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

DISSERTATION

Die Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Lorenz

aus Rostock

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. M. Witzenrath
2. Prof. Dr. med. T. Tschernig
3. Prof. Dr. med. K. Mayer

Datum der Promotion: 23.06.2013

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 4

Abkürzungsverzeichnis 7

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis 9

Abbildungsverzeichnis 9

Tabellenverzeichnis 10

1 Einleitung 11

1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie 11

1.2 Die angeborene Immunabwehr des Respirationstraktes 13

1.3 Das Nalp3-Inflammasom 14

2 Fragestellung 20

3 Materialien und Methoden 21

3.1 Materialien 21

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien 21

3.1.2 Geräte und Apparaturen 22

3.1.3 Präparationsplatz isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge 22

3.1.4 Verbrauchsmaterialien 23

3.1.5 Versuchstiere 23

3.2. Methoden 24

3.2.1 In vivo-Modell der Pneumokokkenpneumonie 24

3.2.1.1 Anzucht von Streptococcus pneumoniae 24

3.2.1.2 Infektion der Mäuse 25

3.2.1.3 Präparation und Messung der pulmonalen Permeabilität 26

3.2.2 Ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge 27

3.2.2.1 Aufbau des Arbeitsplatzes 27

3.2.2.2 Durchführung der Präparation und tracheale Pneumolysinapplikation 28

3.2.2.3 Normwerte und Einstellungen für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge 30

3.2.2.4 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben 30

4 Ergebnisse ... 32

4.1 Untersuchung der Bedeutung des Nalp3-Rezeptors im Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie ... 32

4.1.1 Nalp3-defiziente Mäuse zeigten keine Unterschiede in den klinischen Infektparametern Temperatur und Gewichtsverlust ... 32

4.1.2 Nalp3-Defizienz verstärkte die pulmonale Hyperpermeabilität in der Frühphase der Pneumonie ... 33

4.1.3 Nalp3-/- Mäuse zeigten keine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen in der BALF im Vergleich zu WT ... 34

4.1.4 Es bestand kein Unterschied in der Art der rekrutierten Entzündungszellen in der BALF zwischen Nalp3-defizienten und WT-Mäusen ... 34

4.1.5 Die Defizienz des Nalp3-Rezeptors beeinflusste das Zytokin-/Chemokinexpressionsmuster in der Pneumokokkenpneumonie ... 36

4.1.6 Nalp3-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Bakterienlast in der Lunge ... 37

4.2 Untersuchung der Mechanismen der Nalp3-vermittelten inflammatorischen Prozesse in der Pneumokokkenpneumonie ... 38

4.2.1 Die Pneumolysin-induzierte Permeabilitätsstörung ist unabhängig vom Toll-like-Rezeptor 4 ... 39

4.2.2 Nalp3-defiziente Mäuse entwickelten in der IPML nach Pneumolysinapplikation ausgeprägtere Permeabilitätsstörungen ... 39

4.2.3 Der Caspase-1-Inhibitor ZYVAD verminderte die Pneumolysin-induzierte Hyperpermeabilität ... 40

4.3 Untersuchung des Einflusses des Nalp3-Rezeptors auf die Sterblichkeit ... 41

4.3.1 Erhöhte Sterblichkeit bei Nalp3-Defizienz in der Pneumonie ... 41

4.3.2 Nalp3-Defizienz bedingt einen gravierenderen Verlust an Körpergewicht in der Frühphase im Mortalitätsversuch ... 42

4.4 Untersuchung des Einflusses des Polymorphismus des Pneumolysins auf die immunologische Detektion ... 43

4.4.1 Pneumokokken mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin verursachten keine Infektion ... 44

4.4.2 Eine gesteigerte Migration von Entzündungszellen in der Lunge konnte nur bei PN36-infizierten Mäusen beobachtet werden ... 44

4.4.3 Pneumokokken ST306 verursachten keine invasive Erkrankung ... 45

4.4.4 Nicht-hämolysierendes Pneumolysin verursachte keine erhöhte vaskuläre Permeabilität der Lungenstrombahn in der IPML ... 46

5 Diskussion ... 48

5.1 Nalp3 bewirkt eine protektive Immunantwort 49

5.2 Nalp3 leistet einen wichtigen Beitrag zur pulmonalvaskulären Integrität..... 50

5.3 Die Pneumolysin-induzierte Hyperpermeabilität ist TLR4-unabhängig 51

5.4 Die immunprotektive Antwort auf Pneumolysin wird durch den Phänotyp bestimmt 53

5.5 Ausblick..... 54

6 Zusammenfassung 57

7 Literaturverzeichnis 59

Erklärung 74

Danksagung 75

Lebenslauf 76

Publikationen 78

Abkürzungsverzeichnis

AF	Atemfrequenz
ALI	Acute Lung Injury
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain
BALF	Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BMMs	Bone marrow-derived macrophages
CAP	Community Acquired Pneumonia
CARD	Caspase-rekrutierende Domäne
C_{dyn}	dynamische Compliance
CFU	Colony-forming unit
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DAMP	Damage associated molecular pattern
DCs	Dendritic cells
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HSA	Humanes Serumalbumin
I.E.	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPML	Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
iRNA	Inhibierenden RNA
LRR	Leucine-rich repeat
MDP	Muramyl Dipeptid
mRNA	Messenger RNA
N_2	Stickstoff
NaCl	Kochsalz
NAPDH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NF- kB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
O_2	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBS	Phosphate buffered saline
P_{exsp}	Exspiratorischer Atemdruck
P_{insp}	Inspiratorischer Atemdruck
PRR	Pattern recognition receptors
PYD	Pyrindomäne
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.e.m.	Standardfehler des Mittelwertes
TLR	Toll-like receptor
TRAF	TNF receptor associated factor
TRIF	TIR-domain-containing adapter inducing interferon-β
WT	Wildtyp

Abbildungs-und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Körpertemperatur und Körpergewichts-verlust im Infektionsversuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeit-punkt 24 und 48 Stunden
Abbildung 2	Pulmonale Permeabilität im Infektions-versuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden
Abbildung 3	Zellzahl in der BALF im Infektionsversuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden
Abbildung 4	Zelldifferenzierung in der BALF im Infektionsversuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden
Abbildung 5	Zytokinlevel in der BALF im Infektions-versuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 24 und 48 Stunden
Abbildung 6	Bakterienlast in der BALF im Infektions-versuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 48 Stunden
Abbildung 7	Pulmonale Permeabilität in der IPML nach intratrachealer Pneumolysinapplikation in WT Mäusen
Abbildung 8	Pulmonale Permeabilität in der IPML nach intratrachealer Pneumolysinapplikation in TLR4-defizienten und WT Mäusen
Abbildung 9	Pulmonale Permeabilität in der IPML nach intratrachealer Pneumolysinapplikation in Nalp3-defizienten und WT Mäusen
Abbildung 10	Pulmonale Permeabilität in der IPML nach intratrachealer Pneumolysinapplikation und intravaskulärer Caspase-1-Inhibition in WT Mäusen
Abbildung 11	Überlebenskurve im Mortalitätsversuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen

Abbildung 12	Körpergewichtsverlust und Körper-temperatur im Mortalitätsversuch mit Nalp3-defizienten und WT Mäusen zum Zeitpunkt 48 Stunden
Abbildung 13	Körpergewichtsverlust und Körper-temperatur im Infektionsversuch mit nicht-hämolysierenden ST301 Pneumokokken an WT Mäusen zum Zeitpunkt 48 Stunden
Abbildung 14	Zellzahl in der BALF im Infektionsversuch mit nicht-hämolysierenden ST301und hämolysierenden PN36 Pneumokokken an WT Mäusen zum Zeitpunkt 48 Stunden
Abbildung 15	Bakterienlast im Blut und in der Lunge im Infektionsversuch mit nicht-hämolysierenden ST301und hämo-lysierenden PN36 Pneumokokken an WT Mäusen zum Zeitpunkt 48 Stunden
Abbildung 16	Pulmonale Permeabilität in der IPML nach intratrachealer Applikation von nicht-hämolysierendem Allel-5-Pneumolysin und hämolysierendem Allel-1-Pneumoylsin in WT Mäusen
Abbildung 17	Schematischer Aufbau des Arbeitsplatzes der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Parameter für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

1 Einleitung

1.1 Die ambulant erworbene Pneumonie

Die ambulant erworbene Pneumonie (Community acquired pneumonia = CAP) wird definiert als eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms und angrenzender Organe, die im privaten oder beruflichen Umfeld “zu Hause” erworben wurde (1). Die CAP ist weltweit die häufigste registrierte Infektionserkrankung (2). Die Inzidenz einer CAP kann, bei Annahme einer Hospitalisierungsrate von 30-50%, auf etwa 400000 bis 600000 Patienten pro Jahr geschätzt werden (3). Die Inzidenz der CAP steigt mit zunehmendem Alter (4). Das Risiko an einer Pneumonie zu erkranken steigt bei Vorliegen einer akuten oder chronischen Primärerkrankung (5-7), da hierbei eine inadäquate Immunantwort vorliegen kann, sowie bei Langzeitbeatmung (8) und Sepsis-assoziierter Immunparalyse (9). Im ambulanten Bereich wird die Letalität mit lediglich 0,6% angegeben (10), während dieser Wert bei stationär behandelten Patienten deutlich auf 12,7 bis 13,0% ansteigt und einer signifikanten Abhängigkeit vom Alter unterliegt (11).

Der wichtigste Erreger der CAP ist *Streptococcus pneumoniae* mit einem Anteil von 40-50% in Deutschland. Deutlich seltener verursachen *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Enterobacteriaceae oder Staphylococcus aureus* eine CAP (12). Die Häufigkeit viraler Pneumonien liegt bei 3,5% (u.a. Respiratory Syncytial- (RS)-, Adeno-, Corona-, Parainfluenza-, Entero- und humane Metapneumoviren), isolierte primäre Viruspneumonien sind jedoch eher selten. Klinisch schwere Verläufe entstehen häufig, wenn virusbedingte Schädigungen der respiratorischen Abwehr zu einer bakteriellen Superinfektion führen (4, 13-15).

Eine Pneumonie entsteht durch Proliferation des Erregers in den unteren Atemwegen und der entsprechenden inflammatorischen Reaktion des Wirts. Während der Pharynx normalerweise von Mikroben, die kaum ausgeprägte entzündliche Reaktionen hervorrufen, kolonisiert ist, gelten die unteren Atemwege als weitgehend steril (16). Das Vordringen der Erreger in die unteren Atemwege geschieht auf unterschiedlichen Wegen, am häufigsten durch Aspiration aus dem Oropharynx. Hiervon können alle Patientengruppen betroffen sein, besonders ältere Patienten im nächtlichen Schlaf und zerebral kompromittierte Menschen. Die Infektion erfolgt deutlich seltener hämatogen

oder durch die Nachbarstrukturen Pleura und Mediastinum (17). Das bronchiale Epithel als Barriere, das tracheobronchiale mukoziliäre System, antimikrobielle Peptide, Lysozyme und Surfactantproteine bilden die erste Abwehrreihe des Körpers (18, 19). Zusätzlich trägt die kommensale Flora des Pharynx zur Abwehr bei, indem sie mit pathogenen Keimen in einen Wettbewerb tritt. Jedoch kann auch diese kommensale Flora schädigende inflammatorische Reaktionen auslösen, wenn sie in die unteren Atemwege gelangt. Teile des angeborenen und erworbenen Immunsystems bilden die zweite und dritte Abwehrreihe gegen den eindringenden Erreger. Beide Teile sind direkt oder indirekt abhängig von der Detektion des Erreger durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern recognition receptors = PRRs) (16).

Eine Pneumonie imponiert klinisch variabel, unter anderem durch allgemeines Krankheitsgefühl, Fieber oder Hypothermie, Husten, eitrigen oder blutigen Auswurf, Dyspnoe, Verwirrtheit und eine Vielzahl grippaler Symptome (Myalgien, Arthralgien, Cephalgien) (4). Bekannte Risikofaktoren für eine CAP sind Alkoholismus, COPD, Nikotinabusus, strukturelle Lungenerkrankung, Demenz, Schlaganfall, Bewusstseins-minderung oder ein vorliegender Lungenabszess. Zu den Komplikationen einer CAP gehören das Atemnotsyndrom (Acute Lung Injury = ALI/ Acute Respiratory Distress Syndrom = ARDS), Schock, Multiorganversagen und die Koagulopathie (17). Ferner ist die Aggravierung vorbestehender Erkrankungen, wie beispielsweise kardiovaskulärer Krankheiten durch die Pneumonie beschrieben (20, 21).

Die Therapie der CAP erfolgt in ambulanter Behandlung bei Patienten ohne Risikofaktoren leitliniengerecht mit einem hochdosierten Aminopenicillin, alternativ mit einem neueren Makrolid oder Doxycyclin. Einschränkend ist allerdings die zunehmende Makrolidresistenz bei Pneumokokken zu beachten. Liegen Risikofaktoren vor, so sollten Patienten ein hochdosiertes Aminopenicillin/ Betalaktamaseinhibitorpräparat oder alternativ ein pneumokokkenwirksames Fluorchinolon erhalten. Die antibiotische Therapie des hospitalisierten Patienten sollte entweder mit einem Betalaktamantibiotikum und Makrolid oder mittels eines pneumokokkenwirksamen Fluorchinolones erfolgen (4). Eine Zunahme der Antibiotikaresistenzen gegenüber den klassischen Erregern (u.a. *S. pneumoniae*, *H. influenzae*) stellt ein zunehmendes Problem dar. Zwar ist die häufige „in vitro“-Penicillinresistenz der Pneumokokken in Deutschland von geringerer klinischer Relevanz, aber die Makrolidresistenz hat bereits klinische Relevanz erreicht (4).

Insgesamt konnte die Sterblichkeit der schweren Pneumonie durch Entdeckung der Antibiotika um ca. 20% (von ca. 30% auf ca. 10%) gesenkt werden **(Evans & Gaisford, Lancet 1938)**. Leider hat sich gezeigt, dass sich dieser großartige Wert auch durch Weiterentwicklung der antibiotischen Therapie nicht mehr steigern lässt (22). Dies und das Problem der zunehmenden Resistenzen weisen deutlich darauf hin, dass neue Therapieansätze benötigt werden, die die Pathogen-Wirt-Beziehung berücksichtigen.

1.2 Die angeborene Immunabwehr des Respirationstraktes

Das Immunsystem des Respirationstraktes spielt eine wichtige Rolle sowohl in der Keimabwehr, wie auch in der Ätiopathogenese von akuten und chronischen Lungenerkrankungen (16).

Die Effektivität der Erregerabwehr beruht hierbei auf der komplexen Zusammenarbeit der unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems. Die Abwehrreaktionen selbst, und insbesondere inadäquate Reaktionen können pulmonale Dysfunktionen bedingen oder deren Entstehung fördern. Einer der wichtigsten Teile des körpereigenen Abwehrsystems im Respirationstrakt sind die PRRs. Diese Rezeptoren detektieren hoch-konservierte Moleküle des Keimes, so genannte Pathogen associated molecular patterns (=PAMPs). Eine Aktivierung der PRRs führt über unterschiedliche Signaltransduktionswege zur Produktion inflammatorischer Zytokine, Interferone und Chemokine (23), dadurch werden u.a. Abwehrzellen in der Umgebung aktiviert, sowie weitere Makrophagen und Neutrophile zum Ort der Inflammation gelockt. Außerdem regulieren PRRs zell-autonome Abwehrmechanismen, wie die Abwehr intrazellulärer Erreger (24) oder die Induktion antibakterieller Peptide zur Abwehr extrazellulärer Pathogene (25). Zusätzlich beeinflussen PRRs die adaptive Immunantwort und sind notwendig für eine maßgeschneiderte T-Zell-Antwort (26-28).

Die PRRs lassen sich nach Vorkommen, Aufbau, Liganden und Signalwegen in verschiedene Gruppen einteilen. Eine wichtige Gruppe sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR). Es sind 10 humane TLRs bekannt. TLRs haben einen typischen Aufbau aus einer extrazellulären Leucine-rich repeat (LRR)-Domäne zur Detektion des entsprechenden Liganden und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1 receptor homology (TIR)-Domäne zur Signaltransduktion (16). Die TLRs befinden sich sowohl extrazellulär (TLR1, -2, -3, TLR4-6, -10), als auch intrazellulär (TLR3, TLR7-9). Ihre pulmonale Expression erfolgt durch zahlreiche Zellen, so besitzen Alveolarmakrophagen TLR1, -2, -4, -6, -7, -8 (29), plasmazytoide dentritische Zellen TLR7 und -9 (30), Lungenepithel-

zellen (Trachea, Bronchien, Alveolen) TLR1-6 und TLR9 (31, 32). In Lungenendothelzellen konnten TLR2, -4 und -8 nachgewiesen werden (33, 34). In Lungenfibroblasten wurde die Expression von TLR2, -3, -4 und -9 (35-38) und in glatten Muskelzellen der Atemwege TLR2, -3 und -4 nachgewiesen (39). Die TLRs detektieren unterschiedliche Liganden. Beispielsweise detektiert TLR4 Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, endogenes Hyaluronan, HMGB1, oxidierte Lipoproteine, oxidierte Phospholipide und auch Pneumolysin (40-47). Die Detektion von Liganden führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen (u. a. MyD88, Mal, TRIF, TRAM) durch die TIR-Domäne und konsekutiv zur Signalübermittlung. Alle TLRs, außer TLR10, lösen eine MyD88-abhängige NF-kB-Aktivierung mit Expression antimikrobieller Peptide und proinflammatorischer Chemo- und Zytokine (z.B. TNF-α, IL-8, pro-IL-1β) und entsprechender inflammatorischer Immunreaktion und Leukozytenrekrutierung aus (48, 49).

Eine zweite bedeutende Gruppe sind die Nucleotide oligomerization binding domain (Nod)-like Rezeptoren (NLRs). Es sind 22 humane Varianten dieser zytosolischen PRRs bis dato bekannt (16). Die NLRs bestehen aus drei Domänen: der zentralen nukleotid-bindenden Oligomerisationsdomäne NACHT, einer C-terminalen LRR-Domäne und einer N-terminalen effektorbindenden Domäne. Letztere kann eine Caspase-rekrutierende Domäne (CARD), eine Pyrindomäne (PYD) oder eine Baculovirus-inhibitor-repeats (BIR) Domäne sein, die Art der Domäne bestimmt dabei den Signalweg (50, 51). Die Subgruppe der NLRs bestehend aus NACHT-Domäne, LRR-Domäne und Pyrindomäne (=Nalp) enthält bisher 14 beschriebene Rezeptoren (16, 52). Für Nalp1-3 konnte gezeigt werden, dass sie Multiproteinkomplexe bilden, die Inflammasom genannt werden. Diese bestehen aus einem oder zwei Nalps, häufig einem Adaptermolekül (ASC = apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) und der Caspase-1 (23). Inflammasome detektieren mikrobielle Liganden, verschiedene Substanzen, die zellulären Schaden indizieren (DAMPs = Damage associated molecular pattern molecules), sowie Partikel (z.B. Asbestfasern, Cholesterolkristalle) (53).

1.3 Das Nalp3-Inflammasom

Das Nalp3-Inflammasom ist sowohl durch seinen Beitrag zur effektiven Schädlingsabwehr als auch zur Pathogenese verschiedener pulmonaler Erkrankungen besonders in den Vordergrund gerückt. Die Expression von Nalp3 erfolgt in Granulozyten,

Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (54). Nalp3 detektiert mehrere Liganden hoher struktureller und chemischer Diversität (z.B. mikrobielle RNA, einige DNA-Formen, MDP) (55-59). Nalp3 ist involviert in der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze (60-66). In aktuellen Studien wurde außerdem gezeigt, dass Nalp3 durch Detektion bakterieller mRNA eine immunspezifische Reaktion auf lebensfähige Bakterien ermöglicht (67). Zusätzlich detektiert Nalp3 DAMPs, z.B. nekrotische Zellen, Harnstoffmetaboliten, ATP, Biglykan und Hyaluronan (56, 68-71). In vivo Studien an Mäusen zeigten die Beteiligung der Detektion von DAMPs durch Nalp3 beim akuten Lungenversagen (ALI = acute lung injury) und anderen Lungenerkrankungen (72, 73). Weiterhin detektiert Nalp3 große inhalierte Partikel, wie Silikonkristalle, Asbest und Aluminiumsalze. Diese Rezeptor-Liganden-Interaktion scheint wichtig in der Pathogenese der Pneumokoniosen und liefert außerdem eine Erklärung für den adjuvanten Effekt von Aluminium (74-76).

Bei Aktivierung reguliert das Nalp3-Inflammasom zum einen die posttranslationale Prozessierung der Präkursormoleküle proIL-1β und proIL-18 in ihre reifen Formen durch Caspase-1-abhängige Spaltung. Der erste Schritt dieses komplexen Prozesses zur Produktion dieser inflammatorischen Schlüsselzytokine ist die Induktion der Präkursormoleküle, beispielsweise NF-kB-abhängig nach TLR-Aktivierung (16). Zum anderen steuert das Nalp3-Inflammasom die Induktion einer bestimmten Form des programmierten Zelltods: Die Caspase-1-abhängige Pyroptose (77). Diese tritt nach prolongierter Stimulation und Aktivierung auf (78). Sie zeigt Eigenschaften von Nekrose und Apoptose (79). Analog zur Apoptose ist der Vorgang Caspase-abhängig und es liegt eine eventuelle Beteiligung der Mitochondrien vor (80-82). Analog zur Nekrose kommt es in vivo und in vitro zur Freisetzung von IL-1, die Integrität der Plasmamembran geht verloren und eine starke inflammatorische Reaktion resultiert (69, 80). Außerdem haben Pyroptose und Nekrose einige gemeinsame Auslöser (83). Weiterhin wurde eine Spaltung von Proteinen des Glukose- und Fettstoffwechsels durch Caspase-1 nachgewiesen (84, 85). Die Wirkung auf den Glukosestoffwechsel ist propyroptotisch. Im Fettstoffwechsel hingegen werden durch Caspase-1 zelluläre Reparaturmechanismen gefördert (85), so benötigen z. B. Epithelzellen Caspase-1 um Membranschäden durch porenformende bakterielle Toxine zu überleben (80). Außerdem konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die IL-18-Produktion durch das Nalp3-Inflammasom in Epithelzellen des Kolons eine wichtige Rolle für Erhalt und Regeneration der mukösen Barriere in der Kolitis spielt (86).

Die Regulation der Nalp3-Inflammasomaktivierung scheint hochkomplex und bedient sich zahlreicher Rückkopplungsmechanismen. So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche anti-apoptotische Signale verschiedener Zelltypen die Aktivierung unterdrücken (81, 83, 87, 88). Eine weitere negative Feedbackschleife wird durch IL-10 vermittelt. Studien zeigten erhöhte IL-1-Produktion bei IL-10-Neutralisation im in vitro Experiment und bestätigend erhöhte IL-1-Level im IL-10-defizienten Mausmodell (89-91). Knockout-Studien an verschiedenen Signalmolekülen des IL-10 (STAT3, Tyk2) konnten diese Ergebnisse bestätigen (92-94). Interessanterweise zeigten Untersuchungen, dass auch eigentlich inflammatorische Signalmoleküle (Bsp. IFN) die Nalp3-Inflammasomaktivierung unter bestimmten Bedingungen supprimieren können (95). Es scheint also, dass einige proinflammatorische Reize die Inflammasom-Aktivierung fördern, andere hingegen diese durch anti-apoptotische Eigenschaften hemmen (80).

Trotz des umfangreichen Wissens über Signalwege und Regulation des Nalp3-Inflammasoms liegt über die genauen Mechanismen der Aktivierung noch vieles im Dunkeln. Der erste Schritt zur Aktivierung ist das Priming, das verschiedene Komponenten des Nalp3-Inflammasoms (Nalp3, proIL-1β) betrifft. Während sich in vitro eine priming-abhängige Regulation von Nalp3 zeigte (96, 97), wurde in vivo am eGFP (enhanced green fluorescence protein)-exprimierenden Knockout-Maus-Modell gezeigt, dass das Priming nur bei einigen Zellen, wie Monozyten und Neutrophilen, eine Rolle spielt (80). Aus in vitro Experimenten weiß man außerdem, dass die proIL-1β-Expression priming-abhängig ist. Die Bedeutung in vivo ist jedoch umstritten. So zeigten Studien, dass Inflammasom-Aktivatoren alleine die Induktion von proIL-1β bewirken (95, 98). Diese erfolgt wahrscheinlich durch ein Zusammenspiel von sich veränderndem inflammatorischem Milieu, einwandernden Zellen und parakrinen Signalen (80, 98, 99).

Der zweite Schritt der Aktivierung beinhaltet dann die Formierung des Multiprotein-komplexes des Nalp3-Inflammasoms. Dies kann ausgelöst werden durch eine Vielzahl bekannter Aktivatoren. Entsprechend der aktuellsten Theorie zur Formierung hält die LRR-Domäne Nalp3 mithilfe von SGT1 und HSP90 Chaperonen in einem inaktiven Zustand (23, 100, 101). Bei Detektion des Liganden oder des Aktivierungssignals durch die LRR-Domäne des Nalp-Proteins löst sich dann die LRR-vermittelte Autorepression und es kommt zur Exposition der PYD und NBD. Hierdurch kann Nalp3 zunächst durch die Wechselwirkungen homotypischer NBD oligomerisieren und anschließend das Adaptermolekül ASC mittels der PYD rekrutieren. Die CARD des ASCs bindet und

aktiviert die Caspase-1 durch Autoprozessierung. Diese spaltet und aktiviert dann zahlreiche Präkursormoleküle der Zelle, wie z.B. proIL-1β. Unklar ist bis dato der genaue Charakter des Aktivierungssignales. Aufgrund der großen Anzahl und hohen Diversität an Aktivatoren scheint es unwahrscheinlich, dass Nalp3 seine Liganden direkt bindet. Aktuelle Theorien gehen von verschiedenen Signalen aus, die wohl gemeinsam nebeneinander wirken, jedoch alleine jeweils nicht ausreichend sind zur Aktivierung. Dabei ist noch zu klären ob diese direkt auf Nalp3 wirken oder ob es nachgeordnet einen vermittelnden wirtseigenen Faktor gibt (80).

Zum einen gibt es experimentelle Belege für Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Nalp3-Aktivatoren. So konnten erhöhte ROS-Levels nach Inkubation mit vielen Nalp3-Aktivatoren gezeigt werden (75, 102, 103). Als eine mögliche Quelle der ROS kommt der NAPDH-Oxidase-Komplex oder die ROS-Produktion der Mitochondrien in Frage (80). Für erstgenannten spricht, dass viele Inflammasom-Aktivatoren die ROS-Produktion über diesen Komplex aktivieren (62, 75, 80, 104, 105). Während in vitro iRNA-Experimente für diese Theorie unterstützende Befunde erbrachten (75), zeigte sich in vivo im NOX2 (primäre phagozytäre NADPH-Oxidasekomplexkomponente)-defizienten Mausmodell eine drastisch reduzierte ROS-Produktion, aber eine nur minimal reduzierte Inflammasom-Aktivierung (76, 106). Diese Ergebnisse ließen sich durch Redundanz oder Kompensation zwischen NADPH-Oxidasen erklären (80). Jedoch ist weiter unklar, wie NADPH-produzierte ROS von außerhalb der Zelle oder aus phagolysosomalen Vesikeln in das Cytoplasma gelangen, um das Inflammasom zu aktivieren (80). Aktuelle Studien lassen eher darauf schließen, dass die Mitochondrien Hauptquelle der Inflammasom-aktivierenden ROS sind (81, 82). Mitochondrien produzieren kontinuierlich eine kleine Menge ROS. Eine Erhöhung der Produktionsrate wird durch Stress und Störungen der Atmungskette ausgelöst (107). Studien demonstrierten außerdem die TLR4/TRAF6-abhängige Rekrutierung von Mitochondrien zu Phagosomen nach Aufnahme von LPS-besetzten Partikeln im Rahmen der Immunabwehr (108). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich Nalp3 bei Stimulation des Inflammasoms an die Mitochondrien anlagert (81). Dies wäre eine strategisch günstige Position der Nalp3-Proteine zum Empfang von mitochondrialen ROS (80). Es ist wenig über den genauen Mechanismus der ROS-getriggerten Inflammasom-Aktivierung bekannt. ROS modifizieren zahlreiche zelluläre Zielmoleküle (80), beispielsweise konnte für die LRR-Domäne des Nalp3 eine Homologie zum LRR-only Protein Ribunuklease/ Angiogenininhibitor 1 (RNH1) demonstriert werden. Dieses

Protein hat einen hohen Anteil an Cystein und wird durch Oxidation der Cysteinreste reguliert (109). Durch den gleichen Mechanismus ist eine direkte Modifikation des Nalp3 durch ROS denkbar (80).

Zum anderen spielt ein Absinken des zytoplasmatischen Kaliumlevels eine Rolle. Die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms wird inhibiert durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentrationen auf 130 mM (entspricht etwa Zytoplasma) (110, 111). Zahlreiche Pathogene können den Kaliumausstrom zur Nalp3-Inflammasom-aktivierung auslösen, der Mechanismus ist hier entweder die Herabsetzung der Membranintegrität oder die Aktivierung endogener Kaliumkanäle. So aktivieren beispielsweise hohe extrazelluläre ATP-Konzentrationen den ligandengesteuerten Ionenkanal purinerger P2X Rezeptor 7 (P2X7) (112). Kalium verhindert also unter Ruhebedingungen und normalen intrazellulären Konzentrationen von 150 mM die unangebrachte Formierung des Nalp3-Inflammasoms (113). Eine Erklärung durch welchen Mechanismus genau eine niedrige Kaliumkonzentration das Inflammasom aktiviert ist ausstehend (80).

Als weiteres Aktivierungssignal sind Phagozytose und lysosomaler Schaden bekannt (70, 75, 76). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Phagozytose die partikelinduzierte Aktivierung des Inflammasoms abschwächt (62, 114). In experimentellen Studien beeinflusste außerdem die Inhibition der im Signalweg involvierten Kinasen Src, Syk und Phospatidylinositolkinase die partikelinduzierte Inflammasom-Aktivierung (62, 76). Der entscheidende Punkt der partikelinduzierten Inflammasom-Aktivierung ist wahrscheinlich der phagosomale Integritätsverlust und die Freisetzung intrakompartimentärer Substanzen (76, 115). Auf diesem Wege gelangt Cathepsin B ins Zytoplasma. Die Hemmung oder genetische Ablation dieser lysosomalen Protease führte zur Abschwächung der partikel-induzierten Inflammasomaktivierung (76, 116). Vermutlich spaltet und aktiviert Cathepsin einen Nalp3-Liganden oder deaktiviert einen Inhibitor (80).

In aktuellen Studien konnte außerdem die Bedeutung der Phagocytose in der Detektion bakterieller mRNA gezeigt werden. Bakterielle mRNA gehört zur neuen Klasse von vita-PAMPs, diese zeigen dem Immunsystem das Vorliegen mikrobiellen Lebens an (67). Nach Phagocytose lebensfähiger Bakterien konnte die Freisetzung bakterieller mRNA durch low-level leakage aus den Phagosomen gezeigt werden. Dies führte zur TIR-domain-containing adapter inducing interferon-β (TRIF)-abhängigen Nalp3-Aktivierung mit konsekutiver IL-1β-Produktion und Pyroptose. Die zentrale Rolle für TRIF in der

Verlinkung des TLR- mit dem Nalp3-Signalweg ist unabhängig von der transkriptionellen Regulation der einzelnen Nalp3-Inflammasomkomponenten. Der Nachweis der zugrundeliegenden Mechanismen ist noch ausstehend. Am wahrscheinlichsten scheint momentan jedoch zum einen die TRIF-abhängige Rekrutierung von Kanalproteinen zur zytosolischen Translokation von bakterieller mRNA, aber auch eine mögliche Rolle in der direkten Signalvermittlung zwischen TLR- und Nalp3-Signalweg ist denkbar (117).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte ausgehend vom aktuellen Stand der Forschung die Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms und der einzelnen Komponenten in der Pneumokokkenpneumonie anhand klinischer Parameter wie u.a. pulmonaler Hyperpermeabilität, Körpertemperatur und Körpergewichtsverlust untersucht werden. Für diese Studien wurden C57Bl/6 WT und Nalp3-defiziente Mäuse mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 3 infiziert und nach 24 bzw. 48 Stunden Monitoring die o.g. Parameter durch Präparation der Tiere erfasst. Weiterhin sollten entsprechende Mechanismen der Aktivierung der Inflammation durch das Nalp3-Inflammasom am ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge näher beleuchtet und der mögliche Einfluss einer Nalp3-Defizienz auf die Sterblichkeit in der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht werden. Daran anschließend sollte erstmalig der Einfluss des Polymorphismus des Pneumolysins auf die immunologische Detektion durch Einsatz des Serotyps ST306 mit nicht-hämolytischem Pneumolysin im in vivo Infektionsmodell und des nicht-hämolytischen Allel-5-Pneumolysins in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge untersucht werden.

2 Fragestellung

Ausgehend von den in der Einleitung erörterten Erkenntnissen sollten folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat der Nalp3-Rezeptor auf den Verlauf der Pneumokokkenpneumonie?

2. Über welche Mechanismen wird die Pneumolysin-induzierte pulmonale Hyperpermeabilität vermittelt?

3. Welchen Einfluss nimmt die Nalp3-Defizienz auf die Sterblichkeit?

4. Welche Bedeutung hat die hämolytische Eigenschaft des Pneumolysins für die Detektion von *Streptococcus pneumoniae* durch das Immunsystem?

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Bacto™ Technischer Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon	BD Biosciences (Heidelberg)
Bio-Plex™ Mouse Cytokine 13-Plex Panel	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex® Reagent Kit	BioRad Laboratories (München)
Braunol® (Povidon-Jod-Lösung)	BRAUN AG (Melsungen)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Columbia-Agarplatten mit 5% Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Färbereagenz Diff-Quik	Medion Diagnostics AG, Düdingen, Schweiz
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH (Trittau)
Human Albumin ELISA Quantitation Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA
Humanes Serumalbumin	Baxter, Deerfield, Illinois, USA
Ketamin 10%	WDT (Garbsen)
Küvetten Nr. 67.742	Sarstedt (Nümbrecht)
Liquemin® N25000 (Heparin-Natriumchlorid 5000 I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid-Lösung (0,9%)	BRAUN AG (Melsungen)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	BRAUN AG (Melsungen)
PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
Protease-Inhibitor complete TM	Mini Roche Diagnostics GmbH (Prenzberg)
Rompun 2%® (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Steriles fetales Kälberserum	PAA Laboratories GmbH (Österreich)
TMB (Tetramethylbenzidine Liquid Substrate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Tween®20 (Polyoxyethylenesorbitan-monolaurate)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bioplex suspension array system	Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornien, USA

3.1.2 Geräte und Apparaturen

Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Bio-Plex™ Millipore	BioRad Laboratories (München)
Bio-Plex™ Workstation	BioRad Laboratories (München)
Brutschrank Heraeus (Typ BB 6220 O2)	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Gefrierschrank -80°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Kaltlichtquelle Flexilux 600 longlife	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kühlschrank +4°C (Liebherr Profi line)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Mikroskop Laborlux 12	Ernst Leitz Wetzlar GmbH (Wetzlar)
Microsprayer	Penn-Century, Philadelphia, PA, USA
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Photometer UvikonXS	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Rektalsonde physitemp (Model BAT-12)	physitemp Instruments, Inc. (USA)
Shandon CytoSpin	GMI (USA)
Sicherheitswerkbank Hera Safe Typ HS 12	Kendro Laboratory Products (Osterode)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort Integra	Biosciences AG (Schweiz)
Vortexer (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries (USA)
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation (USA) über VWR
Zentrifuge Heraeus (Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)

3.1.3 Präparationsplatz isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Beatmungsgas (5% CO2, 20% O2, 75% N2)	Abteilung Technische Gase (Charité, Berlin)
Differenz-Druckaufnehmer (Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX Typ 399/2 und P75 Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Bad-/Umwälzthermostat Ecoline E103	Lauda Dr. R. Wobster GmbH & CO KG (Lauda-Königshofen)
Korkeinlage T20124 (80 x 60 x 8 mm)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Kugelhähne 2-Wege (SS-43S6MM) und 3-Wege (SS-43XSS6M)	B.E.S.T. (Frankfurt)
Messmodule (CFBA, TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik (March-

	Hugstetten)
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec SA)	ISMATEC (Schweiz)
Plugsys DC Messbrücke (DBA), Typ 660	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Unterdruckkammer (Isolates Lung, Size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (USA)
BD FalconTM 5 ml Polypropylen Round-Bottom Tube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Einmal-Impfschlingen (farblos, 1 µl)	Nunc GmbH & Co KG (Wiesbaden)
Falcon Blue MaxTM (50 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Belgien)
Hybond-ECL Membran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Kanülen BD MicrolanceTM 3 (27 G)	BD Biosciences (Heidelberg)
Reagiergefäß SafeSeal (0,5 ml; 1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäß (1 ml/1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Rotilabo® Spritzenfilters	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2 ml/5 ml/10 ml/25 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD Discardit TM II (2 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Spritzen BD PlastipackTM (1 ml)	BD Biosciences (Heidelberg)

3.1.5 Versuchstiere

Im Rahmen der Versuche wurden weibliche C57Bl/6 und C57Bl/10 Wildtyp-Mäuse (WT, Inzuchtstamm) in einem Alter von 8-11 Wochen mit einem Körpergewicht von 17-23 g

verwendet. Die Lieferung der Tiere erfolgte durch Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland).
Außerdem fanden weibliche, homozygote TLR-4-defiziente Mäuse (C57Bl/10-Hintergrund) in einem Alter von 8-11 Wochen mit einem Körpergewicht von 17-23 g Verwendung. Die Lieferung dieser Tiere erfolgte durch den Bereich Versuchstierhaltung der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité Universitätsmedizin Berlin.
Die verwendeten Nalp3-defizienten Mäuse (C57Bl/6-Hintergrund) wurden vom Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin zur Verfügung gestellt. Die 8-11 Wochen alten Tiere hatten ein Körpergewicht von 17-23 g.
Die Mortalitätsstudie erfolgte mit C57Bl/6 WT- und Nalp3-defizienten-Mäusen, die ein Körpergewicht von 16-21 g bei einem Alter von 8-9 Wochen aufwiesen.
Die Experimente wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt.

3.2. Methoden

3.2.1 In vivo-Modell der Pneumokokkenpneumonie

Das in vivo-Modell der Pneumokokkenpneumonie hatte einen dreistufigen Aufbau. Zunächst erfolgte die Anzucht des Erregers, dann die Infektion der Versuchstiere mit der gewünschten Erregerkonzentration. Der letzte Schritt bestand aus der Präparation der Tiere und der Untersuchung von Proben und/oder Organen.

3.2.1.1 Anzucht von Streptococcus pneumoniae

Die Anzucht des Erregers erfolgte in einer speziellen Nährlösung. Dieser Nährlösung, bestehend aus 30 g Bacto™ Todd Hewitt-Bouillon (THY), 5 g Bacto™ Technischem Hefeextrakt und einem Liter destilliertem Wasser, wurde vor Gebrauch steril filtriertes fetales Kälberserum zugesetzt. Die Infektion erfolgte mit *Streptococcus pneumoniae* der Serotypen 3 (PN36) und 1 (ST306).
Es wurde jeweils ein Arbeitsstock durch zweimalige Bebrütung auf Columbia Blutagar mit 5% Schafblut, Selektion vitaler Kolonien und anschließendem Einfrieren in 1,5 ml

Einfriermedium, bestehend aus 79,5% Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillon, 0,5% Hefeextrakt und 20% Glycerol angelegt. Die Lagerung der Arbeitsstöcke erfolgte bei -80°C.
Zur Vorbereitung der Infektionsversuche wurden die Bakterien mittels Einwegöse aus dem Arbeitsstock entnommen, auf Columbia Blutagarplatten mit 5% Schafblut ausgestrichen und bei 37°C und 5% CO_2 für 9 bis 10 Stunden im Brutschrank belassen. Anschließend wurden mehrere Einzelkolonien mittels eines sterilen Wattestäbchens in 20 ml Nährlösung bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD) von 0,03-0,04 (bei einer Wellenlänge von 600 nm) eingerührt. Die so erhaltene Kokkenlösung wurde bis zum Erhalt einer OD von etwa 0,3 bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Diese OD markierte den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase. Die Suspension wurde dann bei 3100 rpm für 10 min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes resuspendiert. Unter Berücksichtigung des Ausgangsvolumens, des nun erhaltenen Volumens und der End-OD (eine OD von 0,1 entspricht einer Erregerkonzentration von 1×10^8 KbE/ml) wurde die Bakterienkonzentration in der Nährlösung errechnet. Die Suspension wurde anschließend in mehreren Schritten bis zur gewünschten Infektionsdosis mit PBS verdünnt.

3.2.1.2 Infektion der Mäuse

Vor der Infektion mussten die Tiere narkotisiert werden. Nach Bestimmung von Körpertemperatur und Körpermasse erfolgte die intraperitoneale Applikation eines Narkosegemisches, bestehend aus 90 mg/kg KM Ketamin und 15 mg/kg KM Xylazin. Anschließend erhielten die Tiere Bepanthen® Augen- und Nasensalbe in den Konjunktivalsack um Schädigungen der Kornea vorzubeugen. Zur Applikation wurden die Tiere in einer speziellen kastenartigen Haltevorrichtung an den oberen Schneidezähnen fixiert. Die Infektion der spontan atmenden Mäuse erfolgte transnasal. Es wurden 10 µl der Infektionslösung pro Nasenloch appliziert. Die Kontrollinfektionen erfolgten unter gleichen Bedingungen mit jeweils 10 µl PBS pro Nasenloch. Abschließend erfolgte eine Kontrolle der korrekten Verdünnung, indem eine definierte Menge der Infektionslösung auf Columbia Schafblutagar ausgestrichen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Kolonien ausgezählt und der Ist- mit dem Soll-Wert verglichen.

3.2.1.3 Präparation und Messung der pulmonalen Permeabilität

Die Bestimmung der pulmonalen Permeabilität erfolgte 24 und 48 Stunden nach transnasaler Applikation von Streptococcus pneumoniae (Infektionsdosis 5 x 106 CFU/Tier).
Es wurde der HSA-BALF/HSA-Plasma-Quotient ermittelt, dessen Anstieg eine erhöhte Permeabilität in der Lungenstrombahn anzeigt.
Zur Ermittlung dieses Quotienten wurde jeweils eine Stunde vor Präparationsbeginn 1 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 75 µl 0,9%-iger Kochsalzlösung in die Schwanzvenen der Tiere injiziert. Dieser Schritt erfolgte in einer speziell angefertigten Apparatur, die eine Fixierung der Tiere zuließ. Zur Erleichterung der Punktion wurden die Gefäße mit einer Wärmerotlichtlampe dargestellt. Das Ziel der sich nun anschließenden Präparation war die Gewinnung von Blut- und Lungenlavageproben. Für letztere war es notwendig, die Lungengefäße schonend blutfrei zu perfundieren. Die unter 3.2.2.2 beschriebene Präparation wurde in wenigen Punkten verändert.
Auf die intrakardiale Applikation von Heparin (50 µl; 2500 I.E./ml) erfolgte die finale Blutentnahme aus der V. renalis sinistra. Die entnommene Blutprobe wurde unmittelbar bei 1500 RZB (Relative Zentrifugalbeschleunigung) für 10 min zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma abpipettiert und bei -80°C zur HSA- und Zytokinbestimmung gelagert.
Die Perfusion der Lungenstrombahn erfolgte durch einen Pulmonaliskatheter, der mittels einer Inzision der rechten Herzkammer in die Pulmonalarterie eingeführt wurde. Außerdem erfolgte eine Inzision der linken Herzkammer um einen venösen Abfluss zu schaffen und eine Schädigung der Lungenstrombahn durch erhöhte Drücke zu verhindern. Auf die damit abgeschlossene Präparation erfolgte eine dreiminütige Unterdruckbeatmung, bei gleichzeitiger Perfusion mit 0,9%-iger Kochsalzlösung. Darauf erfolgte die unter Kapitel 3.2.3 beschriebene Lungenlavage.
In den erhaltenen BALF- und Plasmaproben wurden mithilfe eines ELISA-Kits die HSA-Konzentrationen bestimmt und der entsprechende HSA-BALF/HSA-Plasma-Quotient berechnet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers und die Messung der optischen Dichte der Proben erfolgte bei 450 nm auf einem Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos).

3.2.2 Ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Die Lungen der Mäuse wurden isoliert ventiliert und blutfrei perfundiert. So konnten intakte und funktionsfähige Lungen unabhängig von humoralen, metabolischen oder zentralnervösen Einflüssen untersucht werden. Das Modell ermöglicht eine exakte Messung und Dokumentation von zahlreichen Lungenfunktionsparametern, wie pulmonalarterieller und -venöser Druck, Atemzugvolumen, dynamische Compliance und Atemwegsresistance. Die Möglichkeit der pharmakologischen Intervention besteht sowohl über einen transbronchialen, als auch über einen vaskulären Zugang.

3.2.2.1 Aufbau des Arbeitsplatzes

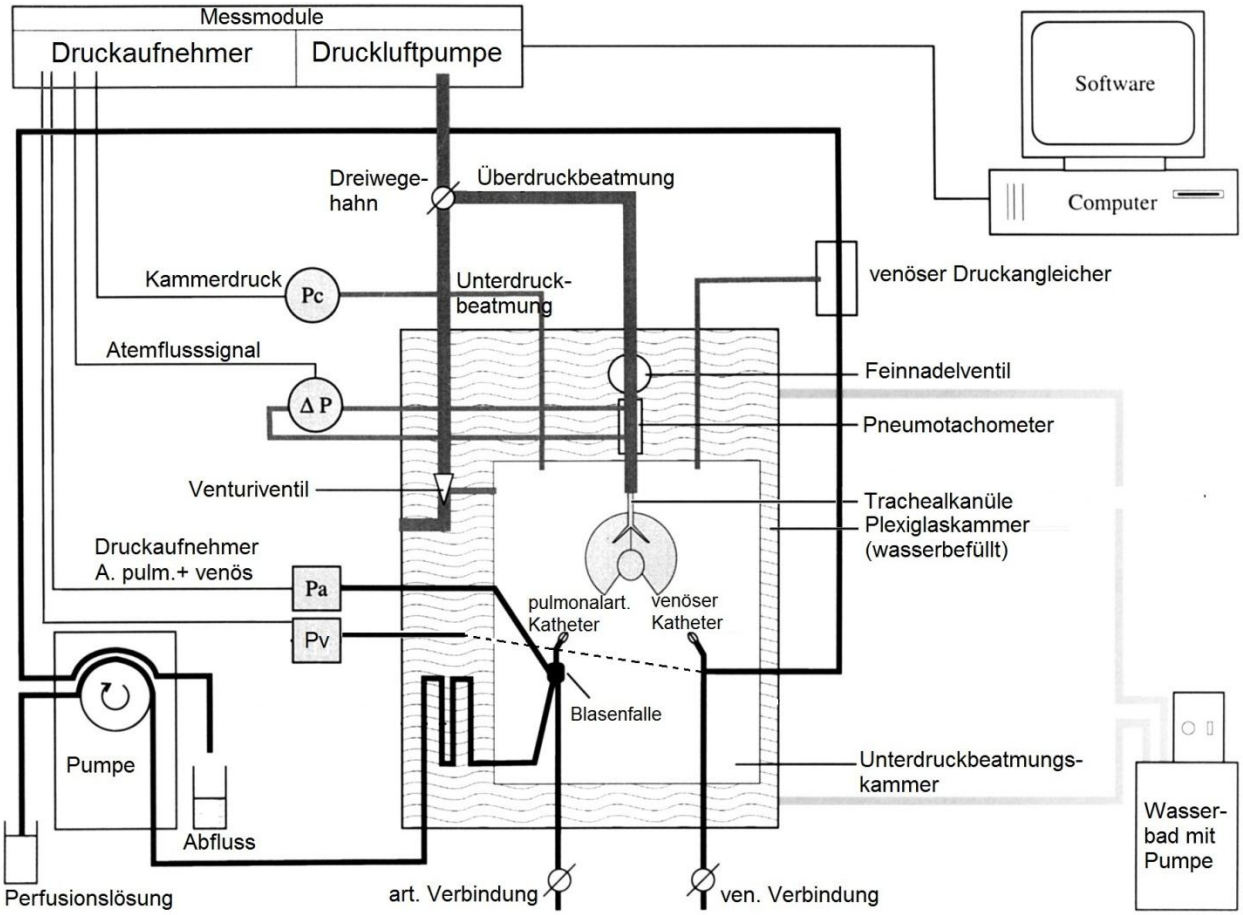


Abb. 17
Die Abbildung stellt den Aufbau des Arbeitsplatzes der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge schematisch dar (modifiziert nach von Bethmann (118))

3.2.2.2 Durchführung der Präparation und tracheale Pneumolysinapplikation

Die Analgosedierung erfolgte durch die intraperitoneale Gabe von 220 µl Narkosegemisch. Das Narkosegemisch enthielt Ketamin (100 mg/ml), Rompun (2%) und NaCl (0,9%). Nach Absicherung einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte ein medianer Hautschnitt vom Unterbauch bis zur Mandibula. Bei der anschließenden stumpfen Präparation des trachealen Muskelschlauches galt es zu beachten, weder benachbarte Nerven (N. vagus), noch Gefäße (A. carotis) zu beschädigen. Nach dem medianen Einschnitt des trachealen Muskelschlauches erfolgte die Platzierung einer lockeren Ligatur um die Trachea. Diese erhielt ventral einen horizontalen 2/3 Einschnitt. Mit eingeschalteter Beatmungspumpe wurde die Trachealkanüle mithilfe der Pinzette eingeführt und die Ligatur fixiert.
Die Ventilation der intubierten Mäuselunge erfolgte bei folgenden Parametern: 90/min, 8,5 cmH_2O inspiratorischer und 4,0 cmH_2O exspiratorischer Beatmungsdruck. An eine mediane Laparotomie bis zum Processus Xiphoideus schloss sich je ein Entlastungsschnitt pro Seite an. Dieser erfolgte kaudal des Sternums nach lateral, entlang der Rippenbögen bis in die Flankengegend. Unter Anheben des Processur Xiphoideus mit der Pinzette konnte das Zwerchfell von median nach dorsal eingeschnitten und die Thoraxhöhle eröffnet werden. Anschließend erfolgte durch intrakardiale Applikation von 50 µl Heparin (2500 I.E./ml) die Antikoagulation. Die finale Blutentnahme durch Punktion der V. renalis sinistra verursachte den sofortigen Tod durch Kreislaufversagen.

Es erfolgte eine zweite Ligatur um die Trachea und die Vorderläufe wurden durch Nadeln in der unterliegenden Korkplatte fixiert. Dann wurde der Thorax, nach Abtrennung des Unterleibes, auf die Korkplatte fixiert. Nach Entfernung des Perikards erfolgte eine mediane Sternotomie, bei der die Schonung der Thoraxorgane höchste Priorität hatte. Der Thorax wurde auseinander gezogen und beide Hälften mittels Nadeln auf der Korkplatte fixiert. Verwachsungen wurden entfernt, um eine volle Lungenentfaltung zu garantieren. Daraufhin wurde der Thymus durch stumpfes Präparieren von Aorta und Pulmonalarterie entfernt. Es erfolgte eine lockere Ligatur um die Pulmonalarterie. Die Herzspitze wurde ca. 0,3 mm proximal des kaudalen Herzendes abgeschnitten, der rechte Ventrikel erhielt eine quere Inzision kaudal der Pulmonalarterie. Der Pulmonaliskatheter war blasenfrei mit sterilem Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin-Puffer bei 37°C gespült und wurde durch den Einschnitt im rechten Ventrikel in die Pulmonalarterie eingeführt. Vor der Bifurkation des Truncus

pulmonalis wurde der Katheter mit einer Ligatur fixiert. Zur Prävention von Luftembolien wurde eine Blasenfalle verwendet. Die Flussrate betrug 1ml/min. Eine pH-Pufferung erfolgte durch den Ersatz von Raumluft durch ein Gasgemisch (74% N_2, 21% O_2, 5% CO_2), sowie Zusatz von Natriumhydrogencarbonat zum Perfusionsmedium.
Der venöse Abfluss des Perfusionsmediums wurde durch einen Katheter im linken Atrium gewährleistet, der durch die Inzision in der Herzspitze über die Klappenebene in das linke Atrium vorgeschoben wurde. Nachfolgende, minimale Lagekorrekturen der Katheter dienten der Verringerung von Passagehindernissen und damit der Sicherung eines definierten Widerstandes im Kreislaufsystem.
Nach Verschluss der Druckkammer erfolgte eine Umschaltung auf Unterdruckbeatmung mit folgenden Parametern: P_{insp} -4,5 cmH_2O, P_{exsp} -9,0 cmH_2O, AF 90/min. Alle vier Minuten erfolgte eine Hyperinflation (“Seufzer“) mit -24 cmH_2O zur Vermeidung von Atelektasen. Die kontinuierliche Messung des Kammerdruckes erfolgte mittels Druckabnehmer, die der Luftgeschwindigkeit mittels Pneumotachograph, der mit einem Differentialdruckabnehmer verbunden war. Ein spezielles Programm (Pulmodyn-Software, Hugo Sachs Elektronik) ermöglichte die kontinuierliche Aufzeichnung und Auswertung der Datenanalyse, sowie die Messung weiterer Parameter, wie Tidalvolumen, pulmonalarterieller Druck und venöser Druck. Darüber hinaus berechnete die Software Atemwegsresistance und dynamische Compliance nach folgender Formel:

$$\mathbf{P = TV * C_{dyn}^{-1} + R_{aw} + dTV * dt^{-1}}$$

P Kammerdruck

C_{dyn} dynamische Compliance

R_{AW} Atemwegsresistance

TV Tidalvolumen

t Zeit

Nach Abschluss der Präparation lief der Versuch über eine Baselinephase von 20 min weiter. Dann erfolgte die intravasale Applikation des HSA über den Pulmonaliskatheter mittels einer Spritzenpumpe in einer kontinuierlichen Rate von 30 µl/min, dabei wurde das HSA dem Perfusionsmedium beigemischt und erreichte eine Konzentration von 0,04%. Nach Ablauf eines zehnminütigen Intervalls erfolgte nun, unter kurzzeitigem

Umschalten von Unterdruck- auf Überdruckbeatmung, die intratracheale Applikation von Pneumolysin (0,2 µg) mittels eines speziell hierfür angefertigten Microsprayers. Anschließend lief der Versuch weitere 10 Minuten und endete mit der in 3.2.3 beschriebenen Gewinnung der BALF-Proben.

Bei einer weiteren Versuchsreihe erfolgte die intravasale Applikation des Caspase1-Hemmers ZYVAD. Diese Substanz wurde im Perfusionsmedium auf eine Konzentration von 2 mM verdünnt und zeitgleich mit der HSA-Applikation erfolgte ein Wechsel vom Perfusionsmedium auf die ZYVAD-Lösung. Danach erfolgte der Versuch wie oben beschrieben.

3.2.2.3 Normwerte und Einstellungen für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

Parameter	**Normalwert**
Perfusionsfluss	1 ml/min kontinuierlich
Unterdruckbeatmung in geschlossener Plexiglaskammer:	
Inspiration	-9,0 cmH_2O
End-Expiration	-4,5 cmH_2O
Tiefe Inspiration	-24,0 cmH_2O
Überdruckbeatmung in offener Plexisglaskammer:	
Inspiration	8,5 cmH_2O
End-Expiration	4,0 cmH_2O

Tab.1
Parameter für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge

3.2.2.4 Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der Leukozyten und ihrer Differenzierung, sowie der Bestimmung von humanem Serumalbumin (HSA) und Zytokinen erfolgte eine Aufarbeitung der bronchoalveolären Lavage. Im Verlauf der Präparation der narkotisierten Tiere (siehe 3.2.2.2) erfolgte die Platzierung einer Trachealkanüle. Nach Abschluss der Messungen in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge wurde über diese Kanüle eine bronchoalveoläre Lavage durchgeführt. Hierzu wurden zweimal 650 ml eisgekühltes PBS durch die Lungen gespült und zurückaspiriert. Dem PBS wurde zuvor ein Protease-Inhibitor (completeTM mini) zugesetzt. Die BAL-Flüssigkeit wurde anschließend 10 Minuten lang bei 32 g und 4°C zentrifugiert. Zur

Bestimmung der HSA-Konzentration wurden von beiden BALF-Proben je 250 µl gepoolt. Von der Probe des ersten Lavagevorganges wurde der Überstand bis auf 50 µl abpipettiert. Dieser Überstand wurde für Zytokinbestimmungen zusammen mit den gepoolten HSA-Proben bei -80°C gelagert. Der Überstand der zweiten Probe wurde ebenso bis auf 50 µl abpipettiert. Es erfolgte eine Poolung und Resuspendierung der verbliebenen Pellets auf 1 ml mit sterilem PBS. Es wurden dann 5 µl Resuspension mit 5 µl Methylenblau vermischt. Das Gemisch wurde zur Ermittlung der Zellzahl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Leukozyten wurden mittels Lichtmikroskop in allen 4 Großquadraten x 16 Kleinquadranten ausgezählt, es wurde der Mittelwert gebildet. Diese ermittelte Zellzahl wurde auf die Gesamtmenge von 1 ml umgerechnet (Zahl x 2 x 10000=Zahl/ml).

In den Infektionsversuchen wurden außerdem zur Differenzierung der Leukozyten Cytospin-Filtereinsätze mit je 100 µl BAL-Flüssigkeit befüllt und anschließend in der Cytospin-Zentrifuge zentrifugiert (800 rpm, 10 min). Die Objektträger wurden anschließend bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet. Dann erfolgten die Färbung mittels Diff-Quik und die Zelldifferenzierung mithilfe des Lichtmikroskopes.

Die Bestimmung des HSA-Gehaltes der Proben erfolgte mit einem ELISA-Kit. Zur Bestimmung der Zytokinlevel wurde ein Bioplex-Kit verwendet. Die Durchführung der Kits erfolgte gemäß den Angaben der Hersteller.

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Bedeutung des Nalp3-Rezeptors im Maus-modell der Pneumokokkenpneumonie

4.1.1 Nalp3-defiziente Mäuse zeigten keine Unterschiede in den klinischen Infektparametern Temperatur und Gewichtsverlust

Es wurden C57Bl/6 Wildtyp (WT)- und Nalp3-/- Mäuse mit Pneumokokken des Serotyps 3 (PN36) mit einer Konzentration von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Als klinische Parameter systemischer Infektion und Entzündungsreaktion wurden Temperatur und Gewichts-verlust erfasst, sowohl 24 Stunden nach Infektion, als auch 48 Stunden nach Infektion. Zu keinem der beiden Zeitpunkte zeigte sich ein Unterschied in den oben genannten Parametern zwischen Nalp3-/- und WT. Es zeigten sich jedoch Unterschiede in Körpertemperatur und Verlust an Körpergewicht zwischen den Infektionsgruppen und der jeweiligen PBS-Kontrollgruppe zu beiden Zeitpunkten (Abb.1).

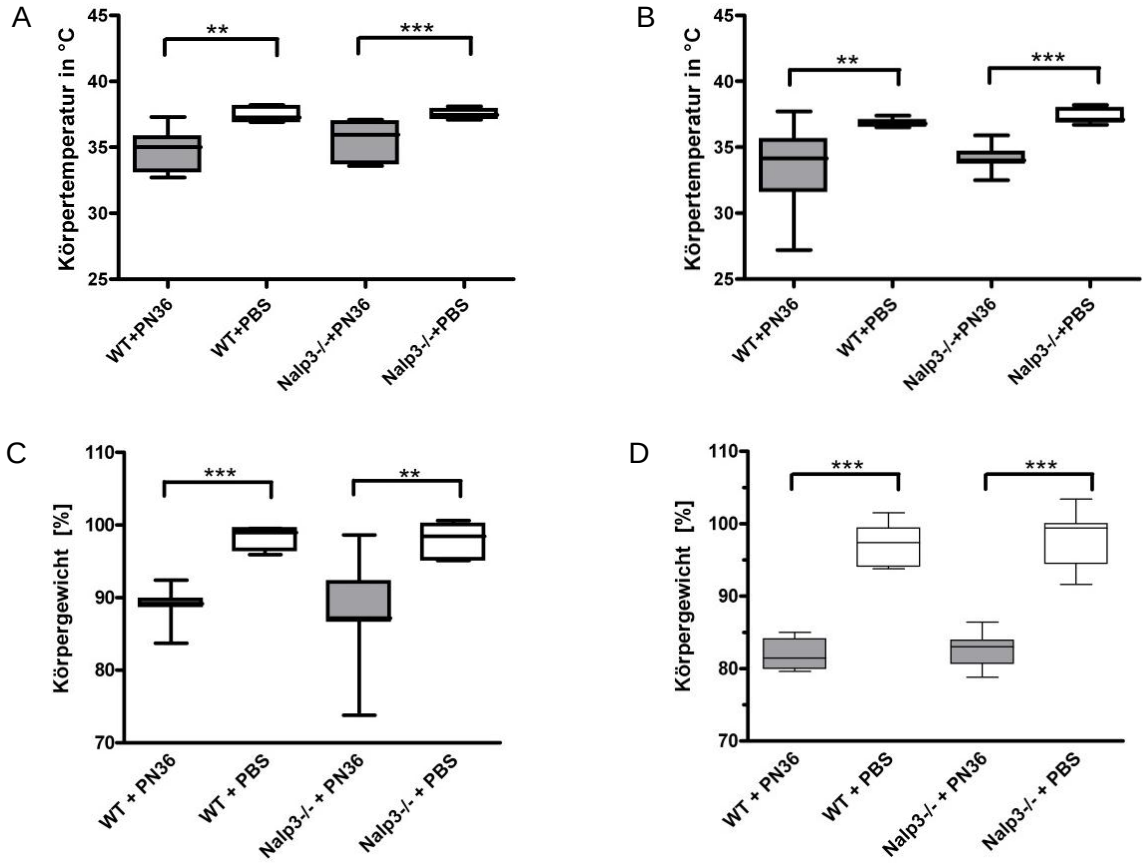


Abb. 1
C57Bl/6 WT- und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 24 Stunden (A+C) bzw. 48 Stunden (B+D) wurden Körpertemperatur und Körpergewichtsverlust erfasst. Für 24 Stunden jeweils n = 8 Tiere für die Infektionsgruppen und

n = 6 für die PBS-Kontrollgruppen und für 48 Stunden n = 10 für die WT-Infektionsgruppe und jeweils n = 7 für die restlichen Gruppen. Signifikanzen werden durch * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.1.2 Nalp3-Defizienz verstärkte die pulmonale Hyperpermeabilität in der Frühphase der Pneumonie

Im nächsten Schritt wurde die Permeabilität der Lungenstrombahn als ein Parameter der funktionell-morphologischen Integrität der pulmonalen Schrankenstörung untersucht. Als Maß der Permeabilität wurde der Quotient aus HSA-Gehalt in der BALF und HSA-Gehalt im Plasma erfasst [HSA BAL/HSA Plasma]. Ein Anstieg dieses Quotienten spiegelt eine erhöhte Permeabilität in der Lungenstrombahn wider. Es war zu beobachten, dass infizierte Tiere eine erhöhte Permeabilität gegenüber den PBS-Kontrollgruppen aufwiesen. Außerdem zeigte sich, dass Nalp3-defiziente Tiere 24 Stunden nach Infektion eine stärkere Permeabilitätserhöhung im Vergleich zu den WT ausprägten. Zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Infektion konnte dieser Unterschied nicht mehr beobachtet werden (Abb. 2). Der Nalp3-Rezeptor scheint also eine Rolle in der Begrenzung frühinflammatorischer Schäden der Mikrozirkulation der Lungenstrombahn zu spielen.

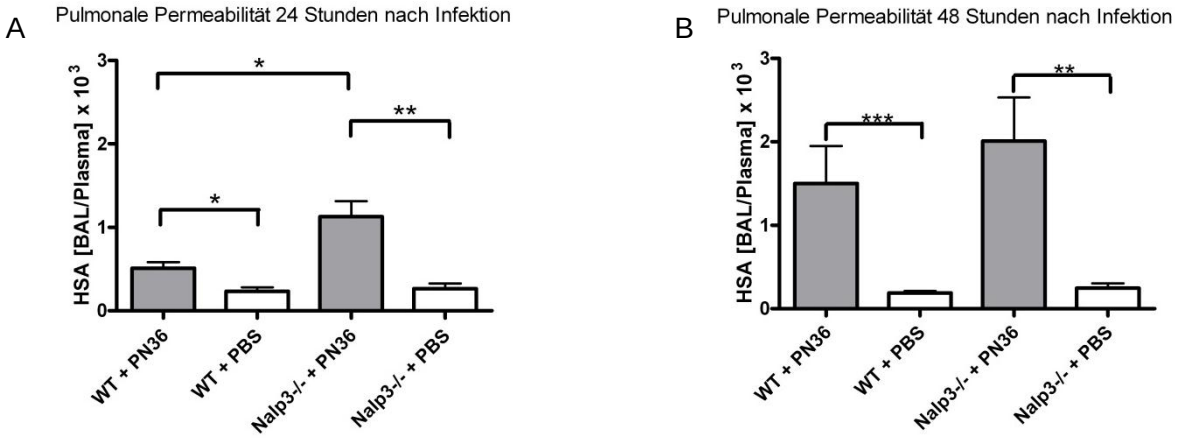


Abb. 2
C57Bl/6 WT- und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) wurde den Tieren humanes Serumalbumin intravenös verabreicht und eine Stunde später erfolgte die Präparation mit Entnahme von Blut und bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF)-Proben. Für 24 Stunden jeweils n = 8 Tiere, für die Infektionsgruppe und n = 6 für die PBS-Kontrollgruppen und für 48 Stunden n = 10 für die WT-Infektionsgruppe und jeweils n = 7 für die restlichen Gruppen. Signifikanzen werden durch * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.1.3 Nalp3-/- Mäuse zeigten keine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen in der BALF im Vergleich zu WT

Sowohl in der Gruppe der Nalp3-/- Tiere, als auch bei den WT konnte 24 und 48 Stunden nach Infektion eine gegenüber der jeweiligen PBS-Kontrollgruppe erhöhte Anzahl an Entzündungszellen in der BALF gefunden werden. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Anzahl eingewanderter Zellen zwischen infizierten WT- und Nalp3-/- Mäusen gefunden werden, weder zum Zeitpunkt 24 Stunden noch zum Zeitpunkt 48 Stunden (Abb. 3). In der gewählten Infektionsdosis beeinflusst die Defizienz des Nalp3-Rezeptors also nicht messbar die Extravasation von Entzündungszellen.

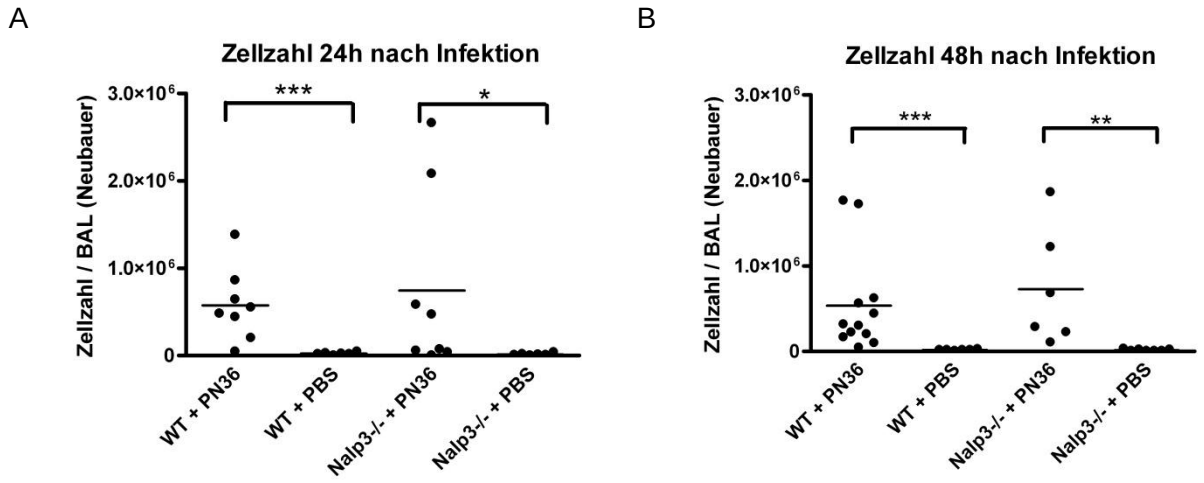


Abb. 3
C57Bl/6 WT- und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 24 Stunden (A) bzw. 48 Stunden (B) wurden die Tiere präpariert und in den entnommenen BALF-Proben wurden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Jeder Punkt in den angegebenen Diagrammen entspricht einem Tier, der jeweilige Mittelwert ist angegeben. Signifikanzen werden durch * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt.

4.1.4 Es bestand kein Unterschied in der Art der rekrutierten Entzündungszellen in der BALF zwischen Nalp3-defizienten und WT-Mäusen

Bei der Untersuchung der Verteilung der Entzündungszellarten im Extravasat zeigten sich Unterschiede zwischen den Gruppen der infizierten Tiere und der nicht-infizierten Tiere. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt und für keine Zellart ein Unterschied zwischen den infizierten Nalp3-defizienten und den infizierten WT-Mäusen gezeigt werden. In der Population der Granulozyten konnte 48 Stunden nach Infektion ein

deutlicher Anstieg in der Gruppe der infizierten gegenüber den nicht-Infizierten Mäusen registriert werden, dieser Unterschied bestand nicht nach 24 Stunden (Abb. 4, A+B). Nach 24 Stunden bestanden signifikante Unterschiede in der Größe der Makrophagen-populationen lediglich zwischen den infizierten Nalp3-/- Mäusen und den nicht infizierten Nalp3-/- Mäusen. Zum Zeitpunkt 48 Stunden konnte dieser Unterschied dann auch für die WT-Mäuse gezeigt werden (Abb. 4, C+D).

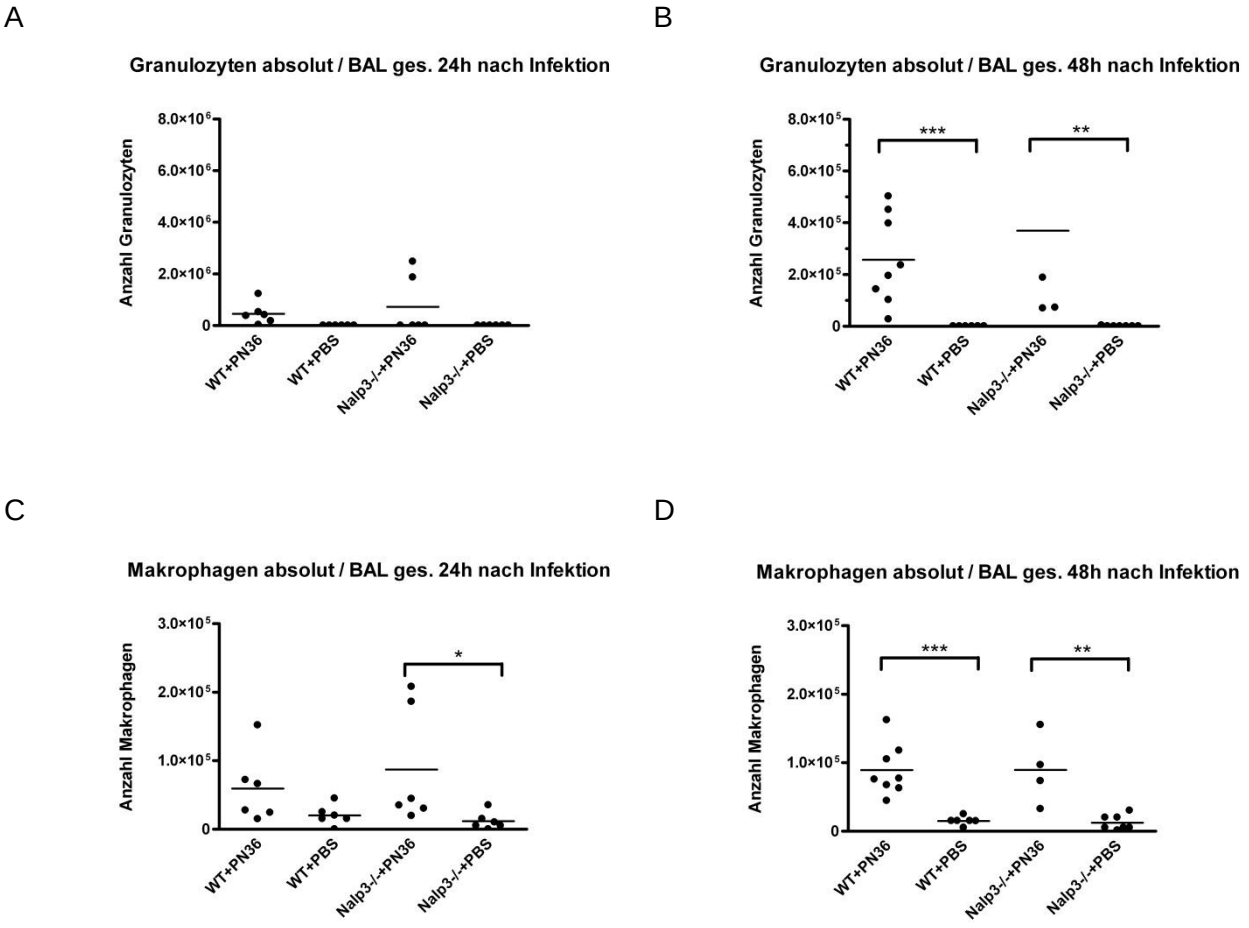
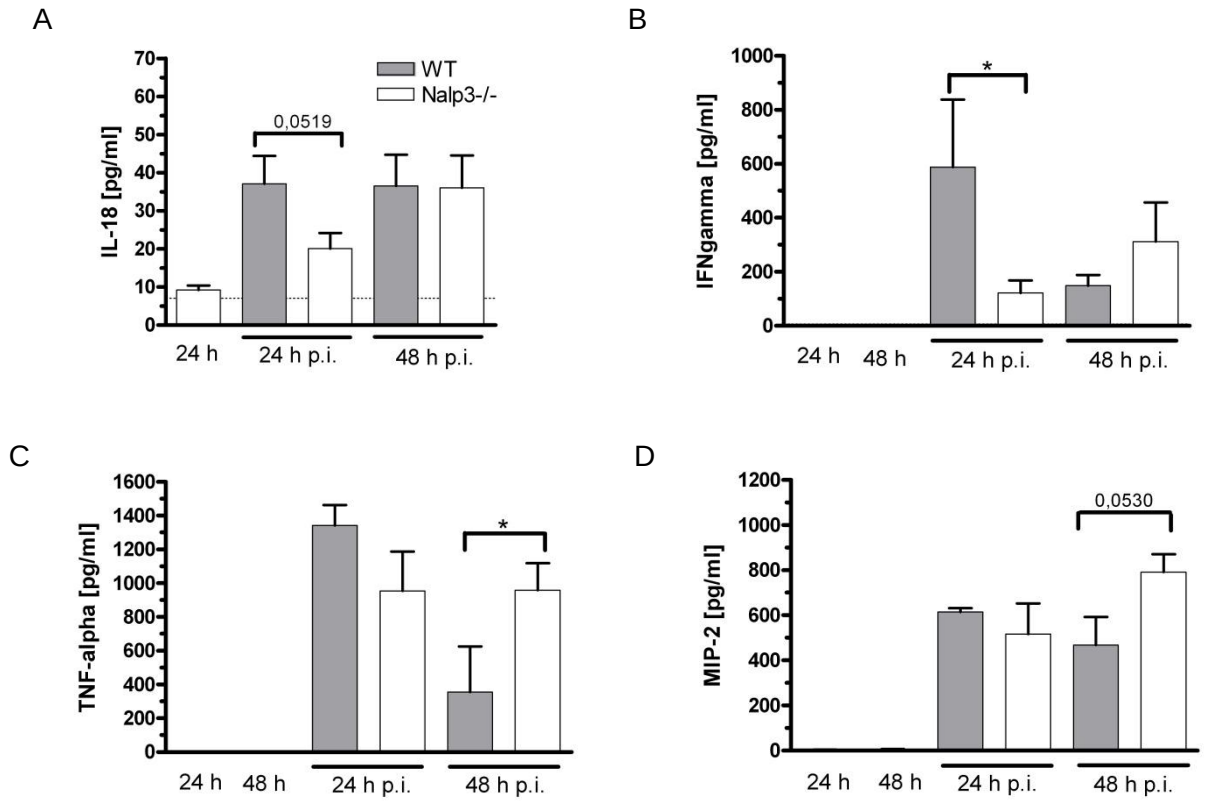


Abb. 4
C57Bl/6 WT- und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 24 Stunden (A+C) bzw. 48 Stunden (B+D) wurden die Tiere präpariert und in den entnommenen BALF-Proben wurde eine Differenzierung der Leukozyten vorgenommen. Jeder Punkt in den angegebenen Diagrammen entspricht einem Tier, der jeweilige Mittelwert ist angegeben. Signifikanzen werden durch * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt.

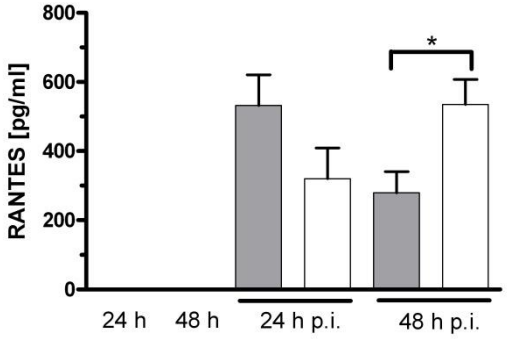
4.1.5 Die Defizienz des Nalp3-Rezeptors beeinflusste das Zytokin-/Chemokinexpressionsmuster in der Pneumokokkenpneumonie

Verschiedene Zytokine und Chemokine spielen eine entscheidende Rolle in der Vermittlung und Initiierung inflammatorischer Prozesse und Schädigungen in der Pneumokokkenpneumonie.

Es konnte gezeigt werden, dass die Nalp3-Defizienz sowohl in der Früh- als auch in der Spätphase der inflammatorischen Vorgänge innerhalb der ersten 48 Stunden nach Infektion mit PN36 Einfluss auf die Expression der Zytokine und Chemokine hat. In der Frühphase zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Infektion waren zunächst die Konzentrationen von IL-18, IFN-γ und KC der Nalp3-/- Mäuse gegenüber den WT-Mäusen in der BALF vermindert. Die Verminderung dieser Substanzen konnte in der späteren Phase (48 Stunden nach Infektion) nicht mehr gezeigt werden. Dem gegenüber wies die Gruppe der Nalp3-/- Mäusen gegenüber den WT-Mäusen erhöhte Level von TNF-α, MIP-2 und RANTES 48 Stunden nach Infektion auf. Zum früheren Zeitpunkt t = 24 Stunden konnten diese Unterschiede nicht nachgewiesen werden (Abb. 5). Für das Schlüsselzytokine IL-1β konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen infizierten Nalp3-/- und infizierten WT gezeigt werden (Daten nicht abgebildet).



E



F

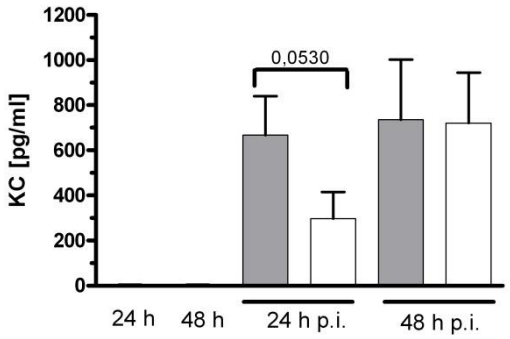
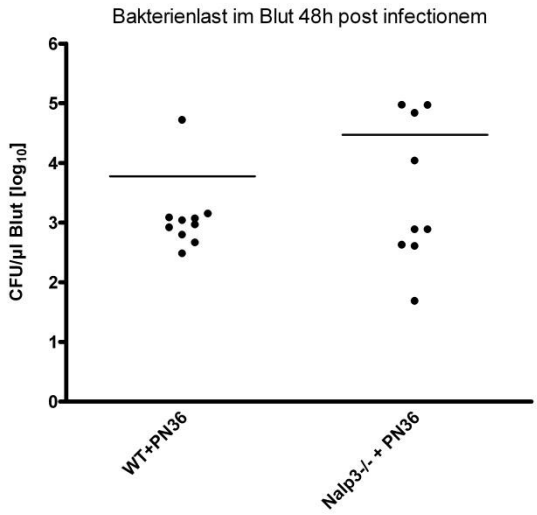


Abb. 5
C57Bl/6 WT- und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden wurden die Tiere präpariert und in den entnommenen BALF-Proben wurden mittels Bioplex Zytokinlevel ermittelt. Für die Infektionsgruppen war die Gruppengröße n = 5-7 Tiere und für die PBS-Kontrollgruppen n = 3-5. Signifikanzen werden durch * P<0,05 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.1.6 Nalp3-defiziente Mäuse zeigten eine erhöhte Bakterienlast in der Lunge

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde der Einfluss der Nalp3-Defizienz auf die Erregerzahl in Blut und Lunge untersucht. Hierzu wurden Blut und Lunge 48 Stunden nach erfolgter Infektion mit PN36 entnommen und es erfolgte eine Anzucht auf Blut-Agar-Platten. Im Blut bestand kein Unterschied in der Anzahl der Erreger zwischen den Nalp3-/- und den WT-Mäusen (Abb. 6 A). In der Lunge sah man bei den Nalp3-defizienten Tieren jedoch eine deutliche Tendenz zu einer erhöhten Erregerzahl (Abb. 6 B).

A



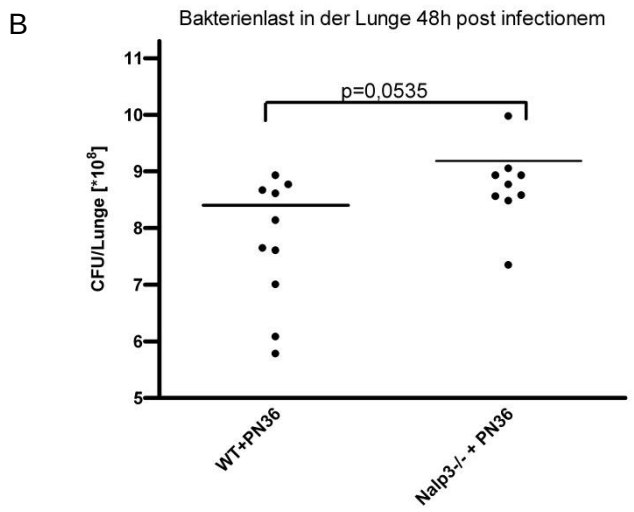


Abb. 6
C57Bl/6 und Nalp3-/- Mäuse wurden mit PN36 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Tiere präpariert und unterschiedliche Blutverdünnungen bzw. unterschiedliche Verdünnungen der nach Protokoll verarbeiteten Lunge auf Blut-Agar-Platten ausgestrichen. Jeder Punkt in den angegebenen Diagrammen entspricht einem Tier, der jeweilige Mittelwert ist angegeben.

4.2 Untersuchung der Mechanismen der Nalp3-vermittelten inflammatorischen Prozesse in der Pneumokokkenpneumonie

Im Rahmen des aktuellen Projektes konnte in in vitro Versuchen gezeigt werden, dass die IL-1β-Produktion der mit *Streptococcus pneumoniae* infizierten Wirtszelle zum einen nur im Beisein von Pneumolysin ausgelöst wird und zum anderen abhängig von TLR2 und dem Nalp3-Inflammasom ist (119).

Außerdem wurde die Beobachtung, dass Pneumolysin dosisabhängig Permeabilität in der isoliert perfundierten Mauslunge erhöht, von der Arbeitsgruppe bereits publiziert (120). Ausgehend von diesen in vitro und ex vivo Resultaten fanden die Untersuchungen zu den Mechanismen am ex vivo-Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) statt.

4.2.1 Die Pneumolysin-induzierte Permeabilitätsstörung ist unabhängig vom Toll-like-Rezeptor 4

Bei der Untersuchung der Mechanismen der Pneumolysin-induzierten Hyperpermeabilität im Modell der IPML wurde zunächst die Bedeutung des Toll-like-Rezeptors 4 (TLR4) anhand von TLR4-defizienten Mäusen untersucht. In der IPML zeigte sich nach intratrachealer Pneumolysinapplikation kein signifikanter Unterschied im HSA-Level in der BALF zwischen TLR4-/- und WT-Mäusen. Jedoch erhöhte Pneumolysin innerhalb der WT- und TLR4-/- Gruppe signifikant die HSA-Konzentrationen in der BALF im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 8 A+B).

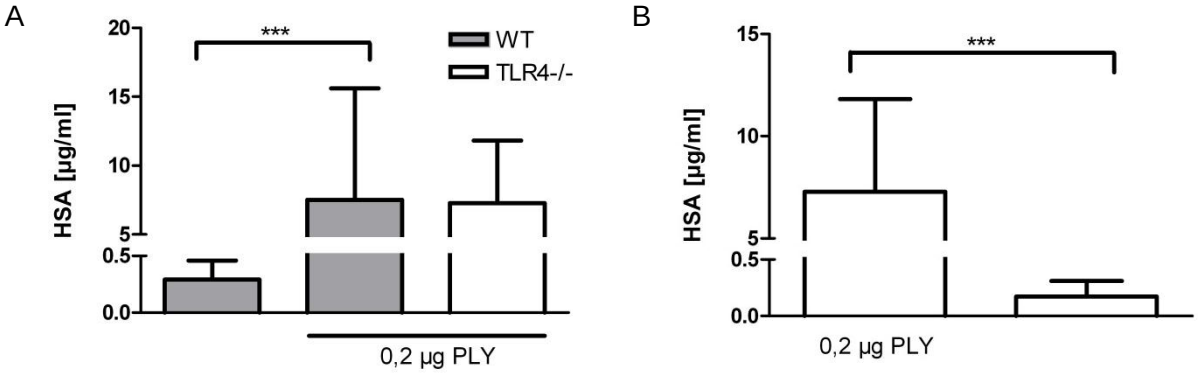


Abb. 8
Die Untersuchung der Bedeutung des TLR4 für die Pneumolysin-induzierte Permeabilitätsstörung erfolgte an isoliert perfundierten und ventilierten Lungen von TLR4-/- und WT-Mäusen. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 8-9 Tiere. Signifikanzen werden durch *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.2.2 Nalp3-defiziente Mäuse entwickelten in der IPML nach Pneumolysin-applikation ausgeprägtere Permeabilitätsstörungen

Es konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz des intrazellulären Nalp3-Rezeptors eine höhere Permeabilität nach Pneumolysingabe im Vergleich zu WT-Mäusen bedingt (Abb. 9). Der Nalp3-Rezeptor begrenzt somit die Pneumolysin-bedingte Hyperpermeabilität im Modell der IPML.

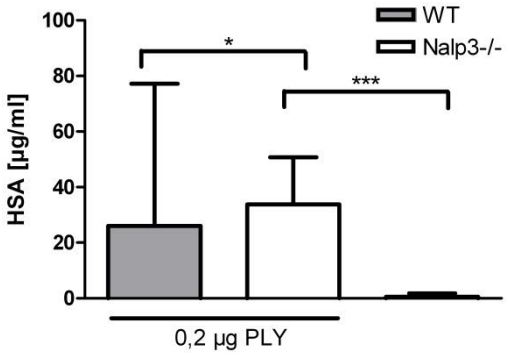


Abb. 9
Der Einfluss des intrazellulären Nalp3-Rezeptors auf die Permeabilitätserhöhungen in der Lungenstrombahn nach intratrachealer Pneumolysinapplikation wurde an isoliert perfundierten Lungen von WT- und Nalp3-/- Mäusen untersucht. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 7-8 Tiere. Signifikanzen werden durch * P<0,05, *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.2.3 Der Caspase-1-Inhibitor ZYVAD verminderte die Pneumolysin-induzierte Hyperpermeabilität

Nach intratrachealer Pneumolysingabe wurde durch kontinuierliche Gabe des vaskulär applizierten Caspase-1-Inhibitors ZYVAD eine signifikante Verminderung des HSA-Levels in der BALF im Vergleich zur Gruppe ohne ZYVAD-Applikation erreicht. Eine vollständige Hemmung der Pneumolysin-induzierten vaskulären Hyperpermeabilität wurde durch die Caspase-1-Blockade nicht erreicht und es wurden erhöhte HSA-Spiegel gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe gemessen (Abb. 10).
Ein wichtiger Teilschritt in der Signalkaskade der inflammatorischen Vorgänge zur Vermittlung pulmonaler Hyperpermeabilität ist somit die Aktivierung der Caspase-1.

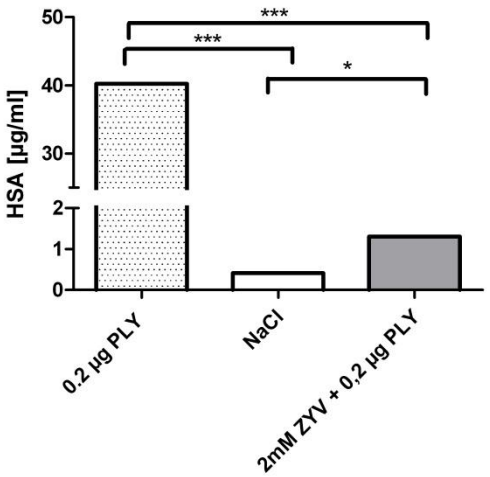


Abb. 10
Die Untersuchung der Bedeutung der Caspase-1 in der Pneumolysin-induzierten Lungenschädigung in der IPML erfolgte durch kontinuierliche Gabe des Caspase-1-Inhibitors ZYVAD über einen vaskulären Zugang. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 7-8 Tiere. Signifikanzen werden durch * P<0,05, *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.3 Untersuchung des Einflusses des Nalp3-Rezeptors auf die Sterblichkeit

4.3.1 Erhöhte Sterblichkeit bei Nalp3-Defizienz in der Pneumonie

Der Einfluss des Nalp3-Rezeptors auf die Sterblichkeit in der Pneumokokkenpneumonie wurde in einer Mortalitätsstudie überprüft. Hierbei wurden jeweils zehn Nalp3-/- und zehn WT-Mäuse einer letalen Dosis 70 (LD70, entsprechend 7,5 x 10^5 CFU/Tier) der PN36 ausgesetzt. Zunächst zeigte sich 72 Stunden nach Infektion eine erhöhte Sterblichkeit der Nalp3-defizienten Mäuse. Dieser Unterschied war im weiteren Verlauf nicht mehr zu beobachten (Abb. 11). Die Defizienz des Nalp3-Rezeptors beeinflusste demnach die Sterblichkeit in den ersten 72 Stunden des Infektionsverlaufes und verlor im weiteren Verlauf an Einfluss.

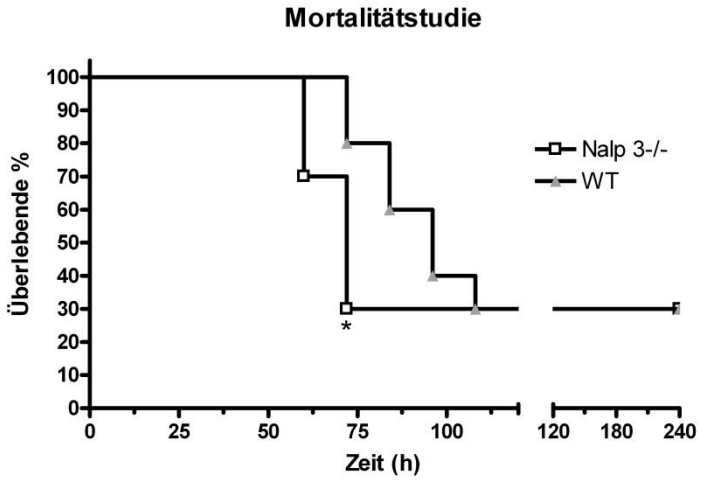
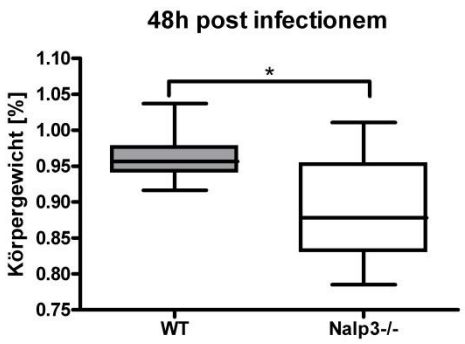


Abb. 11
In einer Mortalitätsstudie sollte der Einfluss des Nalp3-Rezeptors auf die Sterblichkeit überprüft werden. Hierbei wurden die Nalp3-/- und WT-Mäuse mit PN36 in einer LD70 (7,5 x 10^5 CFU/Tier) infiziert und es erfolgte die Erfassung der Sterblichkeit über 240 Stunden. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 10 Tiere. Signifikanzen werden durch * P<0,05 ausgedrückt.

4.3.2 Nalp3-Defizienz bedingt einen gravierenderen Verlust an Körpergewicht in der Frühphase im Mortalitätsversuch

Im Rahmen der Mortalitätsstudie wurden die klinischen Parameter Körpergewicht und Körpertemperatur alle 12 Stunden erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass ein stärkerer prozentualer Verlust an Körpergewicht in der Gruppe der Nalp3-defizienten Tiere zum Zeitpunkt t = 48 Stunden auftrat (Abb. 12 A). Dieser Unterschied weist auf den schwereren Infektionsverlauf bei Nalp3-/- in den ersten 72 Stunden nach Infektion hin. Für den Parameter Körpertemperatur konnte ein solcher Unterschied nicht gezeigt werden (Abb. 12 B).

A



B

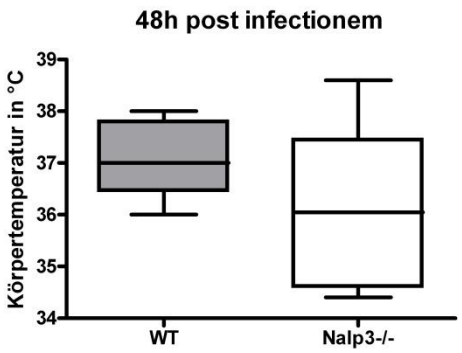


Abb. 12
Im Rahmen der Mortalitätsstudie wurden die Nalp3-/- und WT-Mäuse mit PN36 in einer LD70 (7,5 x 10^5 CFU/Tier) infiziert. Es erfolgte alle 12 Stunden die Messung von Temperatur und Gewicht. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 10 Tiere. Signifikanzen werden durch *P<0,05 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.4 Untersuchung des Einflusses des Polymorphismus des Pneumolysins auf die immunologische Detektion

Im aktuellen Projekt konnte in in vitro Versuchen gezeigt werden, dass die Expression von vollständigem Pneumolysin notwendig für die Induktion der IL-1β-Produktion in *Streptococcus pneumoniae*-infizierten Zellen ist und darüber hinaus die Stimulation der IL-1β Produktion nur durch Pneumokokken-Serotypen mit hämolysierendem Pneumolysin erfolgt (119).

Die Relevanz dieser in vitro gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der Pneumolysin-stimulierten intakten Lunge und des Pneumokokken-infizierten Gesamtorganismus wurde in den nun folgenden Untersuchungen ex vivo und in vivo überprüft.
Im ersten Teil wurden C57Bl/6 Mäuse mit PN36- und ST306-Pneumokokken infiziert und nach 48 Stunden untersucht. Der PN36-Kokkenstamm besitzt ein hämolysierendes Allel-1-Pneumolysin, während ST306 ein nicht-hämolysierendes Allel-5-Pneumolysin kodieren. Im zweiten Teil wurden die Allel-5- und die Allel-1-Pneumolysinvarianten in der IPML untersucht und die resultierenden Permeabilitätsstörungen quantifiziert und miteinander verglichen.

4.4.1 Pneumokokken mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin verursachten keine Infektion

Nach Infektion der C57Bl/6 WT mit dem jeweiligen Kokkenstamm erfolgte die Erfassung der Körpertemperatur und des Körpergewichts nach 48 Stunden. Es konnte ein Körpergewichtsverlust der PN36-infizierten Mäuse gegenüber den ST306-infizierten und auch gegenüber der PBS-Kontrollgruppe gezeigt werden. Außerdem wiesen die PN36-infizierten Mäuse 48 Stunden nach Infektion eine tiefere Körpertemperatur im Vergleich zu den ST306-infizierten Mäusen auf (Abb. 13). ST306 verursachten also in diesem Modell keine Veränderung der klinischen Infektparameter Temperatur und Gewicht.

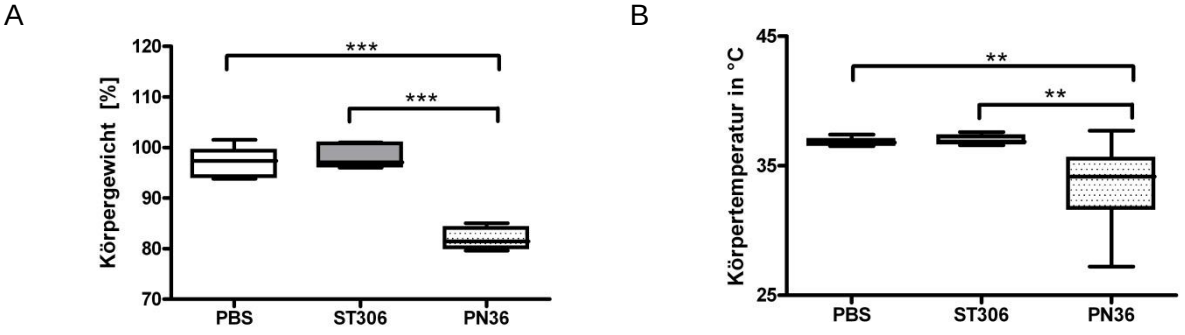


Abb. 13
Es erfolgte eine Infektion von C57Bl/6 Mäusen mit PN36 oder mit ST306 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier. Nach 48 Stunden wurden die Parameter Gewicht (A) und Temperatur (B) erfasst. Gruppengrößen: ST306 n = 6; PN36 n = 10; PBS n = 7. Signifikanzen werden durch ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

4.4.2 Eine gesteigerte Migration von Entzündungszellen in der Lunge konnte nur bei PN36-infizierten Mäusen beobachtet werden

Bei der Infektion von C57Bl/6 WT-Mäusen mit ST306 konnte 48 Stunden nach Infektion keine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen in der BALF gezeigt werden. Die ST306-Gruppe lag auf dem Niveau der PBS-Kontrollgruppe. Die PN36-Gruppe wies im Vergleich eine deutlich erhöhte Anzahl an Entzündungszellen auf (Abb. 14). ST306 mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin bewirkten folglich in diesem Modell keine erhöhte Zellmigration.

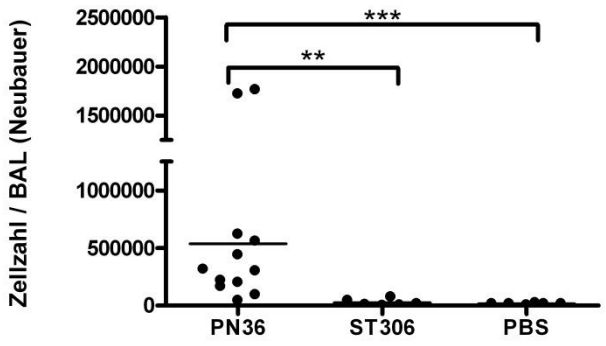


Abb. 14
Es erfolgte eine Infektion von C57Bl/6 Mäusen mit PN36 oder mit ST306 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier. Die Mäuse wurden 48 Stunden nach der Infektion präpariert und in der gewonnenen BALF-Probe wurde mittels Neubauer-Zählkammer die Anzahl an Entzündungszellen ermittelt. Jeder Punkt in den angegebenen Diagrammen entspricht einem Tier, der jeweilige Mittelwert ist angegeben. Signifikanzen werden durch ** P<0,01, *** P<0,001 ausgedrückt.

4.4.3 Pneumokokken ST306 verursachten keine invasive Erkrankung

In einer weiteren Untersuchung wurde überprüft, ob ST306 eine invasive Erkrankung auslösen können. Hierfür wurden nach 48 Stunden Blut und Lunge auf ihre Bakterienlast untersucht. In der ST306-Gruppe konnte 48 Stunden nach Infektion keine einzige Bakterienkolonie nachgewiesen werden, nach einer Stunde jedoch konnten Bakterien in der Lunge detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine erfolgreiche Inokulation, sowie eine komplette Elimination des Erregers durch den Wirt hin. Die PN36-Gruppe zeigte eine deutliche Bakterienlast in Blut und Lunge (Abb. 15). Nicht-hämolysierende ST306-Pneumokokken konnten folglich keine invasive Erkrankung auslösen.

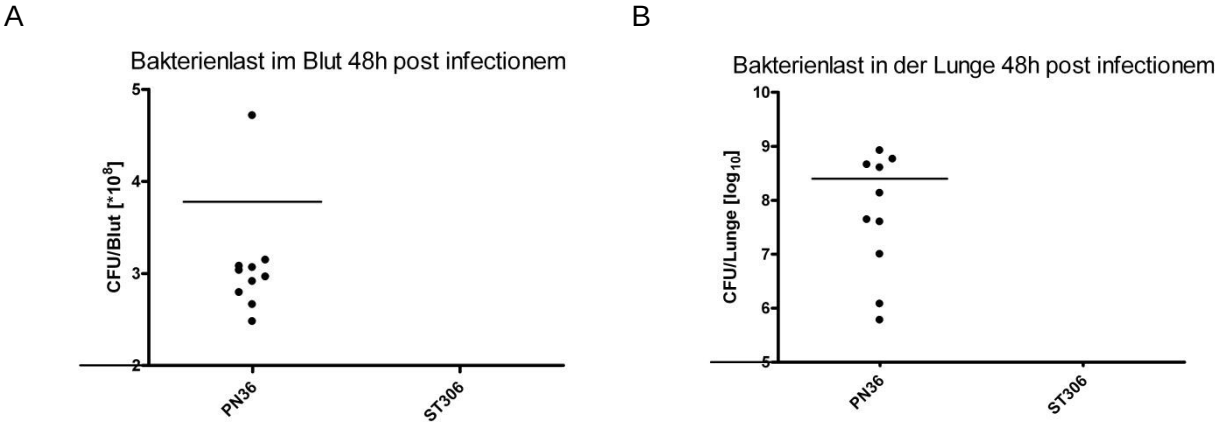


Abb. 15
C57Bl/6 Mäuse wurden mit PN36 und ST306 in einer Dosis von 5 x 10^6 CFU/Tier infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Tiere präpariert und die Zahl der Bakterien in Blut und Lunge quantifiziert. Sowohl im Blut (A) wie auch in der Lunge (B) fanden sich in der Gruppe der PN36-infizierten Mäuse eine hohe Anzahl an Erregern, während in der Gruppe der ST306-infizierten Mäuse in keinem der beiden ein Erregernachweis erfolgte. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 10 Tiere und jeder Punkt in den angegebenen Diagrammen entspricht einem Tier, der jeweilige Mittelwert ist angegeben.

4.4.4 Nicht-hämolysierendes Pneumolysin verursachte keine erhöhte vaskuläre Permeabilität der Lungenstrombahn in der IPML

Zur Untersuchung der Relevanz der hämolysierenden Eigenschaft des Pneumolysins zur Verursachung von mikrovaskulären Permeabilitätsstörungen erfolgte der Einsatz des nicht-hämolysierenden Allel-5-Pneumolysins. Dieses Allel-5-Pneumolysin verursachte im Gegensatz zu Allel-1-Pneumolysin keine Erhöhung der Permeabilität nach intratrachealer Applikation (Abb. 16).

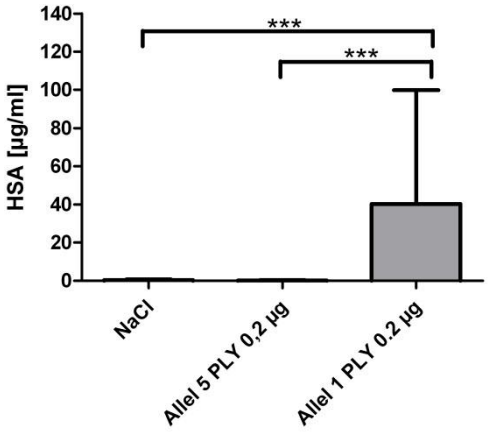


Abb. 16
Im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge erfolgte die intratracheale Applikation von Allel-1-, nicht-hämolysierendem Allel-5-Pneumolysin und NaCl an C57Bl/6 WT. Jede Gruppe umfasste jeweils n = 7-8 Tiere. Signifikanzen werden durch *** P<0,001 ausgedrückt. Die Werte sind angegeben als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.).

5 Diskussion

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung der Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms in der Pneumokokkenpneumonie. Diese Untersuchung geschah durch Verwendung unterschiedlicher Methoden am in vivo Mausmodell der Pneumokokken-pneumonie und am ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML).

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen zu zeigen, dass eine Defizienz des Nalp3-Rezeptors bei Mäusen eine erhöhte Sterblichkeit in den ersten 72 Stunden nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* bedingt. Am wahrscheinlichsten ist dies zum einen auf eine Störung der epithelialen und endothelialen Gewebshomöostase zurückzuführen, so dass durch verstärkte Schädigung der Mikrozirkulation die erhöhte pulmonale Hyperpermeabilität im Vergleich zu den WT bedingt wird. Zum anderen zeigten sich bei Nalp3-Defizienz deutliche Hinweise auf eine erhöhte pulmonale Erregerlast gegenüber den WT, was auf eine verminderte Abwehr gegenüber dem Erreger schließen lässt. Diese geschwächte Antwort scheint jedoch nicht die inflammatorische Immunzellantwort zu betreffen, da hier kein Unterschied bei Defizienz des Nalp3-Rezeptors gesehen werden konnte. In den weiteren Untersuchungen zum Mechanismus der Pneumolysin-induzierten Hyperpermeabilität in der IPML konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin zur Gruppe der Nalp3-aktivierenden Toxine gehört. So zeigten die Lungen Nalp3-defizienter Mäuse eine erhöhte pulmonale Hyperpermeabilität gegenüber den WT. Die intravaskuläre Applikation eines Caspase-1-Inhibitors verminderte hingegen deutlich die pulmonalvaskuläre Permeabilität. Im Experiment mit TLR4-defizienten Mäusen zeigte sich die TLR4-Unabhängigkeit der pulmonalen Hyperpermeabilität nach Pneumolysin-Stimulation. Schließlich konnte im Rahmen des Projektes ein Einfluss des Polymorphismus des Pneumolysins auf die Erkennung und Reaktion des Immunsystems in der Pneumokokkenpneumonie gezeigt werden. Pneumokokkenserotypen mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin riefen im Infektionsmodell der murinen Pneumokokkenpneumonie weder Zeichen der systemischen Infektion noch eine Infektion der Lunge hervor. In der IPML konnte keine pulmonale Hyperpermeabilität nach intratrachealer Applikation von nicht-hämolysierendem Pneumolysin gemessen werden.

5.1 Nalp3 bewirkt eine protektive Immunantwort

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine wichtige Rolle des Nalp3-Rezeptors und des entsprechenden Inflammasomkomplexes in der Immunabwehr gegen *Streptococcus pneumoniae* mit hämolytischem Pneumolysin hin. Den gezeigten Überlebensvorteil von WT gegenüber Nalp3-defizienten Mäusen in der Frühphase der Pneumokokkenpneumonie konnte eine unabhängige weitere Studie nicht nur bestätigen, sondern darüber hinaus einen signifikanten Überlebensnachteil der Nalp3-defizienten Mäuse über den gesamten Krankheitsverlauf zeigen (121). Es besteht also zusätzliche Evidenz für einen gravierenderen Verlauf der Pneumokokkenpneumonie in Nalp3-defizienten Mäusen.

Eine Erklärung für die erhöhte Empfänglichkeit Nalp3-defizienter Mäuse liefert zum einen der deutliche Hinweis auf verminderte IL-18-Level in der BALF und die konsekutiv abgeschwächte Produktion an KC und IFN-γ. Im Gegensatz hierzu fanden andere Studien keine signifikanten Unterschiede im IL-18- und IL-1β-Level der BALF zwischen Nalp3-defizienten und WT, aber zwischen ASC-defizienten Mäusen und WT und schlussfolgerten hieraus, dass ASC wichtiger als Nalp3 für die Caspase-1-Aktivierung ist (121). Das ließe darauf schließen, dass andere PRRs neben Nalp3 in der ASC-abhängigen IL-1β- und IL-18-Sekretion involviert sind. Als ein möglicher Kandidat wurde der PRR AIM2 identifiziert, der dsDNA der Pneumokokken detektiert (121). Weiterhin ist es denkbar, dass die verminderte Caspase-1-Aktivität weitere Schwächen der Immunabwehr bedingen könnte. So könnte eine verminderte Pyroptose den Pool infizierter Zellen erhöhen und außerdem eine gedämpfte post-pyroptotische Sekretion wichtiger pro-inflammatorischer Chemo- und Zytokine bedingen. Zusätzlich könnte eine abgeschwächte IFN-γ-Produktion pulmonaler Abwehrzellen die effektive makrophagozytäre Clearance von Erregern in intrazellulären Phagosomen stören. Beides zusammen würde eine Erklärung für die im Rahmen des Projektes erhaltenen deutlichen Hinweise auf erhöhte pulmonale Bakterienlast Nalp3-defizienter Mäuse gegenüber WT in der Pneumokokkenpneumonie liefern. Eine aktuelle Studie konnte diese Hypothese durch signifikante Resultate bestätigen (121).

In der gleichen Studie konnte im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie ebenso gezeigt werden, dass eine ASC-Defizienz eine erhöhte pulmonale Erregerlast gegenüber den WT verursacht, aber es konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Nalp3-defizienten Tieren gesehen werden (121).

Ausgehend von der Hypothese, dass die erhöhte pulmonale Erregerlast hauptsächlich eine Konsequenz der abgeschwächten Pyroptose ist, wäre bei Nalp3-Redundanz und gleichzeitiger strenger ASC-Abhängigkeit eine höhere pulmonale Erregerlast ASC-defizienter gegenüber Nalp3-defizienten Mäusen zu erwarten gewesen. Da beide aber de facto auf dem gleichen Level erhöhter pulmonaler Erregerlast lagen, lässt sich darüber spekulieren, ob eventuell ein ASC-unabhängiger Mechanismus der Pyroptose in der murinen Pneumokokkenpneumonie besteht. Zur genaueren Untersuchung müsste hier in einem zukünftigen Projekt eine genauere Erfassung der Pyroptose, z.B. mittels Kanamycin-Protection-Assay, erfolgen. Außerdem wäre von Interesse zu sehen, wie sich eine Inhibition der Caspase-1 auf die Pyroptoserate und die pulmonale Erregerlast auswirken könnte.

In der Literatur wurde im Pneumoniemodell mit *Burkholderia pseudomallei* eine ASC-unabhängige, Caspase-1-abhängige Induktion der Pyroptose des NLRC4-Inflammasomes gesehen (122). Diese ASC-Redundanz der Pyroptose wurde auch bereits in anderen Infektionsmodellen, u.a. Listerien, Shigellen, beschrieben (123, 124). Diese Ergebnisse untermauern die Vermutung, dass auch in der murinen Pneumokokkenpneumonie ein alternativer ASC-unabhängiger Signalweg zur Aktivierung der Pyroptose besteht.

In diesem Projekt konnte kein Unterschied in der Art und Anzahl der rekrutierten pulmonalen Entzündungszellen gesehen werden. Dieser geringe Einfluss des Nalp3-Rezeptors auf die inflammatorische Immunzellantwort wurde aktuell auch für die Klebsiellenpneumonie publiziert (125).

5.2 Nalp3 leistet einen wichtigen Beitrag zur pulmonalvaskulären Integrität

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine unerwartet wichtige Rolle des Nalp3-Inflammasomkomplexes zum Erhalt der endo- und epithelialen Integrität des Lungengewebes hin.

So zeigten Nalp3-defiziente Mäuse in der Pneumokokkenpneumonie als Konsequenz der verstärkten Permeabilität der pulmonalen Endothel-/ Epithelbarriere ein stärker ausgeprägtes Lungenödem als WT. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Lungenödem in der Frühphase der Pneumokokkenpneumonie hauptsächlich durch

hämolytisches Pneumolysin ausgelöst wird (120). Die pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität trägt möglicher Weise zu einem großen Teil zur erhöhten Sterblichkeit in der Frühphase der Pneumonie bei. Momentan ist jedoch noch unklar auf welchem Mechanismus der protektive Effekt des Nalp3-Rezeptors für die pulmonalvaskuläre Integrität in der murinen Pneumokokkenpneumonie basiert.

Aktuelle Studien konnten in unterschiedlichen Modellen verschiedene Erklärungswege liefern. So konnte zum einen in vitro ein direkter Nalp3-inflammasomregulierter Reparaturmechanismus am Beispiel des porenformenden Toxins Aerolysin demonstriert werden. So aktiviert dieses Toxin der Aeromonas-Gruppe das Inflammasom und es kommt zu einer Caspase-1-abhängigen Aktivierung des Sterol Regulatory Element Binding Protein-2 (SREBP-2). In Folge des SREBP-Signalweges kommt es zur vermehrten Expression lipogener Gene. Dieser Eingriff in die Cholesterol- und Lipidbiosynthese aktiviert Reparaturmechanismen der Zellmembran (85).

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die IL-18-Produktion durch das Nalp3-Inflammasom in epithelialen Zellen des Kolons als ein wichtiger Vermittler für die Reparatur der mukösen Barriere agiert und gegen inflammatorische Schäden schützt.

Die Vermittlung erfolgt hier wahrscheinlich über den IL-18-Rezeptor des Darmepithels und der lokalen Entzündungszellen (86). Weitere frühere Studien stehen hiermit im Einklang und berichteten über die Beteiligung von IL-18 an Reparatur und Wiederherstellung von ulzeriertem Epithel (126). In zukünftigen Studien sollte eruiert werden, ob einer dieser Signalwege auch in der Pneumokokkenpneumonie von Bedeutung ist.

5.3 Die Pneumolysin-induzierte Hyperpermeabilität ist TLR4-unabhängig

In ex vivo-Versuchen an der IPML konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität nach intratrachealer Gabe von hämolysierendem Pneumolysin unabhängig vom TLR4-Rezeptor, aber abhängig vom Nalp3-Rezeptor und der Caspase-1 vermittelt wird. Die zugrundeliegende Vorstellung ist, dass Pneumolysin zunächst einmal pro-IL-1β induziert. Diese Fähigkeit zum pro-IL-1β Priming wurde für zahlreiche Inflammasomaktivatoren gezeigt (127) und basiert wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Aktivierbarkeit pulmonaler Zellen bei verändertem extrazellulären

Milieu während der Inflammation, d.h. diese reagieren dann auf einen entsprechenden Nalp3-Aktivator, wie z. B. Pneumolysin, mit proIL-1β-Produktion (80). Gleichzeitig aktiviert Pneumolysin den Nalp3-Rezeptor und bewirkt durch die Formierung des Nalp3-Inflammasoms die Caspase-1-Aktivierung mit nachfolgender Maturierung von IL-1β. Hierdurch kommt es zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, einschließlich des IL-1β, die u.a. die pulmonalvaskuläre Schrankenstörung bedingen.

In Experimenten mit TLR4-defizienten Mäusen konnte keine Einflussnahme des TLR4-Rezeptors auf die Pneumolysin-induzierte pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität nachgewiesen werden. Bestätigend zeigten in vitro Untersuchungen mit *Streptococcus pneumoniae* D39-infizierten TLR4-defizienten murinen Knochenmarksmakrophagen (BMMs) keine signifikante Verminderung der IL-1β-Sekretion gegenüber den D39-infizierten WT-BMMs (119). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit einer bereits publizierten Studie, die ebenso TLR4-unabhängige immunstimulierende Effekte des Pneumolysins im Mausmodell und eine TLR4-unabhängige Caspase-1-Aktivierung nach Pneumolysinstimulation in DCs und Splenozyten zeigte (127). Eine weitere Studie konnte übereinstimmend eine TLR4-unabhängige Caspase-1-Aktivierung nach *Streptococcus pneumoniae*-Infektion in Makrophagen nachweisen (121).

Im Rahmen des aktuellen Projektes konnten in vitro Experimente außerdem die Rolle des Pneumolysins in der IL-1β-Induktion bestätigen. So zeigte sich bei Infektion von BMMs mit einem Pneumolysin-defizienten Pneumokokkenmutant ΔD39 keine IL-1β Produktion, jedoch konnte ein transkriptioneller Anstieg verzeichnet werden. Somit aktiviert Pneumolysin die Caspase-1-abhängige Inflammasome-vermittelte posttranslationale Prozessierung des Präkursors pro-IL-1β zu IL-1β (119).

Zur Erforschung der weiteren Mechanismen der Pneumolysin-induzierten IL-1β-Sekretion wurden im Rahmen des aktuellen Projektes außerdem die IL-1β-Produktion *Streptococcus pneumoniae* D39-infizierter TLR2-, ASC- und Nalp3-defizienter BMMs gemessen. Hierbei zeigte sich eine Abhängigkeit der IL-1β-Produktion von TLR2, ASC und Nalp3 (119). Diese Erkenntnisse stimmen überein mit aktuell publizierten Ergebnissen, die sowohl eine Nalp3-, als auch ASC-Abhängigkeit der Pneumokokken-induzierten IL-1β-Sekretion zeigen konnten (121, 127).

Da in dieser Arbeit die intravaskuläre Applikation eines Caspase-1-Inhibitors die pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität deutlich verminderte, während eine Defizienz des Nalp3-Rezeptors diese signifikant erhöhte, stellt sich die Frage nach den genauen

Mechanismen hinter den inflammatorischen Vorgängen, die dieses Phänomen bedingen.
Eine Hypothese ist, dass basale Level aktivierter Caspase-1 entweder in pulmonalen Abwehr- oder Epithelzellen vorliegen (128). Eine aktuelle Studie konnte basale Mengen aktivierter Caspase-1 in humanen Blutmonozyten feststellen, jedoch nicht in humanen Alveolarmakrophagen (129). Als weitere mögliche Erklärung ist auch ein alternativer Caspase-1-aktivierender NLR in Erwägung zu ziehen, der ebenso Pneumolysin detektiert. In beiden Szenarien könnte trotz Nalp3-Defizienz IL-1β gebildet werden mit dem Resultat der pulmonalvaskulären Hyperpermeabilität. Demgegenüber könnte die verringerte Menge aktivierter Caspase-1 eine Schwächung der Schutzmechanismen der endo-und epithielialen Integrität verursachen (siehe 5.2).
Eine Inhibition der Caspase-1 führt jedoch zu einer noch deutlicheren Verminderung der IL-1β-Sekretion, was wiederum die signifikant verminderte pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität erklären kann. Zukünftige Studien müssen diese Hypothese prüfen.

5.4 Die immunprotektive Antwort auf Pneumolysin wird durch den Phänotyp bestimmt

In dieser Arbeit konnte Pneumolysin als Nalp3-aktivierendes Toxin identifiziert werden. Bestätigende Resultate über eine Nalp3-abhängige Verstärkung der IL-1β-Produktion durch Pneumolysin wurden aktuell publiziert (127).
Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auf der einen Seite Pneumokokken-spezies mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin in vivo keine messbare Reaktion des Immunsystems und keine Pneumonie auslösten und auf der anderen Seite nicht-hämolysierendes Pneumolysin ex vivo keine Störung der pulmonalvaskulären Barriere in der IPML verursachte.
Im aktuellen Projekt konnten in vitro Experimente durch Inkubation mit Pneumolysinbruchvarianten und Infektion mit Pneumokokken D39 Mutanten, die entsprechende Pneumoylsinbruchvarianten exprimieren, zeigen, dass nur die Expression von vollständigem Pneumolysin die IL-1β-Produktion Induziert. In einem weiteren Schritt erfolgten zum einen die Infektion mit Pneumokokkenserotypen mit hämolysierendem und nicht-hämolysierendem Pneumolysin und zum anderen die Inkubation mit hämolysierendem und nicht-hämolysierendem Pneumolysin. Hierbei

zeigte sich, dass die Stimulation der IL-1β Produktion nur in der Gegenwart hämolysierenden Pneumolysins erfolgte (119). In einer anderen Studie konnte übereinstimmend gezeigt werden, dass die Fähigkeit des Pneumolysins das Nalp3-Inflammasom zu aktivieren von der hämolytischen Aktivität des Toxins abhängig ist (127).

Die Stimulation des Inflammasoms variiert also innerhalb der unterschiedlichen Serotypen der Pneumokokken. Das bedeutet, dass der Polymorphismus des Pneumolysins die Erkennung durch das angeborene Immunsystem bestimmen kann.

Die fehlende Detektion von Pneumokokkenserotypen mit nicht-hämolysierndem Pneumolysin bedeutet jedoch keineswegs, dass diese avirulent sind. So ermöglicht hämolysierendes Pneumolysin zwar die Schädigung von Wirt und Gewebe und erlaubt es gewissen Abwehrmechanismen zu entgehen, aber auf der anderen Seite werden durch Freisetzung von IL-1β und IL-18 potente Resistenzmechanismen des Wirtes aktiviert. Pneumokokken mit nicht-hämolysierendem Pneumolysin sind zwar weniger virulent und bedingen weniger letale Verläufe, aber da sie weniger effizient detektiert werden, bietet sich ihnen eher die Möglichkeit zum Eindringen in sterile Kompartimente des Körpers.

5.5 Ausblick

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass in der murinen Pneumokokken-pneumonie die Stimulation des Nalp3-Rezeptors und die Formierung des Nalp3-Inflammasoms zur Verbesserung der pulmonalen Erregerelimination und zur Aufrechterhaltung der pulmonalen Integrität beitragen. Die Letalität in der Frühphase der experimentellen Pneumokokkenpneumonie der Maus wurde durch die Nalp3-Defizienz erhöht.

Die Übertragbarkeit der Erkenntnisse aus dem murinen Pneumokokkenpneumonie-modell auf die humane Pneumokokkenpneumonie ist begrenzt. Diese Beschränkung der Aussagefähigkeit der Studie macht deutlich, dass weitere Studien in unterschiedlichem Design benötigt werden. Zur näheren Beleuchtung der Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms für die Immunantwort des Menschen könnten klinische Studien zur Aktivität des Nalp3-Inflammasoms in der humanen Pneumonie beitragen. So könnte die Bestimmung von IL-1β-Level oder Caspase-1-Spaltprodukten in Serum und BALF von Patienten erfolgen. Zusammen mit der Isolation und Bestimmung des

vorliegenden Pneumokokkentyps könnte die Korrelation von Klinik, Keim und Inflammasomaktivität analysiert werden. Daraus könnten hilfreiche Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem Mausmodell gezogen werden. Allerdings stellt die Erfassung der in einer derartigen Arbeit besonders relevanten frühen Phase der Auseinandersetzung von Wirt und Erreger im Rahmen klinischer Studien eine besondere Herausforderung dar, weil Patienten sich naturgemäß erst mit einiger Latenz nach Infektion und nach Beginn der Krankheitssymptome ärztlich vorstellen.

Weiterhin könnte ein präklinischer Einsatz von Nalp3-Stimulanzien in der murinen Pneumokokkenpneumonie erste Hinweise auf die Effizienz der Stimulation des Nalp3-Inflammasoms zur prophylaktischen Immunmodulation bei Patienten mit vorübergehend erhöhter Suszeptibilität gegenüber bakterieller Pneumonie (nach Schlaganfall, bei Influenza-Pneumonie, bei Zytopenie, unter invasiver Beatmung) bieten.

Zur näheren Beleuchtung der genauen Natur der protektiven Effekte des Nalp3-Inflammasoms könnten ebenso weitere experimentelle Untersuchungen beitragen. So könnte zum einen die genauere Bestimmung der Pyroptoseaktivität bei Nalp3-Defizienz Aufschluss geben über den Einfluss des Nalp3-Inflammasoms auf die Pyroptoserate und die Bedeutung der Pyroptose für die angeborene Immunabwehr in der murinen Pneumokokkenpneumonie. Zum anderen sollten zukünftige Studien auf die Untersuchung der direkten und indirekten Effekte des Nalp3-Inflammasoms auf die pulmonalvaskuläre Barriere abzielen, so auf die Effekte des IL-18-Signalweges, aber auch auf direkte Caspase-1-abhängige Genregulationen von Membranerhaltungs- und reparaturmechanismen.

Außerdem könnte das Wissen um das Nalp3-Inflammasom zur Entwicklung von labordiagnostischen Frühmarkern für die Identifikation von Hochrisikoverläufen und als Verlaufsmarker genutzt werden. So konnte eine Studie bereits die Bedeutung des IL-1β in der BALF in der Diagnostik der beatmungsassoziierten Pneumonie nachweisen (130). Aber auch Caspase-1-Spaltprodukte sind als mögliche Biomarker denkbar.

Darüber hinaus könnte der Einsatz eines alternativen Nalp3-Aktivators anstelle des bisher verwendeten Aluminiums ein effektiveres Adjuvans zur Impfung darstellen und mit dem bekannten Polysaccharidimpfstoff einen verbesserten Impfschutz erzeugen. So konnten bereits Ergebnisse publiziert werden, die auf einen verbesserten Impfschutz durch die Kombination von nasopharyngeal mittels Spray appliziertem Pneumolysin und dem gängigen Pneumovax® II Impfstoff deuten (131).

Ferner konnte kürzlich gezeigt werden, dass bakterielle mRNA eine Assemblierung des Nalp3-Inflammasoms verursacht und so als „vita-PAMP“ Aufschluss über die Viabilität des bakteriellen Erregers gibt und die Immunantwort des Wirtes verstärkt. Entsprechend der gut etablierten Erkenntnis, dass Lebendimpfstoffe einen besseren Impfschutz bewirken, als Totimpfstoffe wurde außerdem beobachtet, dass bakterielle mRNA die Impfantwort auf hitzeinaktivierte Bakterien wesentlich verstärkt (Sander LE, Blander M in Nature 2011 und Nature Immunol 2012). Daher ist ein Einsatz spezifischer Nalp3-Aktivatoren auch in Hinsicht auf neue Impfstrategien denkbar.

Zusammenfassend könnten ein besseres Verständnis der Mechanismen und der Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms in der Entzündungskaskade der Pneumonie zur besseren Prävention, Behandlung, Verringerung von Komplikationen und Senkung von Letalität beitragen.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war die Charakterisierung der Rolle des Nalp3-Inflammasoms in der Pneumokokkenpneumonie. Zur Bearbeitung der Fragestellungen erfolgte der Einsatz unterschiedlicher Methoden am in vivo Mausmodell der Pneumokokkenpneumonie und am ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass eine Defizienz des Nalp3- Rezeptors eine erhöhte approximative Sterblichkeit in den ersten 72 Stunden nach Infektion mit Pneumokokken bedingt. Anschließende experimentelle Untersuchungen konnten eine vermehrte Störung der pulmonalvaskulären Barriere bei Nalp3-Defizienz in der Pneumonie zeigen. Diese durch Nalp3-Defizienz bedingte gesteigerte pulmonale Hyperpermeabilität gegenüber den WT-Mäusen ist möglicherweise für die erhöhte Sterblichkeit relevant. Außerdem wurde eine erhöhte pulmonale Erregerlast post infectionem bei Nalp3-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen gefunden, was eine Schwächung der Abwehr gegenüber dem Erreger vermuten lässt. Jedoch reduzierte die Nalp3-Defizienz nicht die pulmonale inflammatorische Immunzellantwort. Ferner konnte eine Aktivierung von Nalp-3 durch das Exotoxin der Pneumokokken, Pneumolysin, nachgewiesen werden. In der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge (IPML) wiesen die Lungen Nalp3-defizienter Mäuse eine erhöhte pulmonale Permeabilität nach intratrachealer Pneumolysinapplikation im Vergleich zu Lungen von WT-Mäusen auf. Außerdem führte die gleichzeitige intravaskuläre Applikation eines Caspase-1-Inhibitors bei intratrachealer Pneumolysinapplikation im IPML-Versuch mit WT-Mäusen zu einer deutlich verminderten pulmonalen Hyperpermeabilität. In weiteren Experimenten mit TLR4-defizienten Mäusen konnte darüber hinaus die TLR4-Unabhängigkeit der pulmonalen Hyperpermeabilität nach intratrachealer Pneumolysinapplikation beobachtet werden.
Anschließende Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass der Polymorphismus des Pneumolysins Einfluss auf die Erkennung und Reaktion des Immunsystems in der Pneumokokkenpneumonie nimmt. So konnten in Infektionsversuchen mit Pneumokokken, die nicht-hämolysierendes Pneumolysin produzieren weder Zeichen der systemischen Infektion, noch eine Infektion der Lunge gesehen werden. Passend

hierzu zeigten weitere Untersuchungen in der IPML keine pulmonale Hyperpermeabilität nach intratrachealer Applikation von nicht-hämolysierendem Pneumolysin.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte die elementare Rolle des Nalp3-Rezeptors in der immunologischen Detektion von *Streptococcus pneumoniae* mit hämolytischem Pneumolysin gezeigt werden. Weiterhin fanden sich deutliche Hinweise auf eine verminderte Effizienz der klinisch relevanten Detektion von Pneumokokken mit nicht-hämolytischem Pneumolysin. Daraus kann geschlossen werden, dass eine unterschiedliche Antwort des Nalp3-Inflammasoms auf bestimmte Pneumolysinvarianten wahrscheinlich zu den Unterschieden in der Invasivität und Virulenz der unterschiedlichen Pneumokokkentypen beiträgt. Zukünftige Studien werden benötigt, um diese Hypothese zu bestätigen

Die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit könnten zur Entwicklung neuer erregeradaptierter pharmakologischer Interventionsstrategien beitragen und somit zur Senkung der Letalität der hochinzidenten Pneumokokkenpneumonie in der post-Antibiotika-Ära.

7 Literaturverzeichnis

1. 1996. Hospital-Acquired Pneumonia in Adults: Diagnosis, Assessment of Severity, Initial Antimicrobial Therapy, and Preventive Strategies. A Consensus Statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1711-1725.

2. **Lopez, A. D., and Murray, C. C.** 1998. The Global Burden of Disease, 1990-2020. *Nat Med* 4: 1241-1243.

3. **Marrie, T. J., Lau, C. Y., Wheeler, S. L., Wong, C. J., Vandervoort, M. K., and Feagan, B. G.** 2000. A Controlled Trial of a Critical Pathway for Treatment of Community-Acquired Pneumonia. Capital Study Investigators. Community-Acquired Pneumonia Intervention Trial Assessing Levofloxacin. *JAMA* 283: 749-755.

4. **Hoffken, G., Lorenz, J., Kern, W., et al.** 2009. [Epidemiology, Diagnosis, Antimicrobial Therapy and Management of Community-Acquired Pneumonia and Lower Respiratory Tract Infections in Adults. Guidelines of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, the German Respiratory Society, the German Society for Infectiology and the Competence Network Capnetz Germany]. *Pneumologie* 63: e1-68.

5. **File, T. M., Jr.** 2004. Streptococcus Pneumoniae and Community-Acquired Pneumonia: A Cause for Concern. *Am J Med* 117 Suppl 3A: 39S-50S.

6. **Hament, J. M., Kimpen, J. L., Fleer, A., and Wolfs, T. F.** 1999. Respiratory Viral Infection Predisposing for Bacterial Disease: A Concise Review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 26: 189-195.

7. **Prass, K., Meisel, C., Hoflich, C., et al.** 2003. Stroke-Induced Immunodeficiency Promotes Spontaneous Bacterial Infections and Is Mediated by Sympathetic Activation Reversal by Poststroke T Helper Cell Type 1-Like Immunostimulation. *J Exp Med* 198: 725-736.

8. **Lorente, L., Blot, S., and Rello, J.** 2007. Evidence on Measures for the Prevention of Ventilator-Associated Pneumonia. *Eur Respir J* 30: 1193-1207.

9. **Pugin, J.** 2007. Immunostimulation Is a Rational Therapeutic Strategy in Sepsis. *Novartis Found Symp.* 280: 21-27; discussion 27-36, 160-164.

10. **Bauer, T. T., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., and Welte, T.** 2006. Crb-65 Predicts Death from Community-Acquired Pneumonia. *J Intern Med* 260: 93-101.

11. Schäfer, E., Birkner, N., and BQS-. 2009. *Qualität Sichtbar Machen. Bqs-Qualitätsreport 2008.* . Christof Veit, Jochen Bauer, Klaus Döbler, Burkhard Fischer Düsseldorf, .

12. **Welte, T., Marre, R., and Suttorp, N.** 2006. [What Is New in the Treatment of Community-Acquired Pneumonia?]. *Med Klin (Munich)* 101: 313-320.

13. **Lim, W. S., Macfarlane, J. T., Boswell, T. C., et al.** 2001. Study of Community Acquired Pneumonia Aetiology (Scapa) in Adults Admitted to Hospital: Implications for Management Guidelines. *Thorax* 56: 296-301.

14. **Kobashi, Y., Okimoto, N., Matsushima, T., and Soejima, R.** 2001. Clinical Analysis of Community-Acquired Pneumonia in the Elderly. *Intern Med* 40: 703-707.

15. **de Roux, A., Marcos, M. A., Garcia, E., et al.** 2004. Viral Community-Acquired Pneumonia in Nonimmunocompromised Adults. *Chest* 125: 1343-1351.

16. **Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., and Suttorp, N.** 2010. Innate Immune Recognition in Infectious and Noninfectious Diseases of the Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 181: 1294-1309.

17. Fauci, A. S., 2008. *Harrison's Principles of Internal Medicine / Editors, Anthony S. Fauci ... [Et Al.]*. McGraw-Hill Medical, . New York.

18. **Bals, R., and Hiemstra, P. S.** 2004. Innate Immunity in the Lung: How Epithelial Cells Fight against Respiratory Pathogens. *Eur Respir J* 23: 327-333.

19. **Mizgerd, J. P.** 2008. Acute Lower Respiratory Tract Infection. *N Engl J Med* 358: 716-727.

20. **Ewig, S., and Torres, A.** 2011. Community-Acquired Pneumonia as an Emergency: Time for an Aggressive Intervention to Lower Mortality. *Eur Respir J* 38: 253-260.

21. **Smeeth, L., Thomas, S. L., Hall, A. J., Hubbard, R., Farrington, P., and Vallance, P.** 2004. Risk of Myocardial Infarction and Stroke after Acute Infection or Vaccination. *N Engl J Med* 351: 2611-2618.

22. **Hippenstiel, S., Witzenrath, M., Opitz, B., Schutte, H., Rosseau, S., and Suttorp, N.** 2007. [New Aspects of the Pathophysiology of Pneumonia]. *Internist (Berl)* 48: 459-460, 462-454, 466-457.

23. **Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J.** 2002. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of Proil-Beta. *Mol Cell* 10: 417-426.

24. **Radtke, A. L., and O'Riordan, M. X.** 2006. Intracellular Innate Resistance to Bacterial Pathogens. *Cell Microbiol* 8: 1720-1729.

25. **Ganz, T.** 2003. Defensins: Antimicrobial Peptides of Innate Immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 710-720.

26. **Fritz, J. H., Le Bourhis, L., Sellge, G., et al.** 2007. Nod1-Mediated Innate Immune Recognition of Peptidoglycan Contributes to the Onset of Adaptive Immunity. *Immunity* 26: 445-459.

27. **Magalhaes, J. G., Fritz, J. H., Le Bourhis, L., et al.** 2008. Nod2-Dependent Th2 Polarization of Antigen-Specific Immunity. *J Immunol* 181: 7925-7935.

28. **Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R.** 2001. Toll-Like Receptors Control Activation of Adaptive Immune Responses. *Nat Immunol* 2: 947-950.

29. **Maris, N. A., Dessing, M. C., de Vos, A. F., et al.** 2006. Toll-Like Receptor Mrna Levels in Alveolar Macrophages after Inhalation of Endotoxin. *Eur Respir J* 28: 622-626.

30. **Holt, P. G., Strickland, D. H., Wikstrom, M. E., and Jahnsen, F. L.** 2008. Regulation of Immunological Homeostasis in the Respiratory Tract. *Nat Rev Immunol* 8: 142-152.

31. **Greene, C. M., and McElvaney, N. G.** 2005. Toll-Like Receptor Expression and Function in Airway Epithelial Cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53: 418-427.

32. **Mayer, A. K., Muehmer, M., Mages, J., et al.** 2007. Differential Recognition of Tlr-Dependent Microbial Ligands in Human Bronchial Epithelial Cells. *J Immunol* 178: 3134-3142.

33. **Fan, J., Frey, R. S., and Malik, A. B.** 2003. Tlr4 Signaling Induces Tlr2 Expression in Endothelial Cells Via Neutrophil Nadph Oxidase. *J Clin Invest* 112: 1234-1243.

34. **Li, J., Ma, Z., Tang, Z. L., Stevens, T., Pitt, B., and Li, S.** 2004. Cpg DNA-Mediated Immune Response in Pulmonary Endothelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L552-558.

35. **Brant, K. A., and Fabisiak, J. P.** 2008. Nickel Alterations of Tlr2-Dependent Chemokine Profiles in Lung Fibroblasts Are Mediated by Cox-2. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 591-599.

36. **He, Z., Zhu, Y., and Jiang, H.** 2009. Toll-Like Receptor 4 Mediates Lipopolysaccharide-Induced Collagen Secretion by Phosphoinositide3-Kinase-Akt Pathway in Fibroblasts During Acute Lung Injury. *J Recept Signal Transduct Res* 29: 119-125.

37. **Meneghin, A., Choi, E. S., Evanoff, H. L., et al.** 2008. Tlr9 Is Expressed in Idiopathic Interstitial Pneumonia and Its Activation Promotes in Vitro Myofibroblast Differentiation. *Histochem Cell Biol* 130: 979-992.

38. **Sugiura, H., Ichikawa, T., Koarai, A., et al.** 2009. Activation of Toll-Like Receptor 3 Augments Myofibroblast Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 654-662.

39. **Sukkar, M. B., Xie, S., Khorasani, N. M., et al.** 2006. Toll-Like Receptor 2, 3, and 4 Expression and Function in Human Airway Smooth Muscle. *J Allergy Clin Immunol* 118: 641-648.

40. **Jiang, D., Liang, J., Fan, J., et al.** 2005. Regulation of Lung Injury and Repair by Toll-Like Receptors and Hyaluronan. *Nat Med* 11: 1173-1179.

41. **Park, J. S., Gamboni-Robertson, F., He, Q., et al.** 2006. High Mobility Group Box 1 Protein Interacts with Multiple Toll-Like Receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C917-924.

42. **Imai, Y., Kuba, K., Neely, G. G., et al.** 2008. Identification of Oxidative Stress and Toll-Like Receptor 4 Signaling as a Key Pathway of Acute Lung Injury. *Cell* 133: 235-249.

43. **Taylor, K. R., Trowbridge, J. M., Rudisill, J. A., Termeer, C. C., Simon, J. C., and Gallo, R. L.** 2004. Hyaluronan Fragments Stimulate Endothelial Recognition of Injury through Tlr4. *J Biol Chem* 279: 17079-17084.

44. **Termeer, C., Benedix, F., Sleeman, J., et al.** 2002. Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells Via Toll-Like Receptor 4. *J Exp Med* 195: 99-111.

45. **Miller, Y. I., Viriyakosol, S., Worrall, D. S., Boullier, A., Butler, S., and Witztum, J. L.** 2005. Toll-Like Receptor 4-Dependent and -Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1213-1219.

46. **Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., et al.** 1998. Defective Lps Signaling in C3h/Hej and C57bl/10sccr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282: 2085-2088.

47. **Malley, R., Henneke, P., Morse, S. C., et al.** 2003. Recognition of Pneumolysin by Toll-Like Receptor 4 Confers Resistance to Pneumococcal Infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1966-1971.

48. **Beutler, B. A.** 2009. Tlrs and Innate Immunity. *Blood* 113: 1399-1407.

49. **O'Neill, L. A.** 2008. 'Fine Tuning' Tlr Signaling. *Nat Immunol* 9: 459-461.

50. **Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., and Girardin, S. E.** 2006. Nod-Like Proteins in Immunity, Inflammation and Disease. *Nat Immunol* 7: 1250-1257.

51. **Chen, G., Shaw, M. H., Kim, Y. G., and Nunez, G.** 2009. Nod-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu Rev Pathol* 4: 365-398.

52. **McDermott, M. F., and Tschopp, J.** 2007. From Inflammasomes to Fevers, Crystals and Hypertension: How Basic Research Explains Inflammatory Diseases. *Trends Mol Med* 13: 381-388.

53. **Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., et al.** 2010. Nlrp3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals. *Nature* 464: 1357-1361.

54. **Kummer, J. A., Broekhuizen, R., Everett, H., et al.** 2007. Inflammasome Components Nalp 1 and 3 Show Distinct but Separate Expression Profiles in Human Tissues Suggesting a Site-Specific Role in the Inflammatory Response. *J Histochem Cytochem* 55: 443-452.

55. **Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., et al.** 2006. Bacterial Rna and Small Antiviral Compounds Activate Caspase-1 through Cryopyrin/Nalp3. *Nature* 440: 233-236.

56. **Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., et al.** 2006. Cryopyrin Activates the Inflammasome in Response to Toxins and Atp. *Nature* 440: 228-232.

57. **Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., and Tschopp, J.** 2004. Identification of Bacterial Muramyl Dipeptide as Activator of the Nalp3/Cryopyrin Inflammasome. *Curr Biol* 14: 1929-1934.

58. **Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., et al.** 2010. Listeria Monocytogenes-Infected Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Produce Il-1beta, Depending on Listeriolysin O and Nlrp3. *J Immunol* 184: 922-930.

59. **Muruve, D. A., Petrilli, V., Zaiss, A. K., et al.** 2008. The Inflammasome Recognizes Cytosolic Microbial and Host DNA and Triggers an Innate Immune Response. *Nature* 452: 103-107.

60. **Allen, I. C., Scull, M. A., Moore, C. B., et al.** 2009. The Nlrp3 Inflammasome Mediates in Vivo Innate Immunity to Influenza a Virus through Recognition of Viral Rna. *Immunity* 30: 556-565.

61. **Craven, R. R., Gao, X., Allen, I. C., et al.** 2009. Staphylococcus Aureus Alpha-Hemolysin Activates the Nlrp3-Inflammasome in Human and Mouse Monocytic Cells. *PLoS One* 4: e7446.

62. **Gross, O., Poeck, H., Bscheider, M., et al.** 2009. Syk Kinase Signalling Couples to the Nlrp3 Inflammasome for Anti-Fungal Host Defence. *Nature* 459: 433-436.

63. **Ichinohe, T., Lee, H. K., Ogura, Y., Flavell, R., and Iwasaki, A.** 2009. Inflammasome Recognition of Influenza Virus Is Essential for Adaptive Immune Responses. *J Exp Med* 206: 79-87.

64. **Munoz-Planillo, R., Franchi, L., Miller, L. S., and Nunez, G.** 2009. A Critical Role for Hemolysins and Bacterial Lipoproteins in Staphylococcus Aureus-Induced Activation of the Nlrp3 Inflammasome. *J Immunol* 183: 3942-3948.

65. **Thomas, P. G., Dash, P., Aldridge, J. R., Jr., et al.** 2009. The Intracellular Sensor Nlrp3 Mediates Key Innate and Healing Responses to Influenza a Virus Via the Regulation of Caspase-1. *Immunity* 30: 566-575.

66. **van de Veerdonk, F. L., Joosten, L. A., Devesa, I., et al.** 2009. Bypassing Pathogen-Induced Inflammasome Activation for the Regulation of Interleukin-1beta Production by the Fungal Pathogen Candida Albicans. *J Infect Dis* 199: 1087-1096.

67. **Sander, L. E., Davis, M. J., Boekschoten, M. V., et al.** 2011. Detection of Prokaryotic Mrna Signifies Microbial Viability and Promotes Immunity. *Nature* 474: 385-389.

68. **Babelova, A., Moreth, K., Tsalastra-Greul, W., et al.** 2009. Biglycan, a Danger Signal That Activates the Nlrp3 Inflammasome Via Toll-Like and P2x Receptors. *J Biol Chem* 284: 24035-24048.

69. **Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., et al.** 2009. Necrotic Cells Trigger a Sterile Inflammatory Response through the Nlrp3 Inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20388-20393.

70. **Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J.** 2006. Gout-Associated Uric Acid Crystals Activate the Nalp3 Inflammasome. *Nature* 440: 237-241.

71. **Yamasaki, K., Muto, J., Taylor, K. R., et al.** 2009. Nlrp3/Cryopyrin Is Necessary for Interleukin-1beta (Il-1beta) Release in Response to Hyaluronan, an Endogenous Trigger of Inflammation in Response to Injury. *J Biol Chem* 284: 12762-12771.

72. **Gasse, P., Mary, C., Guenon, I., et al.** 2007. Il-1r1/Myd88 Signaling and the Inflammasome Are Essential in Pulmonary Inflammation and Fibrosis in Mice. *J Clin Invest* 117: 3786-3799.

73. **Gasse, P., Riteau, N., Charron, S., et al.** 2009. Uric Acid Is a Danger Signal Activating Nalp3 Inflammasome in Lung Injury Inflammation and Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 903-913.

74. **Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S., and Flavell, R. A.** 2008. Crucial Role for the Nalp3 Inflammasome in the Immunostimulatory Properties of Aluminium Adjuvants. *Nature* 453: 1122-1126.

75. **Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B. T., and Tschopp, J.** 2008. Innate Immune Activation through Nalp3 Inflammasome Sensing of Asbestos and Silica. *Science* 320: 674-677.

76. **Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., et al.** 2008. Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the Nalp3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization. *Nat Immunol* 9: 847-856.

77. **Ting, J. P., Willingham, S. B., and Bergstralh, D. T.** 2008. Nlrs at the Intersection of Cell Death and Immunity. *Nat Rev Immunol* 8: 372-379.

78. **Brough, D., and Rothwell, N. J.** 2007. Caspase-1-Dependent Processing of Pro-Interleukin-1beta Is Cytosolic and Precedes Cell Death. *J Cell Sci* 120: 772-781.

79. **Cookson, B. T., and Brennan, M. A.** 2001. Pro-Inflammatory Programmed Cell Death. *Trends Microbiol* 9: 113-114.

80. **Gross, O., Thomas, C. J., Guarda, G., and Tschopp, J.** 2011. The Inflammasome: An Integrated View. *Immunol Rev* 243: 136-151.

81. **Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., and Tschopp, J.** 2011. A Role for Mitochondria in Nlrp3 Inflammasome Activation. *Nature* 469: 221-225.

82. **Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., et al.** 2011. Autophagy Proteins Regulate Innate Immune Responses by Inhibiting the Release of Mitochondrial DNA Mediated by the Nalp3 Inflammasome. *Nat Immunol* 12: 222-230.

83. **Bruey, J. M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., et al.** 2007. Bcl-2 and Bcl-Xl Regulate Proinflammatory Caspase-1 Activation by Interaction with Nalp1. *Cell* 129: 45-56.

84. **Shao, W., Yeretssian, G., Doiron, K., Hussain, S. N., and Saleh, M.** 2007. The Caspase-1 Digestome Identifies the Glycolysis Pathway as a Target During Infection and Septic Shock. *J Biol Chem* 282: 36321-36329.

85. **Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J., and van der Goot, F. G.** 2006. Caspase-1 Activation of Lipid Metabolic Pathways in Response to Bacterial Pore-Forming Toxins Promotes Cell Survival. *Cell* 126: 1135-1145.

86. **Zaki, M. H., Boyd, K. L., Vogel, P., Kastan, M. B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T. D.** 2010. The Nlrp3 Inflammasome Protects against Loss of Epithelial Integrity and Mortality During Experimental Colitis. *Immunity* 32: 379-391.

87. **Guarda, G., Dostert, C., Staehli, F., et al.** 2009. T Cells Dampen Innate Immune Responses through Inhibition of Nlrp1 and Nlrp3 Inflammasomes. *Nature* 460: 269-273.

88. **Quezada, S. A., Jarvinen, L. Z., Lind, E. F., and Noelle, R. J.** 2004. Cd40/Cd154 Interactions at the Interface of Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* 22: 307-328.

89. **de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E.** 1991. Interleukin 10(Il-10) Inhibits Cytokine Synthesis by Human Monocytes: An Autoregulatory Role of Il-10 Produced by Monocytes. *J Exp Med* 174: 1209-1220.

90. **Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M., and O'Garra, A.** 1991. Il-10 Inhibits Cytokine Production by Activated Macrophages. *J Immunol* 147: 3815-3822.

91. **Berg, D. J., Davidson, N., Kuhn, R., et al.** 1996. Enterocolitis and Colon Cancer in Interleukin-10-Deficient Mice Are Associated with Aberrant Cytokine Production and Cd4(+) Th1-Like Responses. *J Clin Invest* 98: 1010-1020.

92. **Pils, M. C., Pisano, F., Fasnacht, N., et al.** 2010. Monocytes/Macrophages and/or Neutrophils Are the Target of Il-10 in the Lps Endotoxemia Model. *Eur J Immunol* 40: 443-448.

93. **Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., et al.** 1999. Enhanced Th1 Activity and Development of Chronic Enterocolitis in Mice Devoid of Stat3 in Macrophages and Neutrophils. *Immunity* 10: 39-49.

94. **Radwan, M., Stiefvater, R., Grunert, T., et al.** 2010. Tyrosine Kinase 2 Controls Il-1ss Production at the Translational Level. *J Immunol* 185: 3544-3553.

95. **Guarda, G., Braun, M., Staehli, F., et al.** 2011. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity* 34: 213-223.

96. **Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., et al.** 2009. Cutting Edge: Nf-Kappab Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License Nlrp3

Inflammasome Activation by Regulating Nlrp3 Expression. *J Immunol* 183: 787-791.

97. **O'Connor, W., Jr., Harton, J. A., Zhu, X., Linhoff, M. W., and Ting, J. P.** 2003. Cutting Edge: Cias1/Cryopyrin/Pypaf1/Nalp3/Caterpiller 1.1 Is an Inducible Inflammatory Mediator with Nf-Kappa B Suppressive Properties. *J Immunol* 171: 6329-6333.

98. **Chen, C. J., Shi, Y., Hearn, A., et al.** 2006. Myd88-Dependent Il-1 Receptor Signaling Is Essential for Gouty Inflammation Stimulated by Monosodium Urate Crystals. *J Clin Invest* 116: 2262-2271.

99. **Eigenbrod, T., Park, J. H., Harder, J., Iwakura, Y., and Nunez, G.** 2008. Cutting Edge: Critical Role for Mesothelial Cells in Necrosis-Induced Inflammation through the Recognition of Il-1 Alpha Released from Dying Cells. *J Immunol* 181: 8194-8198.

100. **Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V., and Tschopp, J.** 2007. A Crucial Function of Sgt1 and Hsp90 in Inflammasome Activity Links Mammalian and Plant Innate Immune Responses. *Nat Immunol* 8: 497-503.

101. **Poyet, J. L., Srinivasula, S. M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S.** 2001. Identification of Ipaf, a Human Caspase-1-Activating Protein Related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276: 28309-28313.

102. **Cassel, S. L., Eisenbarth, S. C., Iyer, S. S., et al.** 2008. The Nalp3 Inflammasome Is Essential for the Development of Silicosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 9035-9040.

103. **Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L., Persechini, P. M., and Ojcius, D. M.** 2007. Atp Activates a Reactive Oxygen Species-Dependent Oxidative Stress Response and Secretion of Proinflammatory Cytokines in Macrophages. *J Biol Chem* 282: 2871-2879.

104. **Schroder, K., and Tschopp, J.** 2010. The Inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.

105. **Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A., and Simmons, R. M.** 2005. Dectin-1 Activates Syk Tyrosine Kinase in a Dynamic Subset of Macrophages for Reactive Oxygen Production. *Blood* 106: 2543-2550.

106. **Martinon, F., Mayor, A., and Tschopp, J.** 2009. The Inflammasomes: Guardians of the Body. *Annu Rev Immunol* 27: 229-265.

107. **Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., and Sheu, S. S.** 2004. Calcium, Atp, and Ros: A Mitochondrial Love-Hate Triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-833.

108. **West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., et al.** 2011. Tlr Signalling Augments Macrophage Bactericidal Activity through Mitochondrial Ros. *Nature* 472: 476-480.

109. **Kim, B. M., Schultz, L. W., and Raines, R. T.** 1999. Variants of Ribonuclease Inhibitor That Resist Oxidation. *Protein Sci* 8: 430-434.

110. **Petrilli, V., Papin, S., Dostert, C., Mayor, A., Martinon, F., and Tschopp, J.** 2007. Activation of the Nalp3 Inflammasome Is Triggered by Low Intracellular Potassium Concentration. *Cell Death Differ* 14: 1583-1589.

111. **Arlehamn, C. S., Petrilli, V., Gross, O., Tschopp, J., and Evans, T. J.** 2010. The Role of Potassium in Inflammasome Activation by Bacteria. *J Biol Chem* 285: 10508-10518.

112. **Perregaux, D., and Gabel, C. A.** 1994. Interleukin-1 Beta Maturation and Release in Response to Atp and Nigericin. Evidence That Potassium Depletion Mediated by These Agents Is a Necessary and Common Feature of Their Activity. *J Biol Chem* 269: 15195-15203.

113. **Cain, K., Langlais, C., Sun, X. M., Brown, D. G., and Cohen, G. M.** 2001. Physiological Concentrations of K+ Inhibit Cytochrome C-Dependent Formation of the Apoptosome. *J Biol Chem* 276: 41985-41990.

114. **Shimada, T., Park, B. G., Wolf, A. J., et al.** 2010. Staphylococcus Aureus Evades Lysozyme-Based Peptidoglycan Digestion That Links Phagocytosis, Inflammasome Activation, and Il-1beta Secretion. *Cell Host Microbe* 7: 38-49.

115. **Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., et al.** 2008. The Nalp3 Inflammasome Is Involved in the Innate Immune Response to Amyloid-Beta. *Nat Immunol* 9: 857-865.

116. **Hornung, V., and Latz, E.** 2010. Critical Functions of Priming and Lysosomal Damage for Nlrp3 Activation. *Eur J Immunol* 40: 620-623.

117. **Blander, J. M., and Sander, L. E.** 2012. Beyond Pattern Recognition: Five Immune Checkpoints for Scaling the Microbial Threat. *Nat Rev Immunol* 12: 215-225.

118. **von Bethmann, A. N., Brasch, F., Nusing, R., et al.** 1998. Hyperventilation Induces Release of Cytokines from Perfused Mouse Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 263-272.

119. **Witzenrath, M., Pache, F., Lorenz, D., et al.** 2011. The Nlrp3 Inflammasome Is Differentially Activated by Pneumolysin Variants and Contributes to Host Defense in Pneumococcal Pneumonia. *J Immunol* 187: 434-440.

120. **Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A. C., et al.** 2006. Role of Pneumolysin for the Development of Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia. *Crit Care Med* 34: 1947-1954.

121. **Fang, R., Tsuchiya, K., Kawamura, I., et al.** 2011. Critical Roles of Asc Inflammasomes in Caspase-1 Activation and Host Innate Resistance to Streptococcus Pneumoniae Infection. *J Immunol* 187: 4890-4899.

122. **Ceballos-Olvera, I., Sahoo, M., Miller, M. A., Del Barrio, L., and Re, F.** 2011. Inflammasome-Dependent Pyroptosis and Il-18 Protect against Burkholderia Pseudomallei Lung Infection While Il-1beta Is Deleterious. *PLoS Pathog* 7: e1002452.

123. **Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., et al.** 2007. Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy Via Ipaf and Asc in Shigella-Infected Macrophages. *PLoS Pathog* 3: e111.

124. **Case, C. L., Shin, S., and Roy, C. R.** 2009. Asc and Ipaf Inflammasomes Direct Distinct Pathways for Caspase-1 Activation in Response to Legionella Pneumophila. *Infect Immun* 77: 1981-1991.

125. **Willingham, S. B., Allen, I. C., Bergstralh, D. T., et al.** 2009. Nlrp3 (Nalp3, Cryopyrin) Facilitates in Vivo Caspase-1 Activation, Necrosis, and Hmgb1 Release Via Inflammasome-Dependent and -Independent Pathways. *J Immunol* 183: 2008-2015.

126. **Reuter, B. K., and Pizarro, T. T.** 2004. Commentary: The Role of the Il-18 System and Other Members of the Il-1r/Tlr Superfamily in Innate Mucosal Immunity and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease: Friend or Foe? *Eur J Immunol* 34: 2347-2355.

127. **McNeela, E. A., Burke, A., Neill, D. R., et al.** 2010. Pneumolysin Activates the Nlrp3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of Tlr4. *PLoS Pathog* 6: e1001191.

128. **Hirota, J. A., Hirota, S. A., Warner, S. M., et al.** 2012. The Airway Epithelium Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat Protein 3 Inflammasome Is Activated by Urban Particulate Matter. *J Allergy Clin Immunol* 129: 1116-1125 e1116.

129. **Netea, M. G., Nold-Petry, C. A., Nold, M. F., et al.** 2009. Differential Requirement for the Activation of the Inflammasome for Processing and Release of Il-1beta in Monocytes and Macrophages. *Blood* 113: 2324-2335.

130. **Conway Morris, A., Kefala, K., Wilkinson, T. S., et al.** 2010. Diagnostic Importance of Pulmonary Interleukin-1beta and Interleukin-8 in Ventilator-Associated Pneumonia. *Thorax* 65: 201-207.

131. **Huo, Z., Spencer, O., Miles, J., et al.** 2004. Antibody Response to Pneumolysin and to Pneumococcal Capsular Polysaccharide in Healthy Individuals and Streptococcus Pneumoniae Infected Patients. *Vaccine* 22: 1157-1161.

Erklärung

„Ich, Daniel Lorenz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Bedeutung des Nalp3-Inflammasoms im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum: Unterschrift:

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater PD Dr. Martin Witzenrath für die Möglichkeit, eine experimentelle Doktorarbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können und hierbei die Faszination und Möglichkeiten grundlagenwissenschaftlicher Forschung zu erleben und kennen zu lernen. Das entgegengebrachte Vertrauen, die wissenschaftliche Betreuung und nicht zuletzt Anregungen und produktive Kritik ermöglichten es mir diese Arbeit anzufertigen.

Ein weiterer Dank gilt meiner Mentorin Frau Dr. Stefanie Schönrock, die mir mit Geduld und wissenschaftlichem Sachverstand praktische und theoretische Grundlagen der Methodik vermittelte.

Mein weiterer Dank für die produktive Zusammenarbeit gilt Professor Dr. Bastian Opitz.

Für ihren wertvollen Rat und ihre immerwährende Unterstützung bei Herausforderungen und Problemen danke ich Frau Dr. Birgitt Gutbier.

Ein besonderer Dank für eine tolle Zusammenarbeit und eine großartige Zeit geht an das gesamte Team der AG Witzenrath, insbesondere Dr. Katrin Reppe, Katharina Hellwig, Anne-Kathrin Neuhauß, Katja Fischer, Carla Rosa González Calera, Dr. Holger Müller-Redetzky, Daniel Will, Christoph Tabeling, Jan Doehn und viele mehr.

Weiterhin möchte ich meiner Schwester Ulrike Lorenz und Vincent Exner für lektorische Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

Ein großer Dank an alle meine Freunde und Verwandte für Geduld, Verständnis und den mehr oder minder großen Teil, den jeder zur vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Aus ganzem Herzen danke ich Abi Lane, die mit viel Geduld, Verständnis, moralischer Unterstützung und Liebe mir die Motivation gab, diese Arbeit abzuschließen.

Abschließend danke ich meinen lieben Eltern, deren fortwährende Unterstützung mir dies alles ermöglicht hat und deren Zuspruch und Vorbild mir stets geholfen hat, diese große Herausforderung produktiv anzugehen.

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

Publikationen

1. **Witzenrath, 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., and Opitz, B.**. 2011. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 187: 434-440.
   *contributed equally