal of Immunology* **182**, 6824 (2009).
48. Shehata, M.M., Mostafa, A., Teubner, L., Mahmoud, H.S., Kandeil, A., Elshesheny, R., Boubak, A.T., Frantz, R., Pietra, L.L., Pleschka, S., Osman, A., Kayali, G., Chakraborty, T., Ali, A.M. & Mraheil, A.M. Bacterial Outer Membrane Vesicles (OMVs)-Based Dual Vaccine for Influenza A H1N1 Virus and MERS-CoV. *Vaccines* **7** (2019).
49. Gaidt, M.M. & Hornung, V. Alternative inflammasome activation enables IL-1 β release from living cells. *Current Opinion in Immunology* **44**, 7-13 (2017).
50. Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J.W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J. & Alnemri, E.S. The pyroptosome: a supramolecular

- assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death & Differentiation* **14**, 1590-1604 (2007).
51. ClearColi FAQ. 2018-03-09 [cited] Available from: <http://www.clearcoli.com/technology/faqs/>
 52. Sha, W., Mitoma, H., Hanabuchi, S., Bao, M., Weng, L., Sugimoto, N., Liu, Y., Zhang, Z., Zhong, J., Sun, B. & Liu, Y.-J. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 16059 (2014).
 53. Mendelsohn, J. & Tissieres, A. Variations in the amount of ribonucleoprotein particles in *Escherichia coli Bba* - *General Subjects* **35**, 248-250 (1959).
 54. Poirel, L., Jayol, A. & Nordmann, P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* **30**, 557 (2017).
 55. Vanaja, Sivapriya K., Russo, Ashley J., Behl, B., Banerjee, I., Yankova, M., Deshmukh, Sachin D. & Rathinam, Vijay A.K. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* **165**, 1106-1119 (2016).
 56. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology* **5**, 461-461 (2014).
 57. Jakobs, C., Bartok, E., Kubarenko, A., Bauernfeind, F. & Hornung, V. Immunoblotting for Active Caspase-1. In: De Nardo, C.M. & Latz, E. (eds). *The Inflammasome: Methods and Protocols*. Humana Press: Totowa, NJ, 2013, pp 103-115.
 58. Santos, J.C., Dick, M.S., Lagrange, B., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Meunier, E., Pelczar, P., Henry, T. & Broz, P. LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *The EMBO Journal* **37**, e98089 (2018).
 59. Yang, J., Hwang, I., Lee, E., Shin, S.J., Lee, E.-J., Rhee, J.H. & Yu, J.-W. Bacterial Outer Membrane Vesicle-Mediated Cytosolic Delivery of Flagellin Triggers Host NLRP4 Canonical Inflammasome Signaling. *Frontiers in Immunology* **11**, 2857 (2020).
 60. Deo, P., Chow, S.H., Han, M.-L., Speir, M., Huang, C., Schittenhelm, R.B., Dhital, S., Emery, J., Li, J., Kile, B.T., Vince, J.E., Lawlor, K.E. & Naderer, T. Mitochondrial dysfunction caused by outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria activates intrinsic apoptosis and inflammation. *Nature Microbiology* **5**, 1418-1427 (2020).
 61. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S. Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526 (2004).

62. Liu, J., Xu, C., Hsu, L.-C., Luo, Y., Xiang, R. & Chuang, T.-H. A five-amino-acid motif in the undefined region of the TLR8 ectodomain is required for species-specific ligand recognition. *Molecular Immunology* **47**, 1083-1090 (2010).
63. Eigenbrod, T., Pelka, K., Latz, E., Kreikemeyer, B. & Dalpke, A.H. TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Immunology* **195**, 1092 (2015).
64. Ehrnström, B., Beckwith, K.S., Yurchenko, M., Moen, S.H., Kojen, J.F., Lentini, G., Teti, G., Damås, J.K., Espevik, T. & Stenvik, J. Toll-Like Receptor 8 Is a Major Sensor of Group B Streptococcus But Not Escherichia coli in Human Primary Monocytes and Macrophages. *Frontiers in Immunology* **8**, 1243 (2017).
65. Dowling, D.J., van Haren, S.D., Scheid, A., Bergelson, I., Kim, D., Mancuso, C.J., Foppen, W., Ozonoff, A., Fresh, L., Theriot, T.B., Lackner, A.A., Fichorova, R.N., Smirnov, D., Vasilakos, J.P., Beaurline, J.M., Tomai, M.A., Midkiff, C.C., Alvarez, X., Blanchard, J.L., Gilbert, M.H., Aye, P.P. & Levy, O. TLR7/8 adjuvant overcomes newborn hyporesponsiveness to pneumococcal conjugate vaccine at birth. *JCI Insight* **2** (2017).
66. Guo, H., Gao, J., Taxman, D.J., Ting, J.P.Y. & Su, L. HIV-1 Infection Induces Interleukin-1 β Production via TLR8 Protein-dependent and NLRP3 Inflammasome Mechanisms in Human Monocytes. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 21716-21726 (2014).
67. Coch, C., Hommertgen, B., Zillinger, T., Daßler-Plenker, J., Putschli, B., Nastaly, M., Kümmerer, B.M., Scheunemann, J.F., Schumak, B., Specht, S., Schlee, M., Barchet, W., Hoerauf, A., Bartok, E. & Hartmann, G. Human TLR8 Senses RNA From Plasmodium falciparum-Infected Red Blood Cells Which Is Uniquely Required for the IFN- γ Response in NK Cells. *Frontiers in Immunology* **10**, 371 (2019).
68. Campbell, G.R., To, R.K., Hanna, J. & Spector, S.A. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience* **24**, 102295 (2021).
69. Dietsch, G.N., Lu, H., Yang, Y., Morishima, C., Chow, L.Q., Disis, M.L. & Hershberg, R.M. Coordinated Activation of Toll-Like Receptor8 (TLR8) and NLRP3 by the TLR8 Agonist, VTX-2337, Ignites Tumoricidal Natural Killer Cell Activity. *PLOS ONE* **11**, e0148764 (2016).
70. Skevaki, C., Pararas, M., Kostelidou, K., Tsakris, A. & Routsias, J.G. Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. *Clinical & Experimental Immunology* **180**, 165-177 (2015).
71. Wolf, A.J., Reyes, C.N., Liang, W., Becker, C., Shimada, K., Wheeler, M.L., Cho, H.C., Popescu, N.I., Coggeshall, K.M., Arditi, M. & Underhill, D.M. Hexokinase Is an Innate Immune Receptor for the Detection of Bacterial Peptidoglycan. *Cell* **166**, 624-636 (2016).

72. Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Broggi, A., Ruan, J., Shi, J., Donado, C.A., Shao, F., Wu, H., Springstead, J.R. & Kagan, J.C. An endogenous caspase-11 ligand elicits interleukin-1 release from living dendritic cells. *Science* **352**, 1232 (2016).
73. Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M. & Dixit, V.M. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232 (2006).
74. Zewinger, S., Reiser, J., Jankowski, V., Alansary, D., Hahm, E., Triem, S., Klug, M., Schunk, S.J., Schmit, D., Kramann, R., Körbel, C., Ampofo, E., Laschke, M.W., Selejan, S.-R., Paschen, A., Herter, T., Schuster, S., Silbernagel, G., Sester, M., Sester, U., Aßmann, G., Bals, R., Kostner, G., Jahnke-Dechent, W., Menger, M.D., Rohrer, L., März, W., Böhm, M., Jankowski, J., Kopf, M., Latz, E., Niemeyer, B.A., Fliser, D., Laufs, U. & Speer, T. Apolipoprotein C3 induces inflammation and organ damage by alternative inflammasome activation. *Nature Immunology* **21**, 30-41 (2020).
75. Seok, J., Warren, H.S., Cuenca, A.G., Mindrinos, M.N., Baker, H.V., Xu, W., Richards, D.R., McDonald-Smith, G.P., Gao, H., Hennessy, L., Finnerty, C.C., López, C.M., Honari, S., Moore, E.E., Minei, J.P., Cuschieri, J., Bankey, P.E., Johnson, J.L., Sperry, J., Nathens, A.B., Billiar, T.R., West, M.A., Jeschke, M.G., Klein, M.B., Gamelli, R.L., Gibran, N.S., Brownstein, B.H., Miller-Graziano, C., Calvano, S.E., Mason, P.H., Cobb, J.P., Rahme, L.G., Lowry, S.F., Maier, R.V., Moldawer, L.L., Herndon, D.N., Davis, R.W., Xiao, W., Tompkins, R.G., Inflammation & Host Response to Injury, L.S.C.R.P. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 3507-3512 (2013).

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Moritz Pfeiffer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Alternative NLRP3-Inflammasomaktivierung in humanen Monozyten via TLR8“ 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) 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

12 Lebenslauf

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

13 Publikationsliste

Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection

Christoph B Messner, Vadim Demichev, Daniel Wendisch, Laura Michalick, Matthew White, Anja Freiwald, Kathrin Textoris-Taube, Spyros I Vernardis, Anna-Sophia Egger, Marco Kreidl, Daniela Ludwig, Christiane Kilian, Federica Agostini, Aleksej Zelezniak, Charlotte Thibeault, Moritz Pfeiffer, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke, Christof von Kalle, Archie Campbell, Caroline Hayward, David J Porteous, Riccardo E Marioni, Claudia Langenberg, Kathryn S Lilley, Wolfgang M Kuebler, Michael Mülleler , Christian Drosten, Norbert Suttorp, Martin Witzenrath, Florian Kurth, Leif Erik Sander, Markus Ralser

Cell Systems, 2020

Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment

Jonas Schulte-Schrepping, Nico Reusch, Daniela Paclik, Kevin Baßler, Stephan Schlickeiser, Bowen Zhang, Benjamin Krämer, Tobias Krammer, Sophia Brumhard, Lorenzo Bonaguro, Elena De Domenico, Daniel Wendisch, Martin Grasshoff, Theodore S Kapellos, Michael Beckstette, Tal Pecht, Adem Saglam, Oliver Dietrich, Henrik E Mei, Axel R Schulz, Claudia Conrad, Désirée Kunkel, Ehsan Vafadarnejad, Cheng-Jian Xu, Arik Horne, Miriam Herbert, Anna Drews, Charlotte Thibeault, Moritz Pfeiffer, Stefan Hippenstiel, Andreas Hocke, Holger Müller-Redetzky, Katrin-Moira Heim, Felix Machleidt, Alexander Uhrig, Laure Bosquillon de Jarcy, Linda Jürgens, Miriam Stegemann, Christoph R Glösenkamp, Hans-Dieter Volk, Christine Goffinet, Markus Landthaler, Emanuel Wyler, Philipp Georg, Maria Schneider, Chantip Dang-Heine, Nick Neuwinger, Kai Kappert, Rudolf Tauber, Victor Corman, Jan Raabe, Kim Melanie Kaiser, Michael To Vinh, Gereon Rieke, Christian Meisel, Thomas Ulas, Matthias Becker, Robert Geffers, Martin Witzenrath, Christian Drosten, Norbert Suttorp, Christof von Kalle, Florian Kurth, Kristian Händler, Joachim L Schultze, Anna C Aschenbrenner, Yang Li, Jacob Nattermann, Birgit Sawitzki, Antoine-Emmanuel Saliba, Leif Erik Sander, Deutsche COVID-19 OMICS Initiative (DeCOI)

Cell, 2020

Clinical and Virological Characteristics of Hospitalized COVID-19 Patients in a German Tertiary Care Center during the First Wave of the SARS-CoV-2 Pandemic

Charlotte Thibeault, Barbara Mühlemann, Elisa T. Helbig, Mirja Mittermaier, Tilman Lingscheid, Pinkus Tober-Lau, Lil A. Meyer-Arndt, Leonie Meiners, Paula Stubbemann, Sascha S. Haenel, Laure Bosquillon de Jarcy, Lena Lippert, Moritz Pfeiffer, Miriam S. Stegemann, Robert Roehle, Janine Wiebach, Stefan Hippenstiel, Thomas Zoller, Holger Müller-Redetzky, Alexander Uhrig, Felix Balzer, Christof von Kalle, Norbert Suttorp, Terry C. Jones, Christian Drosten, Martin Witzenrath, Leif E. Sander, Pa-COVID Study Group, Victor M. Corman, Florian Kurth

medRxiv, 2020

A time-resolved proteomic and diagnostic map characterizes COVID-19 disease progression and predicts outcome

Vadim Demichev, Pinkus Tober-Lau, Tatiana Nazarenko, Charlotte Thibeault, Harry Whitwell, Oliver Lemke, Annika Röhl, Anja Freiwald, Lukasz Szyrwiel, Daniela Ludwig, Clara Correia-Melo, Elisa T. Helbig, Paula Stubbemann, Nana-Maria Grüning, Oleg Blyuss, Spyros Vernardis, Matthew White, Christoph B. Messner, Michael Joannidis, Thomas Sonnweber, Sebastian J. Klein, Alex Pizzini, Yvonne Wohlfarter, Sabina Sahanic, Richard Hilbe, Benedikt Schaefer, Sonja Wagner, Mirja Mittermaier, Felix Machleidt, Carmen Garcia, Christoph Ruwe-Glösenkamp, Tilman Lingscheid, Laure Bosquillon de Jarcy, Miriam S. Stegemann, Moritz Pfeiffer, Linda Jürgens, Sophy Denker, Daniel Zickler, Philipp Enghard, Aleksej Zelezniak, Archie Campbell, Caroline Hayward, David J. Porteous, Riccardo E. Marioni, Alexander Uhrig, Holger Müller-Redetzky, Heinz Zoller, Judith Löffler-Ragg, Markus A. Keller, Ivan Tancevski, John F. Timms, Alexey Zaikin, Stefan Hippenstiel, Michael Ramharter, Martin Witzenrath, Norbert Suttorp, Kathryn Lilley, Michael Mülleler, Leif Erik Sander, PA-COVID-19 Study group, Markus Ralser, Florian Kurth

medRxiv, 2020

14 Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Leif Erik Sander für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben. Leif Sander hat mir Motivation und Begeisterung für die Wissenschaft vermittelt und mich sehr kompetent betreut. Außerdem baut diese Arbeit zu großen Teilen auf seinen Vorarbeiten auf. Die Erstellung dieser Arbeit wäre nicht ohne die Hilfe folgender Personen möglich gewesen: Tobias Grießler hat mir bei der Durchführung der Experimente aus **Abbildung 5** geholfen. Die isolierten OMV und die aus OMV isolierte RNA wurde uns von Mobarak Abu Mraheil zugeschickt. Maren Mieth hat die Zellen für die Mikroskopie gefärbt und die Mikroskopie durchgeführt. Tim Vierbuchen hat die BlaER1-Knockout-Klone erzeugt. Kai Pohl und Bertram Linderkamp haben mir bei der Durchführung der Experimente mit den BlaER1-Monozyten geholfen, dabei insbesondere bei den Genen, TLR4, TLR8, MyD88, TRIF, MAVS und STING. Dafür möchte ich diesen Personen ausdrücklich danken.