

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Charité Berlin

Eingereicht über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Nicht-TLR-abhängige Mechanismen der angeborenen Immunantwort
auf *Legionella pneumophila* in humanen Wirtszellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Maya Vinzing
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3197

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter: PD Dr. Stefan Hippenstiel
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

natural immunity, Legionella pneumophila, immune response, man, cell culture, interferon, Interferon-beta (MeSH), signal transduction, flagella, polymerase chain reaction, western blotting, replication

Tag der Promotion: 13.06.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN-13: 978-3-86664-419-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008
D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

1 Inhalt

1	Inhalt	I
1.1	Abbildungsverzeichnis	V
1.2	Tabellenverzeichnis	VI
1.3	Abkürzungsverzeichnis	VIII
2	Einleitung	1
2.1	Zielsetzung	1
2.2	Fragestellungen	2
3	Schrifttum	3
3.1	Immunsystem.....	3
3.1.1	Angeborenes Immunsystem	3
3.1.2	Erworbenes Immunsystem.....	4
3.1.3	Mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs).....	4
3.1.3.1	Toll-like Rezeptoren (TLR).....	5
3.1.3.2	Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-like Rezeptoren (NLRs)	6
3.1.3.2.1	Nods.....	6
3.1.3.2.2	NLR-Moleküle Ipaf und Naip.....	7
3.1.3.2.3	Nalps	8
3.1.3.3	Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like Helikasen (RLHs)	9
3.1.3.4	Interferon-induzierender zytosolischer PRR.....	10
3.1.3.5	andere	11
3.1.4	Signaltransduktion	12
3.1.4.1	NLR-Signalweg.....	12
3.1.4.1.1	Signalwege der Nods.....	12
3.1.4.1.2	Signalwege von mIpaf und mNaip5	13
3.1.4.1.3	Signalwege der Nalps.....	14
3.1.4.2	RLH-Signalweg.....	15
3.1.4.3	Nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)	17
3.1.4.4	Interferon-regulatory factor (IRF)	17
3.1.5	Zytokine.....	18
3.1.5.1	Typ I Interferone	19
3.1.5.2	Interleukin-1 β (IL-1 β).....	21
3.1.6	Resistenz.....	21
3.2	<i>Legionella pneumophila</i>	23
3.2.1	Legionellose	24

3.2.2	Lebenszyklus	24
3.2.3	Virulenzfaktoren.....	26
4	Material und Methoden.....	27
4.1	Material.....	27
4.1.1	Verwendete Zelllinien.....	27
4.1.1.1	Alveolar Typ II Epithelzelllinie (A549).....	27
4.1.1.2	Humane Monozytenzelllinie (THP-1).....	27
4.1.1.3	Primäre Makrophagen	27
4.1.2	Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen.....	27
4.1.3	Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten	28
4.1.4	Bakterien	29
4.1.4.1	<i>Legionella pneumophila</i> Stämme 130b, JR32, JR32 $\Delta dotA$, Corby und Corby $\Delta flaA$	29
4.1.4.2	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	29
4.1.5	Medien für die Bakterienkultur	29
4.1.6	Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien.....	30
4.1.7	Stimulantien und Enzyme	30
4.1.8	Puffer, Lösungen und Gele	30
4.1.9	Primer, small interfering RNAs (siRNAs) und Plasmide	33
4.1.10	Primäre und sekundäre Antikörper Western blot , ChIP und	
	Konfokalmikroskopie.....	36
4.1.11	Geräte	37
4.1.12	Verbrauchsmaterialien	38
4.2	Methoden.....	39
4.2.1	Zellbiologische Methoden	39
4.2.1.1	Kultivierung und Subkultivierung der A549 Zellen.....	39
4.2.1.2	Kultivierung und Subkultivierung der THP-1 Zellen	39
4.2.1.3	Generierung und Kultivierung primäre Makrophagen.....	40
4.2.1.4	Bestimmung der Zellzahlen.....	40
4.2.1.5	Kryokonservierung	40
4.2.1.6	Auftauen von Zellen.....	41
4.2.1.7	Transiente Transfektion von „small interfering“ RNA (siRNA) und Plasmid-DNA in..... eukaryotischen Zellen	41
4.2.2	Mikrobiologische Methoden	41
4.2.2.1	Bakterienkultur.....	41
4.2.2.2	Lagerung und Anzucht von <i>L. pneumophila</i>	42
4.2.2.3	Infektion der Zellen mit <i>L. pneumophila</i>	42

4.2.2.4 Vermehrungsversuche mit <i>L. pneumophila</i>	42
4.2.2.5 Transformation und Vermehrung <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	43
4.2.3 Molekularbiologische Methoden	44
4.2.3.1 Methoden zum Nachweis von mRNA	44
4.2.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA	46
4.2.3.3 Umklonierung	46
4.2.4 Biochemische Methoden	47
4.2.4.1 Methode zum Nachweis von Proteinen	47
4.2.4.2 Methode zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen	49
4.2.5 Konfokalmikroskopie	50
4.2.6 Statistik	50
5 Ergebnisse	51
5.1 Die <i>Legionella pneumophila</i> -induzierte IFN β -Produktion über IPS-1 und IRF3 in humanen Lungenepithelzellen beeinflusst die bakterielle Replikation	51
5.1.1 <i>Legionella pneumophila</i> induziert die IFN β -Produktion in humanen Lungenepithelzellen <i>in vitro</i>	51
5.1.2 <i>Legionella pneumophila</i> induziert die IRF3-Aktivierung in humanen Lungenepithelzellen	52
5.1.3 Die <i>L. pneumophila</i> -induzierte IFN β -Expression ist IRF3-abhängig	54
5.1.4 Die <i>L. pneumophila</i> -induzierte IFN β -Expression ist IPS-1-abhängig	55
5.1.5 Die <i>L. pneumophila</i> -induzierte IFN β -Expression ist RIG-I-, MDA5-, ASC-, Nod5-, Nod27-, PIDD- und Naip-unabhängig	57
5.1.6 IFN β reguliert negativ die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen	59
5.1.7 IRF3 und IPS-1 regulieren negativ die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen	60
5.2 Humanes Naip und Ipaf sind beteiligt an der Erkennung und der Kontrolle der <i>Legionella pneumophila</i> -Infektion in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen	63
5.2.1 Die <i>L. pneumophila</i> Flagellin-Mutante vermehrt sich in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen besser als der Wildtypstamm	63
5.2.2 Humanes Naip wird in Lungenepithelzellen und Makrophagen, humanes Ipaf nur in Makrophagen exprimiert	66
5.2.3 Das Ausschalten von humanem Naip führt zur verstärkten Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen	67

5.2.4	Überexpression von humanem Naip reduziert die Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen	72
5.2.5	Der „knock-down“ von humanem Ipaf führt zur verstärkten Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Makrophagen	74
5.2.6	Überexpression von humanem Ipaf reduziert die Replikation von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen	77
5.2.7	Humanes Naip und Ipaf regulieren negativ die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in primären humanen Makrophagen	79
5.2.8	Humanes Naip und Ipaf haben keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung nach Legionelleninfektion von humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen	81
6	Diskussion	83
6.1	Diskussion der Ergebnisse	83
6.1.1	Bei der Restriktion der Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> beteiligte aktivierende mikrobielle Moleküle (MAMPs)	83
6.1.1.1	MAMPs in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion	83
6.1.1.2	MAMPs der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion	84
6.1.2	Bei der Kontrolle der Legionellenreplikation beteiligte mustererkennende Rezeptoren (PRRs)	85
6.1.2.1	PRRs in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion	85
6.1.2.2	PRRs in der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion	87
6.1.3	An die Erkennung der MAMPs durch PRRs anschließende Signalkaskaden, die zur Restriktion der Replikation von <i>Legionella</i> führen	89
6.1.3.1	Signalmoleküle in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion	89
6.1.3.2	Signalmoleküle in der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion	91
6.1.4	Mechanismen der Resistenzvermittlung nach einer Infektion humaner Zellen mit <i>L. pneumophila</i>	93
6.1.4.1	Mechanismen der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion	93
6.1.4.2	Mechanismen der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion	96
6.2	Diskussion der eingesetzten Materialien und Methoden	99
6.2.1	Auswahl der Zelllinien	99
6.2.2	Auswahl der Legionellenstämme	100
6.2.3	Zytotoxizitäts-Detektions-Assay	100
6.2.4	RNAi- („RNA interference“) Experimente	101
6.3	Ausblick	103

7	Zusammenfassung / Summary	106
7.1	Zusammenfassung	106
7.2	Summary	108
8	Referenzen	110
9	Anhang	126
9.1	Publikationen und Kongressbeiträge.....	126
9.1.1	Originalarbeiten	126
9.1.2	Kongressbeiträge.....	126
9.2	Danksagung.....	127
9.3	Selbstständigkeitserklärung	128

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.2-1: Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	2
Abbildung 3.1-1: Humane NLR- und RLH-Proteine und ihre Aktivatoren	10
Abbildung 3.1-2: Signalweg der NLR-Moleküle Nod1 und Nod2.....	13
Abbildung 3.1-3: Signalwege der NLR-Moleküle Nalp1, Nalp2/3 und mlpaf.....	15
Abbildung 3.1-4: RLH-Signalweg und Aktivierung von IRF3 und IRF7.....	16
Abbildung 3.1-5: JAK-STAT-Typ I IFN-Signalweg	20
Abbildung 3.2-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Legionella pneumophila</i>	23
Abbildung 3.2-2: Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i> in humanen Makrophagen	25
Abbildung 5.1-1 A – D: Dosisabhängige IFN β -Produktion von <i>L. pneumophila</i> -infizierten humanen Lungenepithelzellen.....	52
Abbildung 5.1-2 A – B: <i>L. pneumophila</i> induziert eine IRF3- und p65-Kerntranslokation und <i>ifnβ</i> -Promotorbindung in humanen Lungenepithelzellen.	54
Abbildung 5.1-3: Untersuchung der Rolle von IRF3 bei der <i>L. pneumophila</i> -induzierten IFN β -Expression.	55
Abbildung 5.1-4: Untersuchung der Rolle von IPS-1 bei der <i>L. pneumophila</i> -induzierten IFN β -Expression.	56
Abbildung 5.1-5 A - G: Untersuchung der Rolle von RIG-I (A), MDA5 (B), ASC (C), Nod5 (D), Nod27 (E), PIDD (F) und Naip (G) bei der <i>L. pneumophila</i> -induzierten IFN β -Expression.	58
Abbildung 5.1-6 A, B: Einfluss von rIFN β auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen.....	60
Abbildung 5.1-7 A, B: Einfluss von IRF3 und IPS-1 auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen.....	62

Abbildung 5.2-1 A – D: Vergleich der Vermehrung von <i>L.p. Corby</i> , <i>L.p. Corby</i> Δ <i>flaA</i> , <i>L.p. JR32</i> und <i>L.p. JR32</i> Δ <i>dotA</i> in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.	64
Abbildung 5.2-2.1: Ausschnitt von einem Aminosäurevergleich zwischen mNaip5 und humanem Naip.....	66
Abbildung 5.2-2.2 A, B: Expression von Naip und Ipaf in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.	67
Abbildung 5.2-3 A und B: Einfluss der Expressionshemmung von Naip auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.....	69
Abbildung 5.2-4: Einfluss der Überexpression von hNaip auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen.....	73
Abbildung 5.2-5 A: Einfluss der Expressionshemmung von Ipaf auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Makrophagen.....	75
Abbildung 5.2-6: Einfluss der Überexpression von Ipaf auf die Vermehrung von <i>L. pneumophila</i> in humanen Lungenepithelzellen.....	78
Abbildung 5.2-7 A und B: Humanes Naip und Ipaf kontrollieren die intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i> in primären humanen Makrophagen	80
Abbildung 5.2-8 A und B: Einfluss von Naip und Ipaf auf die LDH-Freisetzung in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.	82
Abbildung 6.1-1 Signalweg der IFN β -Expression nach Legionelleninfektion humaner Lungenepithelzellen.	91
Abbildung 7.1-1: Zusammenfassung der in der Arbeit untersuchten angeborenen Abwehrmechanismen gegen eine <i>L. pneumophila</i> -Infektion in humanen Zellen.....	107
Figure 7.2-1: Summary of the examined innate defence mechanisms against <i>L. pneumophila</i> in human cells.	109

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Kulturmedien und Kryomedium für A549 Zellen.....	28
Tabelle 4-2: Kulturmedien, Kryomedium und Adhäsionsflüssigkeit für THP-1 Zellen.....	28
Tabelle 4-3: Kulturmedien für primäre Makrophagen.....	28
Tabelle 4-4: Medien für die Bakterienkultur	29
Tabelle 4-5: Materialien für das Arbeiten mit Bakterien.....	30
Tabelle 4-6: Stimuli.....	30
Tabelle 4-7: Enzyme	30
Tabelle 4-8: PCR-Puffer	30
Tabelle 4-9: ChIP-Puffer.....	31
Tabelle 4-10: PCR-Gel	31
Tabelle 4-11: Western blot-Puffer.....	32

Tabelle 4-12: Western blot-Gele	33
Tabelle 4-13: PCR-Primer-Sequenzen und Hybridisierungstemperatur für semiquantitative PCR	33
Tabelle 4-14: PCR-Primer/Sequenzen und Hybridisierungstemperatur für quantitative PCR	34
Tabelle 4-15: Sonstige Primer	34
Tabelle 4-16: siRNA-Sequenzen	34
Tabelle 4-17: Plasmide	35
Tabelle 4-18: Primäre Western blot –Antikörper und ChIP-Antikörper	36
Tabelle 4-19: Sekundäre Western blot-Antikörper	36
Tabelle 4-20: Primäre Antikörper für Konfokalmikroskopie	36
Tabelle 4-21: Sekundäre Antikörper für Konfokalmikroskopie.....	36
Tabelle 4-22: Speziell verwendete Geräte	37
Tabelle 4-23: Speziell verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen	38

1.3 Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (usw., bzw., etc.) sowie SI- (Système International d'unités) Einheiten und deren Präfixe.

A549	Typ II Alveolarepithelzellen
Abb.	Abbildung
A. bidest.	doppelt destilliertes Wasser
A. tridest.	dreifach destilliertes Wasser
ADAR	„adenosine deaminase acting on RNA“
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	„apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“
ATP	Adenosintriphosphat
BCYE	„buffered charcoal-yeast extract“
BIR	„baculovirus inhibitor of apoptosis repeat“
Birc	„baculoviral IAP repeat-containing“
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	„caspase-recruitment domain“
Cardif	„CARD adaptor inducing IFN β “
CBP	„CREB-binding protein“
CFU	„colony forming units“
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CLR	„C-type lectin receptor“
COX	„cyclooxygenase“
CREB	„cyclic-AMP-responsive-element-binding protein“
DAI	„DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors“
DAMP	„danger-associated molecular pattern“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleinacid“
dNTP	Desoxyribonukleotide
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	„Ethylendiamintetraacid“
ELISA	„enzyme-linked immuno sorbent assay“;
ERK	„extracellular regulated-signal kinase“
FADD	„Fas-associated death domain“
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	„fetal calve serum“
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Verzeichnisse

GAS	„gamma IFN-activated site“
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hsp60	„60 kDa heat shock protein“
IAP	„inhibitor of apoptosis protein“
ICE	„Interleukin-1 β converting enzyme“
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IFNAR	„IFN α / β receptor“
I κ B	„inhibitory- κ B“
IKK	„inhibitory- κ B kinase“
IKK i	„inducible I κ B kinase“
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
NO	„nitric oxide“
iNOS	„inducible nitric oxide synthase“
Ipa f	„ICE-protease activating factor“
IPS-1	„IFN β promotor stimulator 1“
IRAK	„interleukin 1 receptor-associated kinase“
IRF	„interferon-regulatory factor“
IRF-E	„IRF-Element“
IRG	„immunity-related GTPase“
ISG	„IFN-stimulated gene“
ISRE	„IFN-stimulated response element“
JAK	Janus Kinase
JNK	„c-Jun NH ₂ -terminal kinase“
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LCP	„ <i>Legionella</i> -containing phagosome“
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	„leucine rich repeat“
MAMP	„microbe-associated molecular pattern“
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAVS	„mitochondrial antiviral signaling“
MDA5	„melanoma differentiation-associated gene 5“
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

Verzeichnisse

Mip	„macrophage infectivity potentiator“
M-MLV	„moloney murine leukaemia virus“
MOI	„multiplicity of infection“
MOMP	„major outer membrane protein“
Mrp	„myeloid-related protein“
mRNA	„messenger RNA“
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
NaCl	Natriumchlorid
Naip	„neuronal apoptosis inhibitory protein“
Nalp	„NOD-, LRR- and PYD-domain containing protein“
NF- κ B	Nukleärer Transkriptionsfaktor- κ B
NLR	„Nod-like receptor“
NO	„nitric oxide“
NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain“
OD	optische Dichte
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells“
PBS	„phosphat buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIDD	„p53-induced protein with a death domain“
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PoI II	RNA Polymerase II
PRR	„pattern recognition receptor“
PYD	„pyrin domain“
RAIDD	„Rip-associated ICH/ECD3-homologous protein with a death domain“
RIG-I	„retinoic acid inducible gene-I“
Rip	„receptor interacting protein“
RISC	„RNA-induced silencing complex“
RLH	„RIG-I-like helicase“
RLT	PCR-Lysepuffer
RNA	„ribonucleinacid“
RNAi	„RNA interference“
ROS	„reactive oxygen species“
RT	Reverse Transkriptase

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
si	„small interfering“
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
TAB	„TAK1-binding protein“
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK	„transforming growth factor β activating kinase“
TANK	„TRAF family member-associated NF- κ B activator“
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBK	„TANK-binding kinase 1“
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N', N'-Tetramethyl-ethylethyldiamin
THP-1	humane Monozyten
THY	„Todd Hewitt Yeast“
TIR	Toll-/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	„tumor necrosis factor receptor-associated factor“
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TYK	Tyrosinkinase
UV	Ultraviolett
VISA	„virus-induced signalling adaptor“
ZBP1	„Z-DNA binding protein 1“

2 Einleitung

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) ist ein wichtiger Erreger schwerer ambulant und nosokomial erworbener Pneumonien im Menschen. Eindringende Pathogene, wie z.B. *L. pneumophila*, werden in erster Instanz durch das wirtseigene angeborene Immunsystem bekämpft. Dieses erkennt Mikroorganismen mittels sogenannter mustererkennender Rezeptoren, wie z.B. den Toll-like Rezeptoren, und initiiert nachfolgende Abwehrmechanismen. In den letzten Jahren wurden zusätzlich zu den Toll-like Rezeptoren weitere Rezeptor-Familien und angeborene Abwehrsysteme identifiziert. So deuten genetische Studien in verschiedenen Mausstämmen an, dass verschiedene Allele des Nod-like Rezeptor mNaip5/Birc1e-Gens entscheidend die Resistenz oder Empfänglichkeit von Mausmakrophagen – sowie davon abhängig von Mäusen *in vivo* - gegenüber der *L. pneumophila*-Infektion beeinflussen. Darüber hinaus zeigen aktuelle Studien eine entscheidende Bedeutung von Typ I Interferonen in bakteriellen Infektionen. Die Rolle der Typ I Interferone sowie der humanen Orthologe zu mNaip5 und mlpaf in der humanen Legionelleninfektion ist bisher nicht untersucht.

2.1 Zielsetzung

Während in den meisten Mausstämmen leistungsfähige angeborene Abwehrmechanismen eine Resistenz gegenüber *L. pneumophila*-Infektionen vermitteln, können Menschen schwere Pneumonien nach einer Legionelleninfektion entwickeln. Ziel dieser Arbeit war es, die in der Maus kritischen, Toll-like Rezeptor-unabhängigen, Mechanismen der angeborenen Immunantwort auf *L. pneumophila* in humanen Wirtszellen zu untersuchen. Hierbei sollte zum Einen die Bedeutung von Typ I Interferonen und zum Anderen die Rolle der humanen Homologe zu mNaip5 und mlpaf in der *L. pneumophila*-Infektion von humanen pulmonalen Epithelzellen und humanen Makrophagen untersucht werden.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse könnten entscheidend zum Verständnis molekularer Mechanismen in der Legionellenpneumonie beitragen und als rationale Grundlage zur Entwicklung neuer Interventionsstrategien dienen.

3 Schrifttum

3.1 Immunsystem

Das Immunsystem stellt das Abwehrsystem von Lebewesen gegen verschiedene Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten, dar. Es bezeichnet das Zusammenspiel eines komplexen Netzwerkes, an dem mehrere Organe, Zelltypen und chemische Moleküle beteiligt sind. Bei Vertebraten unterscheidet man die angeborene Immunität und die vom angeborenen Immunsystem abhängige erworbene Immunität (Medzhitov and Janeway, Jr., 1997). Wesentliche Unterschiede beider Systeme liegen in den Mechanismen und Rezeptoren der Pathogenerkennung.

3.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das phylogenetisch sehr alte angeborene Immunsystem spielt als erster Abwehrmechanismus des Wirtes eine Schlüsselrolle in der Bekämpfung eindringender Pathogene. Zwei Hauptmerkmale unterscheidet es deutlich vom erworbenen Immunsystem: (I) es wird durch hoch konservierte, mikrobielle Moleküle („microbe-associated molecular patterns“, MAMPs) aktiviert und (II) die Erkennung dieser Moleküle erfolgt durch eine limitierte Anzahl keimbahnkodierter mustererkennender Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs) (Akira et al., 2006; Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002).

Charakteristisch für MAMPs ist, dass sie von den Mikroorganismen selbst gebildet werden, nicht jedoch vom Wirt bzw. von Wirtszellen normaler Weise nicht freigesetzt werden. Zudem sind sie meist essentiell für die Pathogenität oder das Überleben des Mikroorganismus und kommen in einer Vielzahl von Mikroben vor (Hoffmann et al., 1999; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Beispiele dieser Strukturen sind Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Flagellin, Lipoteichonsäuren, Mannane, Glykane, mikrobielle DNA und doppelsträngige RNA (dsRNA) (Aderem and Ulevitch, 2000; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Da diese Moleküle auch von nicht-pathogenen Mikroben synthetisiert werden ist der häufig benutzte Ausdruck PAMPs („pathogen-associated molecular patterns“) streng genommen nicht präzise (Ausubel, 2005). Neben den MAMPs werden vom angeborenen Immunsystem auch endogene Strukturen erkannt, die von aktivierten oder zerstörten Zellen in Stresssituationen freigesetzt werden („danger-associated molecular patterns“, DAMPs oder Alarmine) (Oppenheim and Yang, 2005).

Die PRRs werden konstitutiv von einer Vielzahl von Wirtszellen exprimiert und besitzen eine einheitliche Spezifität, so dass Pathogene gleichzeitig von einer großen Anzahl von Zellen erkannt werden können (Akira et al., 2006; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Die hervorgerufene Antwort erfolgt sofort und resultiert in einem weiten Spektrum von Abwehrmechanismen: Dazu gehören u.a. die Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden,

Zytokinen, Chemokinen und Prostanoiden und die Rekrutierung von Entzündungszellen sowie die zum Teil noch schlecht verstandenen angeborenen intrazellulären Resistenzmechanismen (Fritz et al., 2006; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000; Radtke and O'Riordan, 2006).

3.1.2 Erworbenes Immunsystem

Die erworbene oder auch adaptive Immunabwehr entwickelte sich im Laufe der Phylogenese der Wirbeltiere aus der angeborenen Immunabwehr. Im Vergleich zur angeborenen Immunantwort erfolgt die erworbene Immunantwort verzögert, ist dafür aber langanhaltender. Sie zeichnet sich durch die Erkennung einer Vielzahl von unterschiedlichen Antigenen aus, da sie in der Lage ist, durch ein somatisches Rearrangement der Antigenrezeptorgene Rezeptoren für nahezu jedes Antigen zu bilden (Clark and Kupper, 2005). Bei der erworbenen Immunabwehr wird zwischen einer humoralen (B-Zellen) und einer zellvermittelten Antwort (T-Zellen) unterschieden. Die Entwicklung vom antigen-spezifischen Schutz umfasst die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen, die für die Beseitigung von extrazellulären Mikroorganismen verantwortlich sind, sowie die zellvermittelte Immunität der T-Zellen, die verschiedene Zytokine produzieren oder Zytolyse auslösen, um infizierte Zellen zu eliminieren (Azuma, 2006; Tosi, 2005).

3.1.3 Mustererkennende Rezeptoren („pattern recognition receptors“, PRRs)

Die mustererkennenden Rezeptoren des angeborene Immunsystem („pattern recognition receptors“, PRRs) sind in drei verschiedenen Kompartimenten zu finden: (I) in den Körperflüssigkeiten, (II) in den Zellmembranen und (III) im Zytoplasma.

Die PRRs in den Körperflüssigkeiten spielen eine große Rolle bei der Opsonierung von MAMPs, der Aktivierung des Komplementsystems und in einigen Fällen vermitteln sie den Transfer der MAMPs zu anderen PRRs (Garlanda et al., 2005; Gasque, 2004; Medzhitov and Janeway, Jr., 2000). Die Zellmembran-lokaliserten Rezeptoren haben diverse Funktionen, wie die Präsentation von MAMPs für andere PRRs, die Förderung der Aufnahme von Mikroben durch Phagozytose sowie die Initiierung von Signalkaskaden (Beutler et al., 2006). Zytoplasmatische PRRs können in die NOD- („nucleotide-binding oligomerization domain“) like Rezeptoren (NLRs) und Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like Helikasen (RLHs) (auch CARD- („caspase-recruiting domain“) Helikasen genannt) unterteilt werden. Die RLHs, wie RIG-I („retinoic acid inducible gene-I“) und MDA5 („melanoma differentiation-associated gene 5“), sind an der antiviralen Abwehr beteiligt. Im Gegensatz dazu scheinen die NLRs hauptsächlich in die antibakterielle Immunantwort involviert zu sein (Lee and Kim, 2007). Verschiedene PRRs unterscheiden sich hinsichtlich

ihrer stromabwärts gelegenen Signalkaskaden, die die Genexpression (transkriptional oder posttranslational) von inflammatorischen Genen, Interferonen und antimikrobiellen Molekülen regulieren. Zusätzlich regulieren einige PRRs den programmierten Zelltod und vermitteln angeborene Resistenzmechanismen gegen intrazelluläre Mikroben z.B. über die Regulation der phagolysosomalen Maturation und/oder Autophagy (Akira et al., 2006; Fritz et al., 2006; Meylan et al., 2006; Radtke and O’Riordan, 2006). Im Folgenden soll auf einige wesentliche Zellmembran-assoziierte und zytosolische PRRs eingegangen werden.

3.1.3.1 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die transmembranären TLRs stellen die wohl am besten untersuchten PRRs dar. Sie sind evolutionär konserviert vom Wurm bis zu den Säugetieren (Akira and Takeda, 2004; Beutler, 2004; Hoffmann, 2003; Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Das „Gründungsmitglied“ der TLR-Familie, Toll, wurde initial entdeckt als essentielles Genprodukt für die Entwicklung der embryonalen dorsoventralen Polarisation in *Drosophila melanogaster* (Anderson et al., 1985). Später wurde die Bedeutung von Toll für die Immunantwort der Fruchtfliegen auf Pilzinfektionen gezeigt (Lemaitre et al., 1996). Bis heute wurden 13 Toll-Homologe in Säugetieren identifiziert, von denen TLR1-10 im Menschen zu finden sind (Akira et al., 2006; Beutler et al., 2006). TLRs sind Typ I Integral-Membran-Proteine und charakterisiert durch eine LRR- („leucine rich repeat“) Domäne zur Ligandenbindung und eine TIR- („Toll/IL-1 receptor homology“) Domäne für die Signaltransduktion (Akira et al., 2006). Als Homo- oder Heterodimere oder zusammen mit anderen Korezeptoren erkennen sie verschiedene mikrobielle Komponenten, wie z.B. Zellwandbestandteile (LPS und Lipopeptide), Flagellin und Nukleinsäuren (dsRNA, ssRNA und CpG-DNA) (Akira et al., 2006; Beutler et al., 2006). Einige TLRs scheinen außerdem endogene Liganden zu erkennen. So wurde z.B. die Detektion der endogenen Phagozytenproteine Mrp („myeloid-related protein“) 8 und Mrp14 durch TLR4 sowie von Wirtschromatinkomplexen durch TLR9 gezeigt (Rifkin et al., 2005; Vogl et al., 2007). TLR1, 2, 4, 5 und 6 sind hauptsächlich auf der Zelloberfläche lokalisiert und erkennen vorrangig bakterielle Komponenten, wohingegen TLR3, 7, 8 und 9 in endosomalen Membranen zu finden sind und zum Großteil virale Nukleinsäuren, aber auch bakterielle CpG-DNA, erkennen (Akira et al., 2006; Beutler et al., 2006). Die Funktion des ebenfalls auf der Zellmembran lokalisierten TLR10 ist bisher nicht bekannt.

Rezeptoren der TLR-Familie aktivieren u.a. eine NF- κ B- („nuclear transcription factor- κ B“) und z.T. IRF- („interferon-regulatory factor“) abhängige Genexpression inflammatorischer Zytokine (Akira and Takeda, 2004).

3.1.3.2 Nukleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD)-like Rezeptoren (NLRs)

Obwohl den TLRs eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort zukommt, zeigten verschiedene Beobachtungen, dass die Wirtsantwort auf unterschiedliche Pathogene nicht ausschließlich durch TLRs vermittelt wird. Erste Hinweise auf die Existenz einer intrazellulären Bakterienerkennung brachten Untersuchungen, die zeigten, dass nur invasive *Shigella flexneri* eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und anschließende IL-8 Sekretion in Wirtszellen hervorrufen (Philpott et al., 2000). Darauf folgende Studien zeigten, dass das NLR-Molekül Nod1 die NF- κ B-abhängige Wirtszellantwort in der Shigelleninfektion vermittelt (Girardin et al., 2001). Anschließend wurden weitere Mitglieder der NLR-Familie mit der Erkennung von bakteriellen Komponenten und Toxinen sowie von endogenen Molekülen in Zusammenhang gebracht, so dass die NLRs als zytoplasmatisches Gegenstück der TLRs angesehen werden können (Fritz et al., 2006).

Mehr als 20 Mitglieder der NLR-Familie (auch Nod-LRR oder CATERPILLAR Proteine genannt) sind in Säugetieren identifiziert worden. Proteine dieser Familie sind gekennzeichnet durch eine carboxylterminale ligandenerkennende LRR-Domäne, eine zentrale NOD-Domäne und aminotermine CARD-, PYD- („pyrin domain“) oder BIR- („baculovirus inhibitor of apoptosis repeat“) Domänen für die Initiierung der Signaltransduktion (Inohara et al., 2005; Martinon and Tschopp, 2005). Die NLRs können auf Grund ihrer unterschiedlichen aminoterminalen Effektor-Domänen unterteilt werden in: (I) Nods, (II) Ipaf („ICE („Interleukin-1 β converting enzyme“) protease activating factor“; auch CARD12 genannt), (III) Naip („neuronal apoptosis inhibitory protein“; auch Birc „baculoviral IAP („inhibitor of apoptosis protein“) repeat-containing“ genannt) und (IV) Nalps (NOD-, LRR- and PYD-domain containing protein“). Während Nods und Ipaf CARD exprimieren, enthält Naip drei BIR-Domänen. Die Nalp-Untergruppe exprimiert PYD-Domänen (Martinon and Tschopp, 2005). Obwohl die Liganden und Funktionen vieler dieser Moleküle nicht bekannt sind, scheint eine ihrer Hauptaufgaben darin zu liegen, MAMPs und/oder DAMPs im Zytoplasma der Wirtszelle (direkt oder indirekt) zu detektieren und eine inflammatorische Wirtszellantwort auszulösen oder intrazelluläre Resistenz zu steuern (Akira et al., 2006; Fritz et al., 2006; Meylan et al., 2006; Radtke and O’Riordan, 2006).

3.1.3.2.1 Nods

Zu den bestuntersuchten NLRs gehören Nod1 (CARD4) und Nod2 (CARD15), die als zytoplasmatische PRRs bakterielle Peptidoglykane erkennen. Dabei detektiert Nod1 Peptidoglykane, die *meso*-Diaminopimelinsäure enthalten. Diese sind hauptsächlich, wenn auch nicht ausschließlich, in Gram-negativen Bakterien zu finden (Chamaillard et al., 2003;

Girardin et al., 2003a). Nod2 hingegen erkennt das Muramyldipeptid MurNAc-L-Ala-D-isoGln, welches in allen Peptidoglykanen konserviert ist (Girardin et al., 2003b; Inohara et al., 2003). Sowohl Nod1 als auch Nod2 vermitteln über die Aktivierung von NF- κ B und MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden und Chemokinen.

3.1.3.2.2 NLR-Moleküle Ipaf und Naip

Ein weiteres wichtiges NLR-Molekül ist Ipaf (CARD12 oder CLAN). Ipaf wurde bisher v.a. im Zusammenhang mit Legionellen- und Salmonelleninfektionen von Mausmakrophagen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass mlpaf durch zytosolisches Flagellin von *Salmonella typhimurium* aktiviert wird (Franchi et al., 2006; Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2006). Bisher ist jedoch unklar, ob mlpaf selbst als PRR fungiert oder ob ein übergeordneter Rezeptor Flagellin erkennt und anschließend mlpaf aktiviert. Als gesichert gilt jedoch, dass die Erkennung von zytosolischem Flagellin TLR-unabhängig erfolgt. So konnte mit Hilfe von Versuchen mit MyD88-„knock-out“- und TLR5-„knock-out“-Mausmakrophagen gezeigt werden, dass die Flagellin-abhängige Aktivierung von mNaip5 oder mlpaf TLR-unabhängig erfolgte (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006). Zusätzlich konnten aktuelle Untersuchungen zeigen, dass auch eine Infektion mit unbegeißelten Shigellen über Ipaf zu einer Aktivierung der Wirtszellen führt (Suzuki et al., 2007). Dieser Befund deutet darauf hin, dass Ipaf entweder weitere bakterielle Moleküle zusätzlich zu Flagellin erkennt oder alternativ keinen Rezeptor im wörtlichen Sinne darstellt, sondern stromabwärts eines noch nicht identifizierten PRR als Adaptermolekül fungiert (Mariathasan et al., 2004).

Im Zusammenhang mit der zytosolischen Erkennung von *L. pneumophila*-Flagellin und anschließender Legionellenrestriktion in Mausmakrophagen ist neben mlpaf auch mNaip5 (mBirc1e) beschrieben (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006). In Mäusen entscheiden verschiedene mNaip5-Allele, ob Mausmakrophagen die intrazelluläre Legionellenvermehrung unterstützen oder verhindern und ob die Mäuse anfällig oder resistent gegenüber einer Legionelleninfektion sind (Diez et al., 2003; Fortier et al., 2005; Wright et al., 2003). So vermittelt funktionelles mNaip5 in den meisten Mausstämmen (z.B. C57BL/6) eine Resistenz gegenüber einer Infektion mit *L. pneumophila* über einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus (siehe 3.1.6 Resistenz) (Derre and Isberg, 2004; Molofsky et al., 2006; Zamboni et al., 2006). Das nächste humane Homolog zum mNaip5 ist Naip (Birc1), welches bezüglich der 14 Aminosäuren, in denen sich das A/J-Maus mNaip5 (empfindlicher Mausstamm) und C57BL/6 (resistenter Mausstamm) unterscheiden, jeweils gleich viele Übereinstimmungen aufweist. Humanes Naip wurde bisher nur als

Suszeptibilitätsgen der Spinalen Muskelatrophie, einer autosomal rezessiven neuromuskulären Erkrankung, beschrieben (Lefebvre et al., 1995; Roy et al., 1995). Seine Bedeutung für bakterielle Infektionen ist bisher nicht untersucht worden.

Im Gegensatz zu den meisten Mausstämmen sind Menschen anfällig gegenüber *L. pneumophila*-Infektionen und können schwere Pneumonien (Legionärskrankheit) entwickeln. Nichtsdestotrotz gibt es bisher keine Untersuchungen zu Naip und Ipaf bezüglich der humanen Legionelleninfektion. Es bleibt zu klären, ob humanes Naip und Ipaf eine ähnliche Bedeutung für die Legionelleninfektion in Menschen haben, wie mNaip5 und mIpaf für die Legionelleninfektion in der Maus.

3.1.3.2.3 Nalps

Eine weitere Unterfamilie der NLRs umfasst die Nalps (auch PYPAFs genannt). Von den 14 Nalps sind bisher v.a. Nalp1 und Nalp3 (Cryopyrin, CIAS1, PYPAF1) untersucht worden. Das murine Nalp1b scheint durch MDP und *Bacillus anthracis* Lethaltoxine aktiviert zu werden (Boyden and Dietrich, 2006; Faustin et al., 2007). Nalp3 hingegen wird durch bakterielle RNA, dsRNA, Gicht-assoziierte Harnsäurekristalle, ATP, Nigericin, Maitotoxin, bakterielle Toxine und Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, nicht aber *Salmonella typhimurium* oder *Francisella tularensis* aktiviert (Agostini et al., 2004; Kanneganti et al., 2006b; Kanneganti et al., 2006a; Mariathasan et al., 2006; Martinon et al., 2004; Martinon et al., 2006; Sutterwala et al., 2006). Die Aktivierung durch eine große Anzahl verschiedener MAMPs und DAMPs lässt vermuten, dass Nalp1 und Nalp3 nicht direkt als Rezeptoren sondern vielmehr als Adapter-/Signalmoleküle fungieren (Kanneganti et al., 2007). Dieser Signalweg ist TLR-unabhängig und scheint z.T. über eine Erniedrigung der intrazellulären Kalium-Konzentration durch ATP-Bindung an den P2X₇-Rezeptor oder durch direkte Porenbildung durch bakterielle Toxine vermittelt zu werden. Die Nalp3-Aktivierung durch bakterielle Moleküle plus ATP scheint zusätzlich von der Passage der bakteriellen Moleküle durch Poren, die durch das Protein Pannexin-1 gebildet wurden, abhängig zu sein (Kanneganti et al., 2007).

Eine bildhafte Zusammenfassung der humanen NLRs und ihrer Aktivatoren ist in Abbildung 3.1-1 zu sehen.

3.1.3.3 Retinoic acid inducible gene-I (RIG-I)-like Helikasen (RLHs)

Neben den TLRs und NLRs fungieren die kürzlich identifizierten RLHs (auch CARD-Helikasen genannt) ebenfalls als PRRs. Zu dieser PRR-Familie gehören RIG-I und MDA5. Beide Moleküle sind charakterisiert durch eine DexD/H-Box-RNA-Helikase-Domäne und zwei CARD-Domänen (Andrejeva et al., 2004; Yoneyama et al., 2004). RIG-I und MDA5 erkennen virale 5'-phosphorylierte ssRNA oder dsRNA im Zytosol, unterscheiden aber zwischen verschiedenen RNA-Viren (Andrejeva et al., 2004; Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Yoneyama et al., 2004). So erkennt RIG-I eine Vielzahl von RNA-Viren, wie Newcastle disease Virus, Vesikuläres Stomatitis Virus, Sendai Virus, Japanisches Enzephalitisvirus und Influenzaviren, nicht jedoch das Enzephalomyokarditisvirus (EMCV). MDA5 hingegen scheint spezialisiert zu sein auf die Erkennung von Picornaviren, wie EMCV (Gitlin et al., 2006; Kato et al., 2006). Im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 besitzt Lgp2 als drittes Mitglied der RLH-Familie keine CARD-Domäne und scheint aus diesem Grund nicht in der Lage zu sein, eine Signaltransduktion zu vermitteln. Aktuelle Untersuchungen in „knock-out“ Mäusen deuten darauf hin, dass Lgp2 die RIG-I-Aktivierung negativ reguliert, wohingegen MDA5 positiv durch Lgp2 beeinflusst zu werden scheint (Diao et al., 2007). Eine bildhafte Zusammenfassung der humanen RLHs und ihrer Aktivatoren ist in Abbildung 3.1-1 zu sehen.

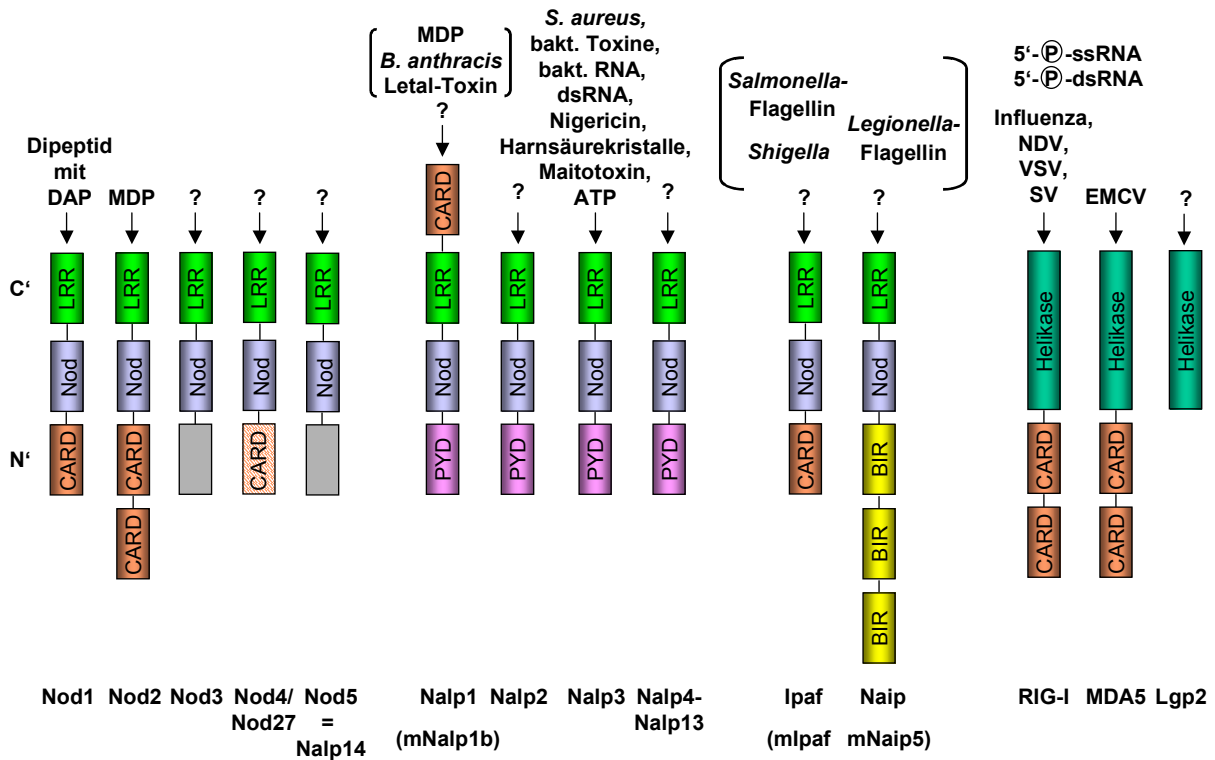


Abbildung 3.1-1: Humane NLR- und RLH-Proteine und ihre Aktivatoren

Dargestellt sind die humanen NLR- und RLH-Proteine. Im Fall von Ipaf, Naip und Nalp1 sind in Klammern ebenfalls die murinen Homologe sowie deren Aktivatoren benannt. Die aminoterminalen Domänen von Nod3 und Nod5 (= Nalp14) sind noch nicht klar charakterisiert. Bei Nod5 handelt es sich möglicherweise um eine CARD-Domäne, Nod4/Nod27 besitzt eventuell eine atypische CARD-Domäne.

Verwendete Abkürzungen: LRR (leucine rich repeats), Nod (nucleotide-binding oligomerization domain), CARD (caspase recruitment domain), PYD (pyrin domain), BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat), DAP (Diaminopimelinsäure), MDP (Muramyldipeptid), dsRNA (doppelsträngige RNA), ATP (Adenosintriophosphat), NDV (Newcastle disease Virus), VSV (Vesikuläres Stomatitis Virus), SV (Sendai Virus), EMCV (Enzephalomyokarditis Virus).

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Fritz et al., 2006).

3.1.3.4 Interferon-induzierender zytosolischer PRR

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Infektion mit intrazellulären Bakterien zu einer Induktion von IFN β - (Interferon β) und von IFN β -abhängigen Genen führt (McCaffrey et al., 2004; O'Connell et al., 2005; O'Riordan et al., 2002; Stetson and Medzhitov, 2006; Stockinger et al., 2004). Der dabei beteiligte PRR wurde bislang nicht identifiziert. Anhand von „knock-out“- und „knock-down“-Studien konnten jedoch TLRs, Nod1, Nod2, RIG-I und MDA5 ausgeschlossen werden (O'Connell et al., 2005; Opitz et al., 2006a; Stetson and Medzhitov, 2006; Stockinger et al., 2004).

3.1.3.5 andere

Zusätzlich zu den TLRs, NLRs und RLHs gibt es noch weitere PRRs, wie z.B. die CLRs („C-type lectin receptors“). Dabei handelt es sich um transmembranäre Rezeptoren, die eine oder mehrere C-Typ Lektin-ähnliche Domänen besitzen (Robinson et al., 2006). Sie sind in der Lage, endogene Liganden, MAMPs und Pathogene zu erkennen und endozytotisch/phagozytotisch aufzunehmen. Darüber hinaus spielen sie eine Rolle bei der Erhaltung der endogenen Glykoprotein-Homöostase, der Antigenpräsentation und dem phagozytotischen Abtöten (Brown, 2006; Taylor et al., 2005). Zusätzlich können einige CLRs intrazelluläre Signale aktivieren, die die inflammatorische Antwort der Wirtszellen beeinflussen. Ein prominentes Mitglied der CLR-Familie ist das Dectin-1, das z.T. mit TLR2 kooperiert und Zymosan von Hefen erkennt. Es beeinflusst zum Einen über eine intrazelluläre Domäne die Genexpression inflammatorischer Gene und zum Anderen stellt es den primären Rezeptor auf Makrophagen für die Phagozytose von verschiedenen Pilzen dar (Brown et al., 2002; Brown, 2006).

Zudem existieren weitere Moleküle, die bisher nicht klar als Rezeptoren der angeborenen Immunantwort charakterisiert wurden, die aber auf Grund ihrer Struktur und ihrer Funktion hierzu gezählt werden könnten. Dazu gehört z.B. PIDD („p53-induced protein with a death domain“). Dabei handelt es sich um ein Molekül, das ursprünglich als Zielgen für p53 sowie als Protein mit unbekannter Funktion beschrieben wurde (Lin et al., 2000; Telliez et al., 2000). PIDD besitzt wie die TLRs und NLR LRR-Domänen, welche wahrscheinlich zur Ligandenerkennung dienen. Es ist bekannt, dass es mit dem CARD-enhaltenden Adaptermolekül RAIDD („Rip-associated ICH/ECD3-homologous protein with a death domain“) und der pro-Caspase-2 interagiert und Apoptose über den mitochondrialen Weg initiiert (Tinel and Tschopp, 2004). Zusätzlich konnten weitere Untersuchungen zeigen, dass PIDD nach Aktivierung durch Doppelstrangbrüche ebenso einen NF- κ B-abhängigen antiapoptischen Signalweg aktiviert (Janssens et al., 2005). Somit ist auf Grund der Molekülstruktur und der ausgelösten Signaltransduktion nicht ausgeschlossen, dass PIDD auch eine Rolle in der angeborenen Immunantwort spielen könnte (Tinel and Tschopp, 2004).

3.1.4 Signaltransduktion

Als Signaltransduktion werden biochemische Prozesse bezeichnet, mittels derer Zellen auf äußere Reize reagieren, diese umwandeln und in das Zellinnere weiterleiten. Die Signalwege der unterschiedlichen PRRs können dabei: (I) zur transkriptionellen oder postranskriptionellen Genregulation von inflammatorischen Genen, Interferonen und antimikrobiellen Molekülen, (II) zu verschiedenen Formen des programmierten Zelltods oder (III) zur Vermittlung angeborener Resistenzmechanismen gegen intrazelluläre Mikroben z.B. über die Regulation der phagolysosomalen Maturation und/oder Autophagy führen (Akira et al., 2006; Fritz et al., 2006; Meylan et al., 2006; Radtke and O'Riordan, 2006).

3.1.4.1 NLR-Signalweg

NLR-Proteine befinden sich in inaktiver Form im Zytosol. Die Ligandenerkennung durch die LRR-Domäne führt zur Aufhebung der LRR-vermittelten Inhibition der NOD-Domäne. Durch die anschließende Selbstoligomerisation der NOD-Domäne kommt es zur Komplexbildung und so zur Aktivierung der rekrutierten Effektoren (Inohara et al., 2005; Martinon and Tschopp, 2005). Nachfolgend wird einzeln auf die Signalwege der Nods, Ipaf und Naip sowie der Nalps eingegangen.

3.1.4.1.1 Signalwege der Nods

Nach Aktivierung von Nod1 und Nod2 durch Peptidoglykane kommt es durch CARD-CARD-Interaktionen zur Rekrutierung von Rip2 („receptor-interacting protein 2“) (Kufer et al., 2005). Der Nod-Rip2-Komplex wiederum führt zur Rekrutierung des IKK- („I κ B kinase“) Komplexes, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und nachfolgend zur Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie z.B. Interleukin- (IL-) 8 und pro-IL-1 β (Inohara et al., 2000). Nods können außerdem abhängig vom Adaptermolekül CARD9 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktivieren (Hsu et al., 2007). So ist Nod2 in der Lage, p38 und ERKs („extracellular regulated signal kinase“) zu aktivieren und Nod1 wurde in Zusammenhang gebracht mit der Aktivierung von JNK („c-Jun NH₂ terminal kinase“) und p38 (Girardin et al., 2001; Kobayashi et al., 2005; Opitz et al., 2006a).

Die Abbildung 3.1-2 zeigt schematisch den Signalweg von Nod1 und Nod2 über Rip2.

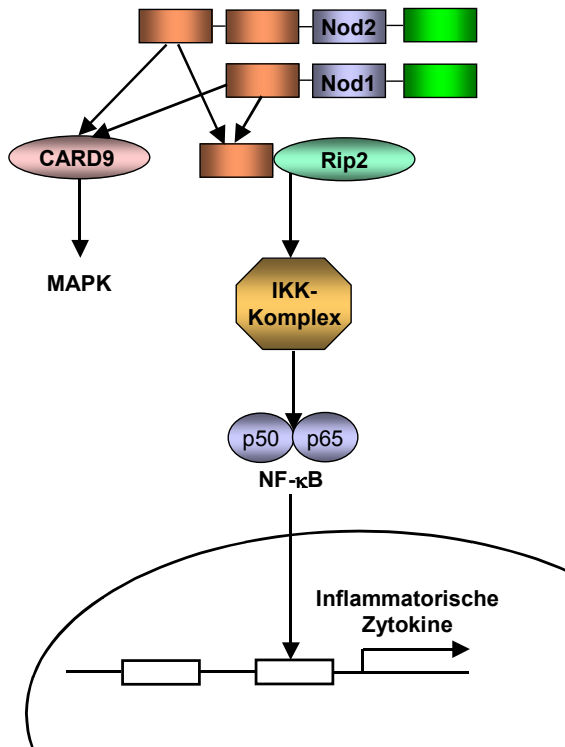


Abbildung 3.1-2: Signalweg der NLR-Moleküle Nod1 und Nod2

Nach Aktivierung von Nod1 und Nod2 kommt es zur Rekrutierung des Adaptormoleküls Rip2 über homophile CARD-CARD-Interaktionen. Darauf folgt die Aktivierung des IKK-Komplexes und nachfolgend die NF-κB-abhängige Gentranskription inflammatorischer Zytokine. Zusätzlich können Nod1 und Nod2 CARD9-abhängig MAPK aktivieren.

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Lee and Kim, 2007)

3.1.4.1.2 Signalwege von mlpaf und mNaip5

Die Aktivierung von mlpaf z.B. durch zytosolisches Salmonellen-Flagellin bewirkt über homophile PYD-PYD-Interaktionen möglicherweise eine Rekrutierung des CARD- und PYD-enthaltenden Adaptermoleküls ASC („apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“) sowie der Caspase-1 und damit die Bildung eines Inflammasom genannten Multiproteinkomplexes (Franchi et al., 2006; Martinon et al., 2002; Miao et al., 2006). Im Rahmen des Inflammasoms kommt es zur Spaltung der inaktiven pro-Caspase-1 und damit zur Aktivierung der Caspase-1. Nachfolgend bewirkt die aktive Caspase-1 eine Spaltung von pro-IL-1 β und Sekretion von reifem IL-1 β (Dinarello, 1998a). Zur effizienten Produktion von maturiertem IL-1 β ist zusätzlich zu dem Inflammasom ein erster Stimulus notwendig, der zur NF-κB-abhängigen Gentranskription von pro-IL-1 β führt (Mariathasan et al., 2004). Neben der Caspase-1-abhängigen IL-1 β -Produktion nach Aktivierung von Ipaf konnte gezeigt werden, dass es nach Legionelleninfektion von Mausmakrophagen über die Erkennung des Legionellen-Flagellins durch Ipaf Caspase-1-abhängig, aber IL-1 β -unabhängig entweder zum Zelltod der Makrophagen (Mariathasan et al., 2004; Molofsky et al., 2006; Zamboni et al., 2006) oder zur Phagosommaturation (Amer et al., 2006) und damit zur Restriktion der Legionellenvermehrung kommt. Somit scheint mlpaf verschiedene, noch nicht exakt charakterisierte Funktionen in der angeborenen Immunantwort auf bakterielle Infektionen zu besitzen.

Die Erkennung von Legionellen-Flagellins in Mausmakrophagen scheint darüber hinaus über mNaip5 erfolgen zu können. Während initiale Studien eine z.T. ASC- und Ipaf-abhängige Caspase-1 Aktivierung durch aktiviertes mNaip5 nahe legten (Molofsky et al., 2006; Zamboni et al., 2006), deuten aktuellere Studien auf eine andere Hauptfunktion von mNaip5 hin. So konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass (I) die Legionellen-induzierte Caspase-1-Aktivierung mNaip5-unabhängig ist und mNaip5 unabhängig von mlpaf, Caspase-1 und IL-1 β die Restriktion der Legionellenvermehrung vermittelt (Lamkanfi et al., 2007), (II) die Aktivierung von mNaip5 nach Legionelleninfektion zur Phagosommaturation und somit zur Hemmung der intrazellulären Legionellenvermehrung führt (Fortier et al., 2007) und (III) diese Effekte auf die Phagosommaturation möglicherweise Autophagie-abhängig geschehen (Amer and Swanson, 2005).

3.1.4.1.3 Signalwege der Nalps

Ähnlich wie Ipaf scheinen zumindest einige Mitglieder der Nalp-Unterfamilie in der Lage zu sein, ein Inflammasom zu bilden. So führt die Aktivierung von Nalp2 oder Nalp3 zur Bildung eines Inflammasoms. Dabei kommt es zur Rekrutierung von ASC und anschließend zusammen mit dem Adaptermolekül Cardinal über CARD-CARD-Interaktionen zur Aktivierung der Caspase-1 und folgender IL-1 β -Sekretion (Agostini et al., 2004). Im Nalp1-Inflammasom wird neben ASC über die zusätzliche carboxyterminale CARD-Domäne von Nalp1 (siehe Abbildung 3.1-1) Caspase-5 rekrutiert (Martinon et al., 2002). Um effizient maturiertes IL-1 β durch die Inflammasom-aktivierte Caspase-1 produzieren zu können, ist wiederum ein erster Stimulus notwendig, der zur NF- κ B-abhängigen Gentranskription von pro-IL-1 β führt (Mariathasan et al., 2004). Darüber hinaus aktivieren möglicherweise auch einige Nalps einen Caspase-1-abhängigen, aber ASC-unabhängigen angeborenen inflammatorischen Zelltod (Willingham et al., 2007).

Die Abbildung 3.1-3 zeigt schematisch zusammengefasst die Signalwege der wichtigsten NLR-Moleküle ohne Nod1 und Nod2.

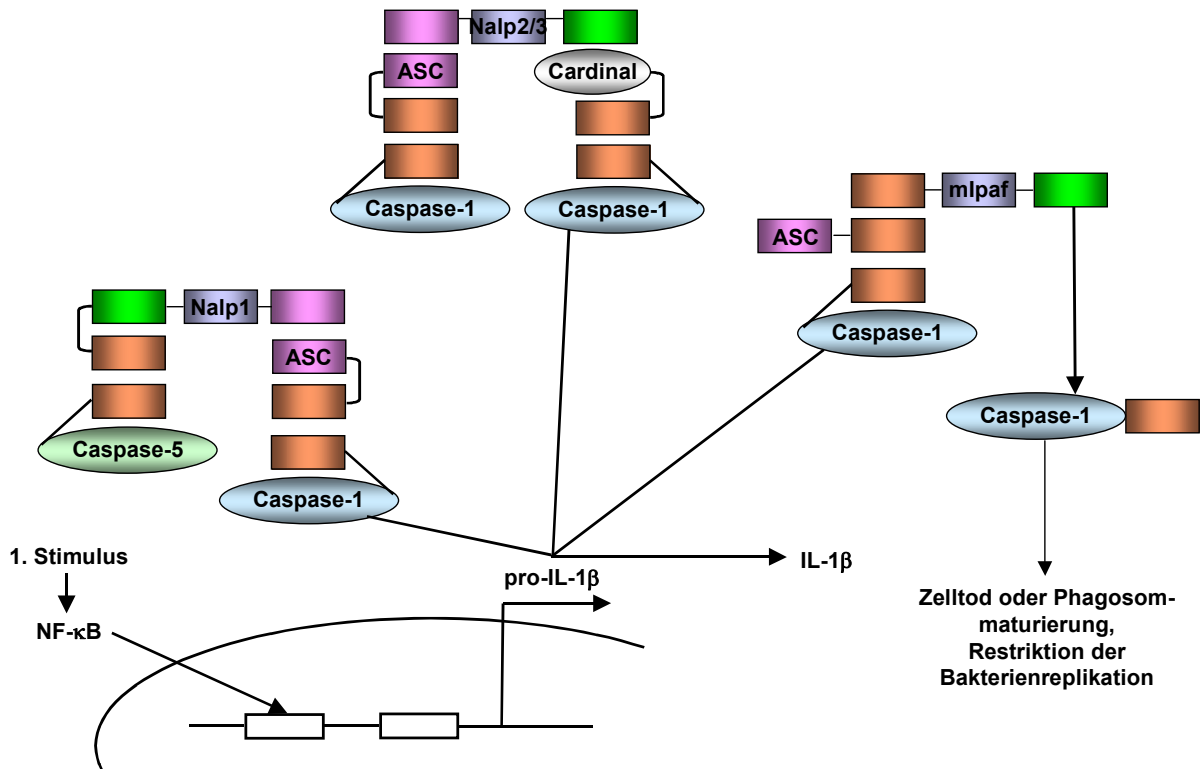


Abbildung 3.1-3: Signalwege der NLR-Moleküle Nalp1, Nalp2/3 und mlpaf

Alle hier dargestellten Moleküle aktivieren nach Ligandenbindung in einem Multiproteinkomplex, dem Inflammasom, die Caspase-1. Dadurch kommt es zur Spaltung von pro-IL-1 β zu IL-1 β . Zur Transkription von pro-IL-1 β und anschließende effektive Produktion von IL-1 β ist eine NF- κ B-Aktivierung durch einen ersten Stimulus von Nöten. mlpaf und möglicherweise auch einige Nalps aktivieren darüber hinaus einen Caspase-1-abhängigen, aber ASC-unabhängigen angeborenen inflammatorischen Zelltod und können Resistenzen gegenüber intrazellulären Bakterien über die Beeinflussung der Phagosommaturation und Fusion mit dem Lysosom vermitteln (siehe 3.1.6).

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Lee and Kim, 2007; Martinon and Tschopp, 2004)

3.1.4.2 RLH-Signalweg

Die Aktivierung von RIG-I und MDA5 durch virale RNA führt über homophile CARD-CARD-Interaktionen zur Rekrutierung des in der Mitochondrienmembran lokalisierten Adaptermoleküles IPS-1 („IFN β promotor stimulator 1“; auch MAVS „mitochondrial antiviral signaling“, Cardif „CARD adaptor inducing IFN β “ oder VISA „virus-induced signalling adaptor“ genannt) (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). IPS-1 führt nachfolgend zum Einen nach Interaktion mit TRAF3 („tumor necrosis factor receptor-associated factor 3“) über die Aktivierung von TBK1/IKK β („TANK („TRAF family member-associated NF- κ B activator“)-binding kinase 1/inducible I κ B kinase“) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. Zum Anderen kommt es über die Rip1- und

FADD- („Fas-associated death domain“) vermittelte Aktivierung des IKK-Komplexes zur Aktivierung von NF- κ B (Kawai et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). IRF3/7 und NF- κ B zusammen bewirken die Expression von Typ I IFN, wohingegen inflammatorische Zytokine und Chemokine oftmals v.a. NF- κ B-abhängig reguliert sind (Kawai et al., 2005; Saha et al., 2006; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005).

Die Abbildung 3.1-4 stellt den RLH-Signalweg schematisch dar.

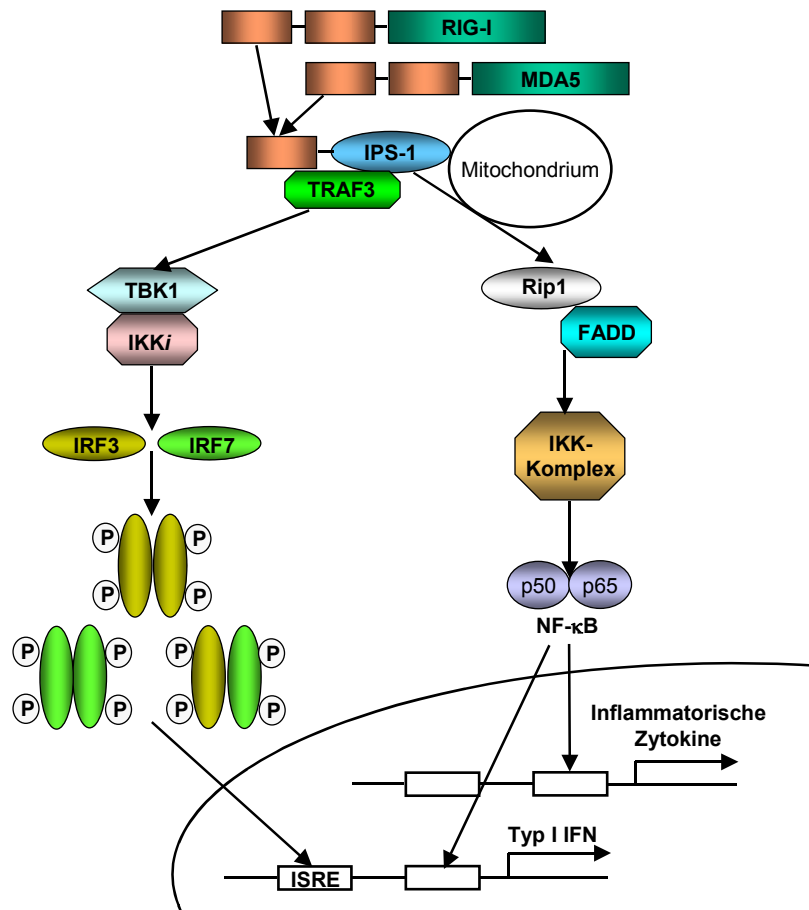


Abbildung 3.1-4: RLH-Signalweg und Aktivierung von IRF3 und IRF7

Nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 kommt es zur Interaktion mit dem Adaptermolekül IPS-1. Anschließend interagiert IPS-1 zum Einen mit TRAF3 und aktiviert TBK1/IKK ι . Nachfolgend kommt es zur Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 und zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren. Diese translozieren in den Kern, binden an die Konsensus-DNA-Sequenz ISRE der Typ I IFN und führen damit zur Gentranskription. Zum Anderen kommt es Rip1- und FADD-abhängig zur Aktivierung des IKK-Komplexes und von NF- κ B und zur Produktion inflammatorischer Zytokine.

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Honda and Taniguchi, 2006; Lee and Kim, 2007).

3.1.4.3 Nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B)

Bei NF- κ B handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der erstmals 1986 beschrieben wurde (Sen and Baltimore, 1986). Er liegt als Homo- oder Heterodimer bestehend aus Proteinen der Rel-Familie (p50/p105, p52/p100, RelA (p65), RelB und c-Rel) vor. Die am häufigsten zu findende Form ist ein Heterodimer aus p50/p65. Alle Rel-Proteine besitzen eine Rel-Homologie-Domäne, die die DNA-Bindung, die Dimerisation und die Interaktion mit den spezifischen inhibitorischen Faktoren vermittelt (Ghosh et al., 1998). Die Inhibitoren, die I κ Bs, halten NF- κ B in inaktiver Form im Zytoplasma. Diese Inaktivierung wird durch die Degradation der I κ Bs durch den IKK-Komplex nach Aktivierung durch unterschiedliche, z.B. TLR-, Nod1/2- oder RLH-abhängige Signale, aufgehoben und NF- κ B transloziert in den Kern. Dadurch kommt es zur Transkription diverser Gene, wie z.B. Zytokin-, Wachstumsfaktor-, Zelladhäsionsmolekül-Genen sowie von pro- und antiapoptotischen Genen, welche in ihrem Promotorbereich die κ B-Konsensus-Sequenz enthalten. Dazu gehören z.B. die proinflammatorischen Zytokine pro-IL-1 β , pro-IL-18 und IL-8 (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002).

3.1.4.4 Interferon-regulatory factor (IRF)

Neben NF- κ B gibt es weitere Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Genregulation der angeborenen Immunantwort spielen. Dazu gehören z.B. die Mitglieder der IRF-Familie. Diese wurden ursprünglich als bei der Induktion von Typ I IFN-kodierenden Genen involvierte Transkriptionsfaktoren beschrieben (Miyamoto et al., 1988). Heutzutage ist bekannt, dass es sich um eine Familie von transkriptionalen Aktivatoren und Repressoren handelt, die eine Rolle in vielen biologischen Prozessen spielen. So sind sie beteiligt an der Regulation der Immunantwort und Wirtsabwehr, an Zytokin-vermittelten Signalwegen, an der Regulation des Zellwachstums und an der hämatopoetischen Entwicklung (Honda and Taniguchi, 2006).

Die IRF-Familie der Säugetiere umfasst neun Mitglieder und ist charakterisiert durch eine konservierte aminoterminal DNA-Bindungsdomäne. Über diese Domäne binden IRFs an ihre Konsensus-DNA-Sequenz, welche ISRE („IFN-stimulated response element“) oder IRF-E (IRF-Element) genannt wird (Honda and Taniguchi, 2006). Die carboxylterminale Domäne ist weniger konserviert und fungiert als regulatorische Einheit (Eroshkin and Mushegian, 1999). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Rolle von IRF3 näher untersucht. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf nur auf IRF3 und zum Teil auf IRF7 eingegangen, da IRF3 und IRF7 sehr homolog sind und beide als Schlüsselregulatoren der Typ I IFN-Antwort nach Virusinfektion beschrieben wurden. Neben der TLR-abhängigen NF- κ B- und MAPK-

Aktivierung wurde auch eine Aktivierung von IRFs nach TLR-Stimulation beschrieben. So führt z.B. eine Erkennung von MAMPs durch TLR3 und TLR4 zur Aktivierung von IRF3 und IRF7, eine Stimulation von TLR7 und TLR9 zur IRF7-Aktivierung (Honda and Taniguchi, 2006).

Im Weiteren wird die Aktivierung von IRF3 und IRF7 nach Stimulation von Nicht-TLR-PRRs näher beschrieben.

IRF3 wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert und liegt im Zytosol in inaktiver Form vor. Z.B. nach Virusinfektion und Erkennung viraler MAMPs durch zytosolische PRRs kommt es über TBK1/IKK α zur Phosphorylierung der regulatorischen Domäne von IRF3 und zur Bildung von Homo- und Hetero- (mit IRF7) Dimeren. Diese translozieren anschließend in den Nukleus und interagieren mit CBP („CREB („cyclic-AMP-responsive-element-binding protein“)-binding protein“) oder p300, um einen Holokomplex zu bilden, der dann an die DNA-Sequenz des Zielgens bindet (Fitzgerald et al., 2003; Lin et al., 1998; Sato et al., 1998; Sharma et al., 2003; Suhara et al., 2000; Weaver et al., 1998; Yoneyama et al., 1998). IRF3 ist ein potenter Aktivator des *ifn β* -Gens, während IRF7 effizient *ifn α* - und *ifn β* -Gene aktiviert (Sato et al., 2000). Vieles spricht dafür, dass IRF3 hauptsächlich für die initiale Phase einer Typ I IFN-Antwort verantwortlich ist, während IRF7 die späte Phase der Typ I IFN-Produktion reguliert. (Näheres siehe 3.1.5.1 und Abbildung 3.1-5). Andererseits zeigt eine aktuelle Studie, dass v.a. IRF7 für die, zumindest TLR-vermittelte, Typ I IFN-Induktion essentiell ist (Honda et al., 2005). Neben der Aktivierung von IRF3 in der Virusinfektion zeigen neueste Untersuchungen, dass die zytosolische Erkennung intrazellulärer Bakterien, wie *Listeria monocytogenes*, ebenfalls über einen TBK1-IRF3-abhängigen Signalweg zur IFN β -Produktion führt (O'Connell et al., 2004; Stetson and Medzhitov, 2006; Stockinger et al., 2004).

In der Abbildung 3.1-4 ist der Signalweg der Aktivierung von IRF3 und IRF7 nach Aktivierung zytosolischer Nicht-TLR-Rezeptoren schematisch dargestellt.

3.1.5 Zytokine

Bei den Zytokinen handelt es sich um eine Gruppe von Peptiden, die u.a. die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen einleiten bzw. regulieren. Viele Zytokine spielen außerdem eine wichtige Rolle für immunologische Reaktionen als Antwort auf eine Inflammation. Proinflammatorische Zytokine werden von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, aber auch von anderen Zelltypen wie Epithelzellen und Fibroblasten produziert (Bogdan et al., 2004).

Man unterscheidet im Wesentlichen vier Hauptgruppen von Zytokinen: Interferone (IFN), Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren und Chemokine.

3.1.5.1 Typ I Interferone

Bei den Interferonen handelt es sich um die ersten identifizierten Zytokine. Sie wurden erstmalig vor 50 Jahren als Produkte von virusinfizierten Zellen beschrieben, die in der Lage sind, einen virusresistenten Status in Nachbarzellen hervorzurufen (Isaacs et al., 1957). Interferone gehören zur Klasse II α -helikaler Zytokine und werden an Hand ihrer Rezeptoren, ihrer Molekularstruktur und Sequenzhomologien in Typ I, Typ II und Typ III IFN unterschieden (Ank et al., 2006; Schroder et al., 2004; Theofilopoulos et al., 2005). So binden Typ I IFN an einen ubiquitär exprimierten heterodimeren Rezeptor aus IFNAR („IFN α/β receptor“) 1- und IFNAR2-Untereinheiten (Stark et al., 1998). Zur Typ I IFN-Familie gehören IFN α (13 Subtypen in Menschen, 14 in Mäusen), IFN β (nur ein Mitglied) sowie IFN ϵ , κ , ω , δ und τ , wobei aus immunologischer Sicht möglicherweise hauptsächlich IFN α und β von Interesse sind und im Folgenden weiter als Typ I IFN besprochen werden (Theofilopoulos et al., 2005). Zu den Typ II IFN gehört nur IFN γ , das über den IFN γ -Rezeptor Signalkaskaden auslöst (Stark et al., 1998). IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28 A) und IFN λ 3 (IL-28 B) stellen die Typ III IFN dar. Sie binden an einen einzigartigen Rezeptor, weisen aber sonst sehr viele Ähnlichkeiten zu den Typ I IFN auf (Ank et al., 2006).

Die vorwiegend bekannte und untersuchte Aktivität von Typ I IFN ist es, zellautonome antivirale Aktivität in nahezu allen Zellen, die durch Viren befallen werden können, zu induzieren. Nichtsdestotrotz werden Typ I IFN auch als Antwort der angeborenen Immunantwort auf viele bakterielle und andere nicht-virale Infektionen produziert (Bogdan et al., 2004; Decker et al., 2005). Die Rolle der Typ I IFN in der antibakteriellen Abwehr ist bisher nur wenig untersucht. Zudem scheint es, dass Typ I IFN sowohl protektiv als auch nachteilig für den Wirt in Infektionen mit unterschiedlichen Bakterien sein kann: So zeigten *in vivo* Versuche, dass Typ I IFN z.B. Resistenz gegen Infektionen mit *Salmonella typhimurium* vermitteln (Bukholm et al., 1984). Zudem spielen Typ I IFN eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der Wirtsresistenz gegen die extrazellulären Keime *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* und Gruppe B Streptokokken (Mancuso et al., 2007). Einen nachteiligen Effekt üben Typ I IFN jedoch bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes* aus (Auerbuch et al., 2004; Carrero et al., 2004; O'Connell et al., 2004).

Typ I IFN sind als Monomere aktiv. Nach ihrer Bindung an den IFNAR kommt es zur Phosphorylierung der Janus-Protein-Tyrosin-Kinasen TYK2 („tyrosine kinase 2“) und JAK1 („Janus kinase 1“), zur Rekrutierung und Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT („signal transducer and activator of transcription“) 1 und STAT2 und zur Bildung von Hetero- (STAT1 und STAT2) oder Homo- (STAT1) Dimeren (siehe Abbildung 3.1-5). Der Heterodimer STAT1/STAT2 assoziiert mit IRF9 (zusammen auch ISGF3 „IFN-stimulated gene factor 3“ genannt), transloziert in den Nukleus, bindet hier an die ISRE-Sequenzen von

Genpromotoren und initiiert die Translation von einigen hundert sogenannter ISGs („IFN-stimulated genes“). Einige der ISGs, wie z.B. die Mx-Proteine, die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (OAS) und die Proteinkinase R, wirken antiviral (Haller and Kochs, 2002; Hovanessian, 2007), die Funktion vieler anderer ISGs ist jedoch noch unverstanden. Ein prominentes ISG ist IRF7. Die Induktion von IRF7 durch Typ I IFN bedingt eine positive Rückkopplung der IFN α/β -Transkription (siehe Abbildung 3.1-5). Zusätzlich regulieren STAT1-Homodimere Gene, die eine GAS- („gamma IFN-activated site“) Promotorsequenz enthalten (Levy et al., 2003; Mogensen et al., 1999; Remoli et al., 2002; Sato et al., 2001; Theofilopoulos et al., 2005). Neben dem JAK-STAT-Signalweg scheinen über IFNAR weitere Signalwege, wie der p38 MAPK- und der PI3K- („phosphatidylinositol 3-kinase“) Weg aktiviert zu werden (Platanias, 2005). Die Bedeutung dieser Signalkaskaden bei der Typ I IFN-Antwort auf nicht virale Pathogene ist bisher kaum untersucht (Decker et al., 2005).

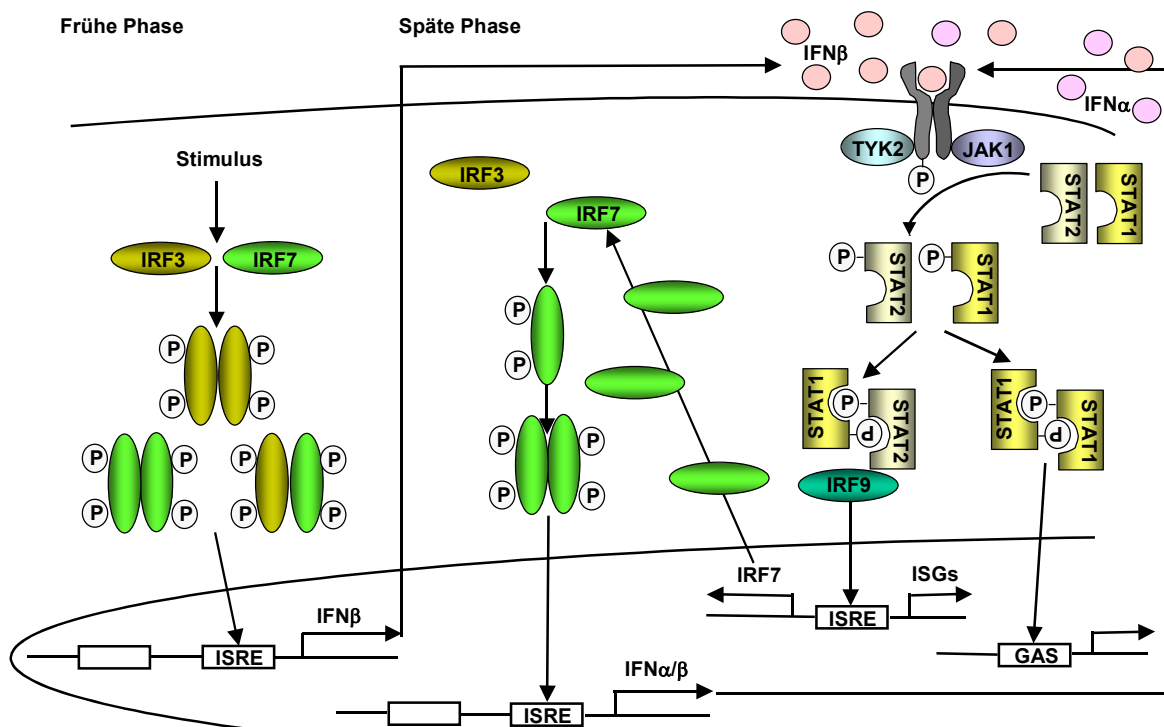


Abbildung 3.1-5: JAK-STAT-Typ I IFN-Signalweg

Nach Bindung von Typ I IFN an den IFNAR kommt es zur Phosphorylierung der Kinasen TYK2 und JAK1, zur Rekrutierung und Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 und zur Bildung von STAT1/2-Hetero- oder STAT1-Homodimeren. Der Heterodimer STAT1/STAT2 assoziiert mit IRF9 (als Komplex ISGF3 genannt), transloziert in den Nucleus, bindet hier an die ISRE von ISGs und initiiert deren Transkription. Die Expression des ISGs IRF7 führt zur vermehrten Transkription von Typ I IFN in der späten Phase der Typ I IFN-Produktion und ist somit eine essentielle Komponente der autokrinen Schleife der Typ I IFN-Produktion. Zusätzlich stimuliert der STAT1-Homodimer Gene mit einer GAS-Promotorsequenz.

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Decker et al., 2005; Honda et al., 2006)

3.1.5.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Zur IL-1-Familie gehören 11 Mitglieder, die durch eine ähnliche Genstruktur, Aminosäuresequenz und dreidimensionale Faltung gekennzeichnet sind (Dinarello, 1998b; Boraschi and Tagliabue, 2006). IL-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Inflammation und der Immunabwehr und ist an der Pathogenese vieler inflammatorischer Erkrankungen beteiligt. Es beeinflusst nahezu alle Zelltypen und wirkt oft mit anderen Zytokinen oder Mediatormolekülen zusammen (Dinarello, 1998b). Eines der am besten charakterisierten IL-1-Moleküle ist IL-1 β . IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, dessen Produktion auf drei Ebenen kontrolliert wird: Erstens wird NF- κ B-abhängig (z.B. durch TLR- oder Nod1/2-vermittelte Signale) pro-IL-1 β im Zytoplasma exprimiert. Zweitens ist die Prozessierung von pro-IL-1 β durch das Caspase-1- (auch ICE „IL-1 β converting enzyme“ genannt) Inflammasom in das biologisch aktive IL-1 β (p17) erforderlich (Dinarello, 1998a; Martinon et al., 2002) (siehe auch 3.1.4.1 und Abbildung 3.1-3). Drittens wird die Ausschleusung von IL-1 β über ein noch nicht genau verstandenen Mechanismus kontrolliert (Di Virgilio, 2007). Nach der Sekretion bindet IL-1 β an den IL-1 Rezeptor (IL-1R), der wie die TLRs zur TIR-Superfamilie gehört und neben der extrazellulären Immunglobulin-like-Domäne zur Ligandenbindung ebenfalls eine intrazelluläre TIR-Domäne besitzt (Gay and Keith, 1991; Sims et al., 1988). Über diese wird nach Aktivierung das Adaptormolekül MyD88 („myeloid differentiation primary response gene (88)“) rekrutiert und die NF- κ B-abhängige Gentranskription induziert (Muzio et al., 1997).

3.1.6 Resistenz

Die Aktivierung der angeborenen Immunantwort durch Pathogene bedingt die Produktion von inflammatorischen Mediatoren und antimikrobiellen Molekülen. Darüber hinaus werden entweder direkt oder durch sezernierte Mediatoren angeborene intrazelluläre Resistenzmechanismen (welche sich gegen intrazelluläre Pathogene richten) aktiviert (Radtke and O’Riordan, 2006).

So können Typ I IFN Resistenz gegenüber Pathogenen vermitteln, wobei die Rolle bei bakteriellen Infektionen sowie der genaue Mechanismus nicht klar definiert sind (siehe 3.1.5.1). Ob z.B. endogen sezerniertes IFN β eine intrazelluläre Resistenz gegenüber Legionellen in humanen Wirtszellen vermitteln kann, wurde bisher nicht untersucht.

Im Gegensatz zu Typ I IFN ist bekannt, dass Typ II IFN (IFN γ) die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS „reactive oxygen species“) durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase sowie die Generierung von reaktiven Nitrogenintermediaten (NO „nitric oxide“) durch iNOS („inducible nitric oxide synthase“) nach z.B. bakteriellen Infektionen vermitteln

(Brennan et al., 2004). NO und ROS bewirken die Inaktivierung [4Fe-4S]-Cluster-enthaltender Enzyme, Zerstörung von DNA und Oxidation von Zellmembranen und Enzyme (Fang, 1997; Haas and Goebel, 1992; Weiss, 1986). Makrophagen können aber über IFN γ auch NO- und ROS-unabhängig bakterielle Infektionen kontrollieren, wie z.B. für *Coxiella burnetii* und *L. pneumophila* gezeigt (Akamine et al., 2007; Shiloh et al., 1999; Zamboni and Rabinovitch, 2003).

Abgesehen von der z.B. IFN γ -abhängigen Bildung von Sauerstoff- und Nitrogenintermediaten produzieren Wirtszellen (wahrscheinlich direkt und nicht abhängig von endogen produzierten Zytokinen) nach Infektion auch antimikrobielle Peptide, wie Defensine und Cathelicidine (Yang et al., 2004). Dabei handelt es sich vor allem um sezernierte Proteine, die die Bakterienmembranen schädigen und damit zu einem Verlust des Membranpotentials und der Überlebensfähigkeit der Bakterien führen (Radtke and O'Riordan, 2006).

Neben der Bildung von Substraten zur Resistenzvermittlung stellt die Kompartimentalisierung intrazellulärer Bakterien in Endosomen und anschließender Verschmelzung mit dem Lysosom eine wichtige Strategie der Wirtsabwehr dar. Die Kompartimentalisierung ermöglicht es der Wirtszelle, eine negative Umgebung für die Bakterien herzustellen ohne die eigenen Funktionen zu beeinträchtigen (Radtke and O'Riordan, 2006). So herrscht in Vakuolen unter Umständen ein Umfeld mit wenigen Nährstoffen und einem niedrigen pH-Wert, was nicht-Säure-tolerante Bakterien direkt schädigt und eine optimale Bedingung für lytische Enzyme wie Lipasen, Lysozyme und Proteasen und die Fusion mit dem Lysosom darstellt (Luzio et al., 2003; Mellman et al., 1986). Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass viele intrazelluläre Bakterien (z.B. *L. pneumophila*) ihre Vakuole aktiv umgestalten, um optimale Bedingungen für ihr intrazelluläres Wachstum zu haben (siehe auch 3.2.2).

Ein weiterer, möglicherweise damit zusammenhängender, Mechanismus der angeborenen intrazellulären Resistenz umfasst die Autophagie. Autophagie ist ein phylogenetisch sehr alter Prozess, bei dem Zellschrott, funktionsunfähige Proteine, aber auch intrazelluläre Pathogene mit einer Doppelmembran umschlossen und über lysosomale Degradation eliminiert werden (Levine and Deretic, 2007; Swanson, 2006). Autophagie als intrazellulärer Abwehrmechanismus nach bakteriellen Infektionen wird z.B. über die IFN γ -abhängige Induktion von IRGs („immunity related GTPases“), auch p47 GTPasen genannt, vermittelt, wie z.B. für *Mycobacterium tuberculosis* gezeigt (Gutierrez et al., 2004; Singh et al., 2006).

Für *L. pneumophila* wurde gezeigt, dass es in Mausmakrophagen über mNaip5 und/oder mlpaf zur Restriktion der Bakterienreplikation kommt. Als zu Grunde liegende Mechanismen wurden ein vermehrter Zelltod oder die Regulation der Phagosommaturation, eventuell über verstärkte Autophagie, diskutiert (Amer et al., 2006; Amer and Swanson, 2005; Fortier et al., 2007; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006) (siehe auch 3.1.4.1.2

Signalwege von Ipaf und Naip). Über die Bedeutung der humanen Orthologe zu mNaip5 und mlpaf in bakteriellen Infektionen ist bisher nichts bekannt.

3.2 *Legionella pneumophila*

Das Gram-negative Stäbchenbakterium *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) gehört zur Familie der *Legionellaceae*, Gattung *Legionella*. Diese Gattung wurde erstmals 1979, drei Jahre nach einem Krankheitsausbruch bei einer Gruppe von Veteranen der „US American Legion“, beschrieben (Brenner et al., 1979). Die fakultativ aeroben Legionellen haben eine Größe von 0,3-0,9 µm x 2-3 µm, sind beweglich durch mehrere polare oder subpolare Flagellen (siehe Abbildung 3.2-1) und kommen ubiquitär im Wasser vor. Es handelt sich um fakultativ intrazelluläre Parasiten von Frischwasserprotozoen, die sich auch in vielen Säugetierzellen vermehren können. Aus diesem Grund können alle 48 Spezies der Gattung *Legionella* als potentiell humanpathogen angesehen werden (Fields, 1996). Andererseits werden 98% der humanen Legionellose-Fälle durch die Spezies *L. pneumophila* verursacht und davon wiederum 95% durch *L. pneumophila* der Serogruppe 1 (von insgesamt 15 Serogruppen) (Doleans et al., 2004). *L. pneumophila* vermehrt sich in einem Temperaturbereich von 25°C bis 42°C, wobei das Wachstumsoptimum bei 35°C liegt (Katz and Hammel, 1987). Deshalb begünstigen künstliche Warmwassersysteme die Vermehrung und Verbreitung von Legionellen. Zur Ausbildung respiratorischer Erkrankungen im Menschen kommt es nach Inhalation von kontaminierten Aerosolen oder Aspiration von bakterienhaltigem Wasser. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch wurde bisher hingegen nicht beschrieben (Fields et al., 2002). Besonders empfänglich sind ältere Menschen, Raucher sowie Menschen mit einem geschwächten Immunsystem, es können aber auch junge Gesunde an einer schweren Legionellenpneumonie erkranken (Albert-Weissenberger et al., 2007).



Abbildung 3.2-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Legionella pneumophila*

Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* in ihrer begeißelten Form. (© King's College London, John Pacy)

3.2.1 Legionellose

Bei der Legionellose können klinisch zwei Formen unterschieden werden: (I) die Legionärskrankheit, eine multisystemische Erkrankung mit schwerer Pneumonie (Fraser et al., 1977) und (II) das Pontiac-Fieber, eine selbstlimitierende Grippe-ähnliche Erkrankung (Glick et al., 1978). Allerdings muss bedacht werden, dass viele exponierte Personen asymptomatisch bleiben (Boshuizen et al., 2001).

Die Legionärskrankheit ist gekennzeichnet durch Fieber, nicht-produktiven Husten, Kopfschmerzen, Myalgien, Diarrhö, Verwirrtheit und Dyspnoe und kann auf Grund der eingeschränkten Lungenfunktion und im Zuge von Multiorganversagen zum Tode führen (Tsai et al., 1979). Da die Legionärskrankheit klinisch nicht von anderen Pneumonien zu unterscheiden ist, sind mikrobiologische Verfahren, wie Anzucht auf Spezialnährböden, Antigennachweis im Urin und PCR, die Mittel der Wahl zur Diagnosefindung (Edelstein, 1993).

3.2.2 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus des intrazellulären Bakteriums *L. pneumophila* läuft in Protozoen und Säugetierzellen ähnlich ab und umfasst im Wesentlichen zwei Phasen: (I) die Vermehrungsphase, in der die Bakterien nicht beweglich/nicht begeißelt und Natrium-resistent sind und (II) die infektiöse Phase, in der die Bakterien kleiner, beweglich/begeißelt, zytotoxisch, Natrium-sensitiv und osmotisch-resistent sind (Molmeret et al., 2004a; Molofsky and Swanson, 2004; Vogel and Isberg, 1999).

Die infektiöse Form von *L. pneumophila* gelangt abhängig vom Aktin-Zytoskelett der Wirtszelle über konventionelle (Opsonin-abhängig) oder „coiling“- (Opsonin-unabhängig) Phagozytose in die Wirtszelle und verbleibt hier in einem Legionellen-spezifischen Phagosom, das nicht mit dem Lysosom verschmilzt und so der Ansäuerung entgeht (Elliott and Winn, Jr., 1986; Horwitz, 1983b; Horwitz and Maxfield, 1984; Horwitz, 1984; Rechnitzer and Blom, 1989). Zu diesem Phagosom werden anschließend Mitochondrien und Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums rekrutiert und die so entstandene Organelle als LCP („legionella-containing phagosome“) bezeichnet. In dieser geschützten Vakuole wandelt sich *L. pneumophila* zur vermehrungsfähigen Form und repliziert durch binäre Teilung bis das LCP die gesamte Wirtszelle ausfüllt (Coers et al., 1999; Horwitz, 1983a; Swanson and Isberg, 1995). Zu diesem Zeitpunkt kommt es durch eine Verarmung an Nährstoffen, vor allem von Aminosäuren, zum Wechsel vom vermehrungsfähigen zum infektiösen Bakterium, zum Zelltod der Wirtszelle und damit zur Freisetzung der Legionellen (Molmeret et al., 2004a; Molofsky and Swanson, 2004; Vogel and Isberg, 1999). Die Freisetzung erfolgt durch

Apoptose und/oder Nekrose (Alli et al., 2000; Gao and Abu, 1999; Hagele et al., 1998; Walz et al., 2000).

Die schematische Darstellung des Lebenszyklus von *L. pneumophila* ist in Abbildung 3.2-2 zu sehen.

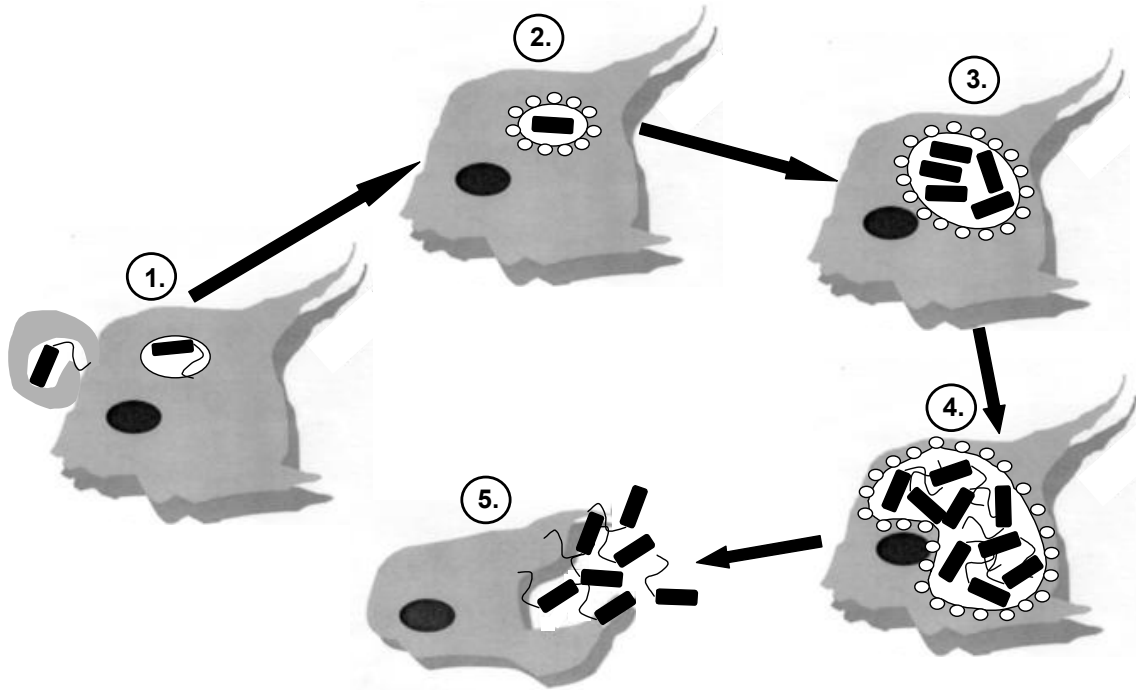


Abbildung 3.2-2: Lebenszyklus von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen

1. Über Phagozytose gelangt die infektiöse (begeißelte) Legionelle in die Wirtszelle und verbleibt in einem spezifischen Phagosom, das nicht mit dem Lysosom verschmilzt.
2. Durch Rekrutierung von Mitochondrien und Vesikeln des Endoplasmatischen Retikulums kommt es zur Bildung des LCP („legionella-containing phagosome“) und zur Umwandlung der Legionelle von der infektiösen in die vermehrungsfähige Form (nicht begeißelt).
3. *L. pneumophila* vermehrt sich im LCP.
4. Nachdem das LCP die gesamte Wirtszelle einnimmt, kommt es durch Nährstoffverarmung in der Vakuole zum erneuten Wechsel von der vermehrungsfähigen zur infektiösen Form der Legionelle.
5. Durch Apoptose und/oder Nekrose kommt es zur Freisetzung der Legionellen und anschließend zur Infektion neuer Zellen.

Die Abbildung wurde modifiziert nach (Fields et al., 2002)

3.2.3 Virulenzfaktoren

Die Pathogenese der Legionellose ist stark abhängig von der Fähigkeit von *L. pneumophila* Wirtszellen zu invadieren und sich intrazellulär zu vermehren. Diese Fähigkeit resultiert aus dem Zusammenspiel vieler bakterieller Virulenzfaktoren, die die intrazelluläre Infektion und Virulenz fördern.

So ermöglichen Oberflächenproteine wie MOMP („major outer membrane protein“), Typ IV Pili und Hsp60 („60-kDa heat shock protein“) die Anheftung und Invasion von *L. pneumophila* (Bellinger-Kawahara and Horwitz, 1990; Garduno et al., 1998; Payne and Horwitz, 1987; Stone and Abu Kwaik, 1998). Mip („macrophage infectivity potentiator“), eine weiteres Oberflächenmolekül, wird für die frühe Phase der intrazellulären Infektion benötigt und ist verantwortlich für die bakterielle Dissemination im Lungengewebe (Albert-Weissenberger et al., 2007; Cianciotto, 2001). Über die Bindung von extrazellulärem Matrix-Kollagen ermöglicht es Mip *L. pneumophila*, die epitheliale Lungenbarriere zu überwinden (Wagner et al., 2007). Legionellen exprimieren darüber hinaus ein atypisches LPS, welches TLR2, nicht aber TLR4 aktiviert und möglicherweise zur Virulenz und Pathogenität beiträgt (Girard et al., 2003; Luneberg et al., 1998). Zudem trägt es das Serogruppen-spezifische O-Antigen (Ciesielski et al., 1986). Die Flagelle, die die Legionellen je nach Entwicklungsstadium besitzen (siehe 3.2.2), ist streng genommen kein Virulenzfaktor, da sie für die Adhärenz und intrazelluläre Replikation per se nicht benötigt wird, aber sie fördert nichtsdestotrotz Adhärenz-unabhängig die Invasion von Wirtszellen (Dietrich et al., 2001; Merriam et al., 1997; Pruckler et al., 1995). Nachdem die Legionelle in die Wirtszelle gelangt ist, behindert sie die Phagosommaturation und Fusion mit dem Lysosom und somit ihre Abtötung. Unverzichtbar dafür ist das Dot/Icm Typ IVB Sekretionssystem (Berger et al., 1994; Coers et al., 1999; Vogel et al., 1998). Dieses Sekretionssystem exportiert Virulenzfaktoren wie RaIF, LidA, SidM/DrrA VipA, D und F und andere, die die phagolysosomale Verschmelzung inhibieren und die Legionellen-enthaltende Vakuole zum LCP umwandeln (Conover et al., 2003; Machner and Isberg, 2006; Murata et al., 2006; Nagai et al., 2002; Shohdy et al., 2005). *L. pneumophila* besitzt ein zweites Typ IV-ähnliches Sekretionssystem, dass jedoch für die Infektion nicht benötigt wird (Segal et al., 1999). Das zusätzlich vorhandene Legionellen-spezifische Typ II Sekretionssystem hingegen ist ebenfalls von Bedeutung für die Infektiosität von *L. pneumophila* (Cianciotto, 2001; Hales and Shuman, 1999; Polesky et al., 2001; Rossier and Cianciotto, 2001). Dieses Sekretionssystem sekretiert wie das Dot/Icm Typ IVB Sekretionssystem Virulenzfaktoren, vor allem degradative Enzyme wie z.B. eine RNase, die Zink-Metalloprotease Msp, Mono-, Di- und Triacylglycerol-Lipasen, die Phospholipasen A und C und die Lysophospholipase A (Aragon et al., 2000; Banerji et al., 2005; Flieger et al., 2002; Hales and Shuman, 1999; Rossier and Cianciotto, 2001).

4 Material und Methoden

4.1 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen.

Die in dieser Arbeit verwendeten kommerziell erhältlichen Assays (z.B. ELISA; RNA Aufreinigung) werden hier nicht extra gelistet. Die experimentelle Durchführung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Bezugsquellen sind den entsprechenden Abschnitten in dem Kapitel Methoden zu entnehmen.

4.1.1 Verwendete Zelllinien

4.1.1.1 Alveolar Typ II Epithelzelllinie (A549)

Die A549 Zellen wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ erworben und es handelt sich um eine humane Lungenkarzinomzelllinie. Die Ursprungszellen wurden durch Explantatkultur von karzinomatösem Lungengewebe eines 58-jährigen kaukasischen Mann im Jahre 1972 gewonnen (Giard et al., 1973; Lieber et al., 1976). Die Zellen wurden zwischen Passage 5 und 30 eingesetzt.

4.1.1.2 Humane Monozytenzelllinie (THP-1)

Die THP-1 Zellen wurden bei der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ erworben. Bei diesen Suspensionszellen handelt es sich um humane Monozyten, deren Ursprungszellen aus peripherem Blut eines 1-jährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen wurden (Tsuchiya et al., 1980).

4.1.1.3 Primäre Makrophagen

Die Generierung primärer Makrophagen erfolgte aus peripheren Blutmonozyten (PBMCs), die durch die Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats von Spenderblut (DRK, Wannsee) isoliert wurden.

4.1.2 Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturflaschen und Zellkulturschalen verschiedenster Ausführungen wurden alle bei Falcon® bezogen.

4.1.3 Kulturmedien, Kryomedien und Adhäsionsflüssigkeiten

Das für das Zellkulturmedium verwendete FCS wurde für eine Dauer von 30 min auf 56°C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt.

Tabelle 4-1: Kulturmedien und Kryomedium für A549 Zellen

A549 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium	500 ml Ham's F12 Medium	PAA
Zellkulturmedium	500 ml Stimulationsmedium 10% FCS	PAA Gibco
Einfriermedium	500 ml Zellkulturmedium 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Tabelle 4-2: Kulturmedien, Kryomedium und Adhäsionsflüssigkeit für THP-1 Zellen

THP-1 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium	500 ml RPMI Medium	Gibco
Zellkulturmedium	500 ml Stimulationsmedium 10% FCS 5 ml Glutamin 200 mM 100 x	Gibco Gibco Gibco
Einfriermedium	500 ml Zellkulturmedium 10% DMSO	Sigma
Adhäsionsflüssigkeit	100 ng/ml PMA	Sigma

Tabelle 4-3: Kulturmedien für primäre Makrophagen

THP-1 Zellen	Zusammensetzung	Hersteller
Stimulationsmedium	500 ml RPMI Medium	Gibco
Zellkulturmedium	500 ml Stimulationsmedium 10% FCS 5 ml Glutamin 200 mM 100 x	Gibco Gibco Gibco
EDTA-Waschpuffer	500 ml RPMI Medium 5% FCS 0,2 mM EDTA	Gibco Gibco Roth

4.1.4 Bakterien

4.1.4.1 *Legionella pneumophila* Stämme 130b, JR32, JR32 $\Delta dotA$, Corby und Corby $\Delta flaA$

Bei den für die Infektion der A549 Zellen, THP-1 Zellen und primären Makrophagen eingesetzten *L. pneumophila* Wildtypstämmen 130b, JR32 und Corby handelt es sich um Legionellen der Serogruppe 1. Weiterhin verwendet wurden die Mutanten *L. pneumophila* JR32 $\Delta dotA$, eine Mutante des Typ IVB Sekretionsapparates (Sadosky et al., 1993), und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$, eine Flagellin-Deletionsmutante (Heuner et al., 1995). Erworben wurde die Legionellen von N. Cianciotto, USA (*L.p.* 130b), H. Shuman, USA (*L.p.* JR32 und Mutante) bzw. von K. Heuner, Würzburg (*L.p.* Corby und Mutante).

4.1.4.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Für die Aufreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurde der kompetente *E. coli* Stamm *DH5 α* TM (Invitrogen) verwendet.

4.1.5 Medien für die Bakterienkultur

Nach Fertigstellung der Medien wurden diese für 10 min bei 115°C autoklaviert und bei 4°C gelagert. Die Zugabe des Ampicillins für die Selektionsagarplatten erfolgte nach dem Abkühlen des agarhaltigen Mediums kurz vor dem Gießen der Platten.

Tabelle 4-4: Medien für die Bakterienkultur

Medien für Bakterienkultur	Zusammensetzung	Hersteller
THY-Medium	30 g Todd Hewitt Broth 5 g Hefeextrakt A. bidest. ad 1000 ml	BD Mikrobiologie Sigma
<i>L. pneumophila</i> Kryomedium	80% THY-Medium 20% Glycerol 99%ig	Sigma
Luria Bertani (LB) Medium (<i>E.coli</i>)	10 g Trypton enzymatisch hydrolysiert aus Casein 5 g Hefeextrakt 5 g Natriumchlorid A. bidest. ad 1000 ml	Fluka Sigma Roth
Luria Bertani Kryomedium (<i>E. coli</i>)	400 μ l LB Medium 500 μ l Glycerol 99%ig	Sigma
Luria Bertani Selektionsagarplatten (<i>E. coli</i>)	7,5 g Agar 50 μ g/ml Ampicillin LB Medium ad 500 ml	Beckton Dickinson Sigma

4.1.6 Sonstige Materialien für das Arbeiten mit Bakterien

Tabelle 4-5: Materialien für das Arbeiten mit Bakterien

Verbrauchsmaterialien	Verwendungszweck	Hersteller
BCYE Agar Platten	Anzucht von <i>L. pneumophila</i>	Heipha
Gentamycin 20 ml	Antiinfektivum	Gibco
Sterile Watteträger	Überführen von Bakterien	Applimed SA
Unitwist 400	Anzucht von <i>E. coli</i>	Uniequip
10 cm Kulturschalen	Gießen der Selektionsagarplatten	Nunch
Einmal Impfösen 10 µl	Ausplattieren von Bakterien	Roth

4.1.7 Stimulantien und Enzyme

Tabelle 4-6: Stimuli

Stimulus	Ursprung	Hersteller
INFβ	human recombinant	InvivoGen

Tabelle 4-7: Enzyme

Enzyme	Verwendungszweck	Hersteller
Trypsin/EDTA 1 x	Ablösen der A549 Zellen	Gibco
M-MLV Reverse Transkriptase	Generierung von cDNA aus RNA	Invitrogen
RNasin, rekombinant	Generierung von cDNA aus RNA	Promega
Red Taq Polymerase	Vermehrung der cDNA	Sigma
<i>KpnI</i>	Restriktionsenzym	NEB
<i>NotI</i>	Restriktionsenzym	NEB
<i>CIP</i>	Alkalische Phosphatase, Verhinderung Vektor-Re-Ligation	NEB
T4 DNA Ligase	Re-Ligation Vektor und Fragment	NEB

4.1.8 Puffer, Lösungen und Gele

Tabelle 4-8: PCR-Puffer

PCR-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Lysepuffer	1 ml RLT	Qiagen
	0,01% β-Mercaptoethanol	Sigma

Material und Methoden

PCR-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
TAE Puffer, pH 8,0	4,84 g Tris Base	Sigma
	1,14 ml Eisessig 100%ig	Merck
	2 ml EDTA 0,5 M	Roth
	A. bidest. ad 1000 ml	
Orange G	5 ml Glycerol	Sigma
	1 ml EDTA 0,5 M	Roth
	1 ml Orange G 2%ig	Sigma
	0,1 ml SDS (10% w/v)	Serva
	A. bidest. ad 50 ml	

Tabelle 4-9: ChIP-Puffer

ChIP-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Fixierlösung	40 ml Dulbeccos PBS	PAA
	1% Formaldehyd	Sigma
Neutralisationslösung	4,69 g Glycin	Serva
	Dulbeccos PBS ad 500 ml	PAA
RIPA Puffer	10 mM Tris; pH 7,5	Sigma
	150 mM Natriumchlorid	Roth
	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	1% Desoxycholat	Sigma
	1% SDS (10% w/v)	Serva
	1 mM EDTA	Roth
	1% Aprotinin	Sigma
High Salt Puffer	2 M Natriumchlorid	Roth
	10 mM Tris; pH 7,5	Sigma
	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	0,5% Desoxycholat	Sigma
	1 mM EDTA	Roth
TE-Puffer	10 mM Tris; pH 7,5	Sigma
	1 mM EDTA	Roth
Eluierungspuffer	TE-Puffer	
	1% SDS (10% w/v)	Serva

Tabelle 4-10: PCR-Gel

PCR-Gel	Zusammensetzung	Hersteller
	TAE Puffer	
	1,5% Agarose	Promega
	0,4 µg/ml Ethidiumbromid	Invitrogen

Tabelle 4-11: Western blot-Puffer

Western blot-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphoprotein- waschpuffer	5 ml Natriumorthovanadat 98%ig	Sigma
	200 mM	
	50 ml Natriumpyrophosphat	Sigma
	150 mM	
Lyse-Puffer zur Gesamtproteinextraktion und zur Extraktion von Kernproteinen	50 ml Natriumfluorid 99%ig 1 M Sigma	
	Dulbeccos PBS 1 x ad 500 ml	PAA
	50 mM Tris-HCl, pH 7,4	Sigma
	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	1 mM PMSF	Sigma
	je 10 µg/ml Antipain, Leupeptin, Pepstatin	Sigma
	0,25 mM EDTA	Roth
Phosphoproteinwaschpuffer ad 1 ml		
Lyse-Puffer zur Extraktion zytosolischer Proteine	1,5 mM MgCl ₂	Sigma
	10 mM KCl	Merck
	1% Nonidet® P-40 99%ig	Fluka
	1 mM DTT	Serva
	Phosphoproteinwaschpuffer ad 1 ml	
Bradford Reagenz	20% BioRad Protein Assay 80% A. bidest.	BioRad
Gelladepuffer (Blaupuffer)	1 ml Tris-HCl, 0,5 M, pH 6,8	Sigma
	0,8 ml Glycerol	Sigma
	1,6 ml SDS (10% w/v)	Serva
	0,4 ml Bromphenolblau (1% w/v)	Biotech Pharmacia
	0,4 ml β-Mercaptoethanol (1% v/v)	Sigma
	A. bidest. ad 5 ml	
Gelelektrophoresepuffer	3 g Tris-Base	Sigma
	14,4 g Glycin	Merck
	1 g SDS (10% w/v)	Serva
	A. bidest. ad 1000 ml	
Blotpuffer	3 g Tris-Base	Sigma
	14,4 g Glycin	Merck
	20% Methanol	Merck
	A. bidest. ad 1000 ml	
Blockpuffer	50% Ody Blocking Buffer	LI-COR
	50% Dulbeccos PBS 1 x	PAA

Material und Methoden

Western blot-Puffer	Zusammensetzung	Hersteller
Ponceau-S-Proteinfärbung	1 g Ponceau S	Sigma
	50 ml Essigsäure 100%ig	Merck
	A. bidest. ad 1000 ml	

Tabelle 4-12: Western blot-Gele

Western blot-Gele	Zusammensetzung	Hersteller
Sammelgel	2,5 µl Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Sigma
	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	1,33 ml 40%iges Bis-Acrylamid	Serva
	10 µl TEMED	R&D Systems
	40 µl Ammoniumpersulfat 10%ig	Serva
	A. bidest. ad 10 ml	
Trenngel 10 %ig	2,5 ml Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Sigma
	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	3,35 ml 40%ige Bis-Acrylamid	Serva
	5 µl TEMED	R&D Systems
	50 µl Ammoniumpersulfat 10%ig	Serva
	A. bidest. ad 10 ml	

4.1.9 Primer, small interfering RNAs (siRNAs) und Plasmide

Alle verwendeten PCR-Primer wurden bei TIB MOLBIOL bestellt.

Tabelle 4-13: PCR-Primer-Sequenzen und Hybridisierungstemperatur für semiquantitative PCR

Gen		Sequenz	Hybridisierungstemperatur
IFNβ	vorwärts	5'-gCTCTCCTgTTgTgCTTCTCCAC	66°C
	rückwärts	5'-CAATAgTCTCATTCCAgCCAgTgC	
IFNβ-Promotor	vorwärts	5'-gAATCCACggATACAgAACCT	58°C
	rückwärts	5'-TTgACAACACgAACAgTgTCg	
IRF3	vorwärts	5'-TACgTgAggCATgTgCTgA	64°C
	rückwärts	5'-AgTgggTggCTgTTggAAAT	
IPS-1	vorwärts	5'-ATgCCgTTTgCTgAAgAC	61°C
	rückwärts	5'-CTAgTgCAgACgCCgCCg	
RIG-I	vorwärts	5'-TCCTTTATgAgTATgTgggCA	62°C
	rückwärts	5'-TCgggCACAgAATATCTTTg	
MDA5	vorwärts	5'-TCCTggTTgCTCACAgTggTT	62°C
	rückwärts	5'-gAgACAAGgCAAATCTAAgCC	

Material und Methoden

Nod5	vorwärts	5'-TTCACCCACCTTCATgTTCA	58°C
	rückwärts	5'-TAATgCgATCACCATCCCAA	
Nod27	vorwärts	5'-TgggAAgACACTCAggCTAA	63°C
	rückwärts	5'-ATCATCgTCCTCACAgAggTT	
Naip	vorwärts	5'-AgCCTAATCCTCTTTggTgCC	62°C
	rückwärts	5'-TgCACCTCCCACAgCTgATT	
ASC	vorwärts	5'-ATgCgCTggAgAACCTgA	62°C
	rückwärts	5'-AggTAggACTgggACTCCCTTA	
lpaf	vorwärts	5'-TCTgACTgACAgCTTgggTAA	64°C
	rückwärts	5'-TgggACCTCCTCCAAATgTT	
PIDD	vorwärts	5'-TgAgCTTggACCTgTACCC	59°C
	rückwärts	5'-TgTCCAgCAgATTCTgAgAgA	
IL-8	vorwärts	5'-CTAggACAAGAgCCAggAAgA	60°C
	rückwärts	5'-AACCTCTCTgCACCCAg TTTTC	
GAPDH	vorwärts	5'-CCACCCATggCAAATTCC ATggCA	60°C
	rückwärts	5'-TCTAgACggCAggCAggTCAggTCCACC	

Tabelle 4-14: PCR-Primer/Sequenzen und Hybridisierungstemperatur für quantitative PCR

Gen		Sequenz	Hybridisierungstemperatur
IFN β	vorwärts	5'-AAACTCATgAgCAgTCTgCA	65°C
	rückwärts	5'-AggAgATCTTCAgTTTCggAgg	
S9	vorwärts	5'-ATCCgCCAgCgCCATA	60°C
	rückwärts	5'-TCAATgTgCTTCTgggAATCC	

Tabelle 4-15: Sonstige Primer

Weitere Primer	Verwendungszweck	Hersteller
Random Hexamer Primer	Reverse Transkriptase	Promega

Tabelle 4-16: siRNA-Sequenzen

siRNA		Sequenz	Hersteller
Kontrolle	vorwärts	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	MWG
	rückwärts	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA	
IRF3	vorwärts	5'-GGAGGAUUUCGGAUUCUUCTT	Ambion
	rückwärts	5'-GAAGAUUCCGAAAUCCUCCTG	

Material und Methoden

IPS-1a	vorwärts	5'-UAGUUGAUCUCGCGGACGATT	MWG
	rückwärts	5'-UCGUCCGCGAGAUAACUATT	
IPS-1b	vorwärts	5'-CCACCUUGAUGCCUGUGAATT	MWG
	rückwärts	5'-UUCACAGGCAUCAAGGUGGTT	
RIG-I	vorwärts	5'-GCAGGAUUCGAUGAGAUUGTT	Ambion
	rückwärts	5'-CAAUCUCAUCGAAUCCUGCTG	
MDA5	vorwärts	5'-GGAGCAGAUUCAGAUUCAGAGGACATT	Ambion
	rückwärts	5'-UGUCCUCUGAAUCUGCUCCTT	
Nod1	vorwärts	5'-GGUUCUUUCGAGAAUGGACTT	Ambion
	rückwärts	5'-GUCCAUUCUCGAAAGAACCTC	
Nod2	vorwärts	5'-GGAAUUACCAGUCCCAUUGTT	Ambion
	rückwärts	5'-CAAUGGGACUGGUAUUUCCTG	
Nod5	vorwärts	5'-GUUAUUCUAAAGGAGACCTT	Ambion
	rückwärts	5'-GGUCUCCUUUAGGAAUAACTT	
Nod27	vorwärts	5'-GCAGACAGGCUAUGCUUUUCTT	Ambion
	rückwärts	5'-GAAAGCAUAGCCUGUCUGCTG	
Naip a	vorwärts	5'-GGUCUUUGGCAACUUGAAC	Ambion
	rückwärts	5'-GUUCAAGUUGCCAAAGACC	
Naip b	vorwärts	5'-GGAGGUAAAAUGAGGUACCTT	Ambion
	rückwärts	5'-GGUACCUCAUUUUACCUCCTT	
ASC	vorwärts	5'-GAUGCGGAAGCUCUUCAGUTT	MWG
	rückwärts	5'-ACUGAAGAGCUUCCGCAUCTT	
lpaf	vorwärts	5'-GGUUCAAGCCAAAGUAUAATT	Ambion
	rückwärts	5'-UUAUACUUUGGCUUGAACCTT	
PIDD	vorwärts	5'-CAGACUGUCCUGACCUCAGA	MWG
	rückwärts	5'-UCUGAGGUCAGGAACAGUCUG	

Tabelle 4-17: Plasmide

Plasmid	Merkmale	Quelle
pcDNA 3.1 TM /myc-His A	5,5 kb Vektor; Amp ^R , Neo ^R , ori SV40	Invitrogen
IRAKp961A1050Q	7,8 kb Vektor; Amp ^R , ori pUC	RZPD
plpaf	8,8 kb Vektor; Amp ^R , Neo ^R , ori SV40	diese Arbeit
hNaip in pCMV6-XL5 (TrueClone TM)	10,3 kb Vektor; Amp ^R , ori SV40	OriGene
mNaip5 A/J	9,9 kb Vektor; Amp ^R , Neo ^R , ori SV40	Drs. Zamboni und
mNaip5 C57BL/6	9,9 kb Vektor; Amp ^R , Neo ^R , ori SV40	Roy, Yale University

4.1.10 Primäre und sekundäre Antikörper Western blot , CHIP und Konfokalmikroskopie

Tabelle 4-18: Primäre Western blot –Antikörper und CHIP-Antikörper

Primäre Antikörper	kDa	Spezies	Konzentration Western blot/CHIP	Hersteller
anti-IRF3	50	Maus	1 : 1000 / 1 : 35	Santa Cruz
anti-p65	65	Maus	1 : 1000 / 1 : 35	Santa Cruz
anti-Polymerase II		Kaninchen	1 : 35	Santa Cruz
anti-Ipaf	110	Kaninchen	1 : 1000	ProSci
anti-Naip	160	Kaninchen	1 : 1000	Biozol
anti-COX-2	75	Ziege	1 : 1000	Santa Cruz
anti-p38	38	Maus	1 : 1000	Santa Cruz
anti-USF2	44	Kaninchen	1 : 1000	Santa Cruz
anti-Akt	60	Kaninchen	1 : 1000	Cell Signaling
anti-FAK	125	Maus	1 : 1000	Upstate

Tabelle 4-19: Sekundäre Western blot-Antikörper

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	1 : 2000	LI-COR
Anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an IRDye800	1 : 2000	LI-COR
Anti-Ziege-IgG	Esel, gekoppelt an IRDye800	1 : 2000	LI-COR

Tabelle 4-20: Primäre Antikörper für Konfokalmikroskopie

Primäre Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
anti- <i>Legionella pneumophila</i>	Maus	1 : 500	Abcam

Tabelle 4-21: Sekundäre Antikörper für Konfokalmikroskopie

Sekundärer Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller
Alexa Fluor 488 Anti-Maus-IgG	Ziege	1 : 8000	Invitrogen

4.1.11 Geräte

Die in Laboratorien standardmäßig eingesetzten Geräte wie Reinraumwerkbänke, Kühlgeräte, Inkubatoren, Schüttler, Eismaschinen usw. werden in dieser Arbeit nicht extra aufgeführt. Sie entsprechen alle den gängigen Standards und werden regelmäßig gewartet.

Tabelle 4-22: Speziell verwendete Geräte

Produkt	Verwendungszweck/Methode	Hersteller
BioRad Gelelektrophorese System	Gelelektrophorese (Western blot)	BioRad
BlotSystem	Proteintransfer (Western blot)	Transblot
CAMEDIA C-4040 200M	Digitalkamera (PCR)	Olympus
Ethidiumbromidfilter	Aufsatz für Olympus Kamera (PCR)	
FFX-20M GIBCO BRL UV Transluminator	Darstellung der Banden im PCR Gel	Life Technologies™
Gelhalterungssystem	Vorrichtung zum Gießen der Gele (PCR)	BioRad
Gießvorrichtung	Einspannen der Glasplatten (Western blot)	BioRad
Odyssey Scanner	Dokumentation (Western blot)	LI-COR
Platereader	Auslesen der ELISA Platten	STL
Polymax 1040	Schwenken der Blotmembranen (Western blot)	Heidolph Instruments
PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Durchführung der RT-PCR	MJ Research
LightCycler®	Durchführung der Real-Time PCR	Roche Applied Science
RCT basic	Magnetrührer (Western blot)	Ika-Labortechnik
Thermomixer Comfort	Erhitzen der Proteine auf 95 °C (Western blot)	Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifizierung Zelllysate (ChIP)	Bandelin
LSM5 Pascal	Konfokalmikroskopie	Zeiss
Nucleofector™	siRNA und cDNA Transfektion	Amaxa

4.1.12 Verbrauchsmaterialien

Allgemein verwendete Materialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und ähnliches entsprechen den gängigen Standards und werden hier nicht extra aufgeführt.

Tabelle 4-23: Speziell verwendete Verbrauchsmaterialien und Substanzen

Produkt	Verwendungszweck	Hersteller
dNTP Mix	DNA-Bausteine (RT-PCR)	Promega
Hybond Membran	Proteintransfer (Western blot)	Santa Cruz
Quarzglasküvetten	RNA- und Plasmid DNA-Messung	Hellma
Recombinant Protein Molecular weight marker	Standard zur Größenbestimmung eines Proteins im Western blot	Amersham life science
Thermowell™ Tubes 0,5 ml	DNase und RNase freie Reaktionsgefäße (RT-PCR)	Costar®
Whatman Filterpapier	Proteintransfer (Western blot)	Whatmann
RNAse A	RNA-Abbau (ChIP)	Sigma
Proteinase K	Protein-Abbau (ChIP)	Merck
Protein Agarose A und G	Immunpräzipitation	Upstate
PFA	Zellfixation	Merck
Triton	Zellpermeabilisierung	Sigma
Phalloidin	Färbung des Aktins	Invitrogen
Perma Fluor	Eindeckelmedium	Beckmann Coulter
Ficoll-Pacque Plus™	Generierung primärer Makrophagen	Amersham Bioscience

4.2 Methoden

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten oder sterilfiltrierten Lösungen.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

4.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung der A549 Zellen

Eine Subkultivierung der humanen Alveolar Typ II Zelllinie (A549 Zellen) erfolgte nach Ausbildung eines Monolayers in den Zellkulturflaschen (T₇₅). Dafür wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, zum Ablösen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro T₇₅-Flasche bedeckt und für 3 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Lösen der Zellen durch leichtes Klopfen an der T₇₅ wurden sie in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur und 172 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellpellet in 40 ml Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:4 in Zellkulturflaschen zur weiteren Zellkultivierung ausgesät.

Die Aussaat der A549 Zellen für Versuche erfolgte je nach Versuchsaufbau in T₇₅ bzw. Kulturschalen, in denen die Zellen bis zur Ausbildung eines Monolayers subkultiviert und für Western blot-, PCR-, ChIP-, ELISA- oder Vermehrungsversuche infiziert bzw. stimuliert wurden. Das Zellkulturmedium wurde alle 3 Tage gewechselt.

Für die Konfokalmikroskopie wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Loch-Zellkulturschalen ausgesät und nach drei Tagen infiziert.

4.2.1.2 Kultivierung und Subkultivierung der THP-1 Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bis zur Subkultivierung alle 3-4 Tage. Dafür wurde das Zellkulturmedium samt Suspensionszellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei Raumtemperatur und 172 g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 50 ml Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:5 in Zellkulturflaschen zur weiteren Zellkultivierung ausgesät und anschließend das Volumen in den Zellkulturflaschen mit Zellkulturmedium auf 30 ml aufgefüllt.

Für die Aussaat der humanen Monozyten und Ausdifferenzierung zu Makrophagen wurde dem Zellkulturmedium 100 ng/ml PMA zur Adhäsion der Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/Vertiefung einer 12-Loch-Zellkulturschale bzw. 2 x 10⁶ Zellen/Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturschale ausgesät. Ein Tag nach PMA-Gabe

wurde des Medium entfernt und durch neues Zellkulturmedium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte die Stimulation für Western blot-, PCR- oder Vermehrungsversuche.

Für die Konfokalmikroskopie wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Loch-Zellkulturschalen ausgesät und nach drei Tagen infiziert.

4.2.1.3 Generierung und Kultivierung primäre Makrophagen

Zur Isolation von PBMCs erfolgte die Auftrennung der Blutbestandteile des „Buffy Coats“ über eine Dichtegradientenzentrifugation. Bei dieser Methode werden die Blutbestandteile über einen Gradienten entsprechend ihrer Dichte in Fraktionen angereichert.

Dafür wurden 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Ficoll-Pacque Plus beschickt und mit je 20 ml 1:1 mit EDTA-Waschpuffer verdünntem Blut überschichtet. Nach Zentrifugation (800 g, 25 min, 20°C, ohne Beschleunigung und Bremse) wurde der Zellring der PBMCs mittels einer Pasteurpipette vorsichtig geerntet und anschließend in 25 ml EDTA-Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation 300 g, 10 min), um Reste von Ficoll und Erythrozyten aus der Präparation zu beseitigen. Thrombozyten wurden in zwei weiteren Waschschritten durch Zentrifugation bei 200 g für jeweils 5 min entfernt, da sie bei diesen Drehzahlen nicht sedimentieren, sondern im Überstand verbleiben. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades der PBMCs wurde anschließend erneut ein Ficoll-Pacque Plus (10 ml Ficoll-Pacque Plus + 1,4 ml PBS) mit den in EDTA-Waschpuffer aufgenommenen Zellen überschichtet und die Prozedur ein weiteres mal durchgeführt. Im letzten Schritt wurde das Zellpellet in PBS aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und anschließend sofort transfiziert (s. Kapitel transiente Transfektion). Die danach ausgesäten Zellen differenzierten durch Adhärenz als Stimulus zu Makrophagen (Akiyama et al., 1988; Andreesen et al., 1990; Musson, 1983) und wurden 5 Tage später infiziert bzw. zur Proteingewinnung lysiert. Ein Mediumwechsel fand alle 2 Tage statt.

4.2.1.4 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung beschrieben behandelt. 20 µl der Zellsuspension wurden auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Für jede Bestimmung wurden die Zellzahlen von jeweils 16 Kleinquadraten summiert, um die Zellzahl über einem Großquadrat zu erhalten. Alle Zellzahlbestimmungen wurden als Duplikate angelegt und die Mittelwerte errechnet. Aus der Zellzahl und dem Verdünnungsverhältnis wurde dann die Zellzahl pro ml Suspension wie folgt ermittelt:

$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl aus 2 Großquadraten}) / 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante} (10^4)$

4.2.1.5 Kryokonservierung

Beide Zelllinien wurden zur Kryokonservierung wie bei der Subkultivierung beschrieben behandelt. Nach der Abzentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml der jeweiligen Zelllinie

entsprechendem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt ($2 - 3 \times 10^5$ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden zunächst für 5 h auf -20°C und anschliessend für 15 h auf -80°C heruntergekühlt, um Schäden durch Kristallisationsprozesse beim Einfrieren zu vermeiden. Danach wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitaufbewahrung in Flüssigstickstoff (-196°C) umgelagert.

4.2.1.6 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad gegeben und bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmem Zellkulturmedium aufgenommen und 5 min bei 172 g sedimentiert. Das Zellpellet wurde in Zellkulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versorgt.

4.2.1.7 Transiente Transfektion von „*small interfering*“ RNA (siRNA) und Plasmid-DNA in eukaryotischen Zellen

Die transiente (ohne Selektionsdruck) Transfektion von eukaryotischen Zellen mit siRNA bzw. Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurde für die A549 und THP-1 Zellen der Nucleofector™ und Cell Line Nucleofector™ Kit V (Amaya Biosystems) verwendet. Für die Nukleofektion von $2 \mu\text{g}$ siRNA bzw. $1,5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA wurden 1×10^6 Zellen in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 172 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit $100 \mu\text{l}$ Nucleofector™ Solution V resuspendiert. Nach Zugabe der siRNA bzw. Plasmid-DNA wurde der Ansatz in eine Nucleofector™-Küvette gegeben und diese in den Nucleofector™ gestellt, um das jeweilige Programm (G-16 für A549 Zellen und T-08 für THP-1 Zellen) für die Elektroporation zu starten. Die Zellsuspension wurde nachfolgend in $1,5 \text{ ml}$ Reaktionsgefäße mit auf 37°C vorgewärmtem Zellkulturmedium gegeben und anschließend die benötigte Zellmenge auf Zellkulturplatten verteilt.

Für die Nukleofektion der primären Monozyten wurde der Human Monocyte Nucleofector™ Kit (Amaya Biosystems), $5 \mu\text{g}$ siRNA pro $1,5 \times 10^7$ Zellen und das Programm Y 01 verwendet.

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Bakterienkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten. Alle mit Bakterien in Kontakt getretenen Materialien oder Geräte wurden anschliessend mit Descosept (Dr. Schumacher

GmbH) desinfiziert. Materialien, welche mit den Bakterien in Kontakt getreten waren und bakterienhaltige Flüssigkeiten wurden im Anschluss autoklaviert.

4.2.2.2 Lagerung und Anzucht von *L. pneumophila*

Zur Gewinnung von Bakterienglycerolstöcken wurden die Legionellen auf BCYE Agarplatten ausgestrichen, 2 Tage in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37 °C mit 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % inkubiert und anschließend ein Teil der gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Watteträger in 1 ml Kryomedium enthaltende Kryoröhrchen eingebracht und bei –80 °C gelagert.

Aus diesen Kryostöcken wurden erneut Legionellen auf BCYE Agarplatten ausgestrichen, 2 Tage inkubiert und als Vorkulturplatten maximal 1 Monat bei 4°C gelagert. Alle Infektionen der Zellen mit den verschiedenen *L. pneumophila*-Stämmen erfolgten mit Legionellen, die 2 Tage vorher von einer Vorkulturplatte auf eine neue Agarplatte überführt und bis zum Infektionsbeginn im Brutschrank inkubiert wurden.

4.2.2.3 Infektion der Zellen mit *L. pneumophila*

Für die Infektion der Zellen wurden Legionellen mit einem sterilen Watteträger in 5 ml Stimulationsmedium überführt und die Konzentration mittels eines Spektralphotometers bei einer optischen Dichte von 660 nm ermittelt (OD₆₆₀ 0,3 entspricht 1 x 10⁸ cfu/ml). Die für die Infektionsversuche benötigten MOI („multiplicity of infection“) wurden durch 1:10 Verdünnungsreihen in dem Stimulationsmedium eingestellt. Für die Infektion wurde das auf den Zellen befindliche Medium abgesaugt und durch entsprechendes Volumen der Legionellensuspension ersetzt.

4.2.2.4 Vermehrungsversuche mit *L. pneumophila*

Unbehandelte oder siRNA-transfizierte (s. Kapitel Transfektion) Zellen wurden in 12-Loch-Zellkulturschalen ausgesät. Nach 3 Tagen wurden sie mit für den jeweiligen Versuch angezeigter Legionellenkonzentration infiziert, 30 min bei 37°C und 800 g zentrifugiert, um die Adhäsion und Aufnahme der Bakterien zu fördern und anschließend für weitere 1,5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 1 h Stimulationsmedium mit 50 µg/ml Gentamycin auf die Zellen gegeben, um die verbleibenden extrazellulären Bakterien abzutöten. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und zur weiteren Inkubation Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Dieser Zeitpunkt stellt den 0 h-Wert dar. Nach Ablauf der angezeigten Zeitintervalle wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml A. dest 10 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden im Anschluss verdünnt oder unverdünnt auf BCYE Agarplatten ausgestrichen, um nach 2 Tagen die Kolonie-bildenden-Einheiten („colony-forming units“ CFU) auszuzählen. Das

intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold).

Ein Teil der Zellen wurde 16 h vor der Infektion mit 1000 IU/ml rekombinantem IFN β (rIFN β) vorinkubiert. Diese Zellen wurden nach der Infektion (d.h. nach dem Zeitpunkt des 0 h-Wertes) erneut in Medium mit 1000 IU/ml rIFN β inkubiert.

4.2.2.5 Transformation und Vermehrung *Escherichia coli* (*E. coli*)

Herstellung kompetenter *E. coli*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte mit der CaCl₂-Methode. Zunächst wurde eine 5 ml-Vorkultur von dem *E. coli* Stamm *DH5 α* in LB-Medium über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler angezogen. 1 ml der Vorkultur wurde in 100 ml LB-Medium (Hauptkultur) gegeben und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 kultiviert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 6.000 g und 4°C wurde das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂ Lösung auf Eis resuspendiert, erneut zentrifugiert und nochmals in 2 ml 0,1 M CaCl₂ Lösung aufgenommen. Nicht direkt verwendete kompetente Bakterienzellen wurden mit Glycerin versetzt [Endkonzentration 25% v/v] und in 50 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

Transformation

Für die Transformation der Plasmide in *E. coli DH5 α* wurden 50 μ l der kompetenten Bakterienzellen mit 0,1 μ g Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 90 s bei 42°C schockerhitzt und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Der Ansatz wurde nun mit 800 μ l LB-Medium versetzt, für 1 h bei 37°C inkubiert, 3 min bei 6000 g zentrifugiert und der Überstand bis auf verbleibende 100 μ l LB-Medium abgesaugt. In diesen 100 μ l wurde das Zellpellet resuspendiert und der Ansatz auf LB-Selektionsagar (Antiinfektivum je nach Resistenzkodierung des Plasmids) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Antiinfektivum (je nach Resistenzkodierung des Plasmids, z.B. 50 μ g/ml Ampicillin) überführt. Die Vorkulturen wurden bis zum Zeitpunkt der deutlichen Trübung (ca. 6-8 h) des Mediums bei 37°C unter Schütteln kultiviert.

Für die Hauptkulturen wurden jeweils 100 μ l der Vorkulturen in 50 ml LB-Medium mit Antiinfektivum (z.B. 50 μ g/ml Ampicillin) gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 400 μ l der Vorkultur wurde mit 500 μ l sterilem 99 %igem Glycerol versetzt und dann bei -80°C gelagert. Bei erneutem Plasmidbedarf wurden die Vorkulturen aus diesem Glycerolstock angelegt, in dem mit einer sterilen Öse etwa stecknadelkopfgroße Teile in wiederum 5 ml des LB-Mediums überführt wurden.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Methoden zum Nachweis von mRNA

Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) / semiquantitative PCR

Aufreinigung der RNA

Die zu untersuchenden Zellen wurden nach dem Entfernen des Mediums mit 350 µl Lysepuffer lysiert und im Anschluss die RNA mittels des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Protokoll mit den im Kit enthaltenen Puffern isoliert.

Dabei wurden grobe Verunreinigungen des Zelllysates entfernt, die RNA über Filtersäulen mit Ethanol gefällt, in mehreren Waschschritten gereinigt und im Anschluss die im Filter haftende RNA mit RNase freiem Wasser aus dem Filter ausgewaschen. Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte in Quarzküvetten (198 µl A. tridest. + 2 µl RNA Probe) in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Der RNA-Gehalt wurde mit folgender Formel berechnet: $OD_{260} \times 4 = \text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$

Eine Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD_{260} (Optimum RNA Absorption) und OD_{280} (Optimum Protein Absorption) bestimmt werden. Als „rein“ wurden RNA- Proteinquotienten zwischen 1,7 und 1,9 angesehen.

Reverse Transkriptase Reaktion (RT Reaktion)

Pro Ansatz wurde 1 µg RNA mit A. bidest. auf ein Endvolumen von 10 µl verdünnt. Als Negativkontrolle diente das gleiche Volumen A. bidest. ohne RNA. Die Proben wurden nach Zugabe von je 1 µl dNTP [10mM] und 1 µl Hexamer-Primer [0,2 µg/µl] für 5 min bei 65°C im Thermal Cycler inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gestellt, 7 µl des Mastermix (4 µl M-MLV-Puffer [5 x], 2 µl DTT [0,1 M] und 1 µl RNAsin) hinzugegeben und die Proben für weitere 2 min bei 37°C im Thermal Cycler inkubiert. Anschließend wurde 1 µl M-MLV RT pro Ansatz dazugegeben. Die Reaktion erfolgte bei einer Inkubation für 50 min bei 37°C und wurde durch 15-minütiges Erhitzen auf 72°C beendet. Die cDNA wurde durch 80 µl A. bidest. verdünnt.

Nicht direkt für die Reverse Transkriptase verwendete RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

Nicht direkt für die PCR eingesetzte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion

Je Ansatz wurden 5 µl der mittels RT erhaltenen cDNA mit 20 µl des PCR Mastermixes (2,5 µl Ammonium PCR Puffer [10 x]; 0,5 µl dNTP [10 mM]; 0,25 µl Vorwärts-Primer [0,5 µg/µl]; 0,25 µl Rückwärts-Primer [0,5 µg/µl]; 15,5 µl A. bidest.; 1 µl RedTaq-Polymerase) vermengt. Die PCR im Thermal Cycler lief unter folgenden Konditionen: 1 min Denaturierung

bei 94°C, 1 min Hybridisierung bei primerspezifischer Hybridisierungstemperatur, 1 min Elongation bei 72°C und nach entsprechend häufiger Wiederholung dieses Zyklus abschließend 5 min Extension bei 72°C. Als Kontrolle wurde jeweils eine PCR mit den Primern für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Gen wird in eukaryonten Zellen konstant exprimiert („house keeping gene“). Gleich stark exprimierte GAPDH Banden zeugten für gleiche cDNA Konzentration in den verschiedenen Ansätzen.

Zum Auftragen der PCR Produkte wurde ein 1,5%iges PCR-Gel in eine Gelhalterung gegossen, welche mit Kämmen bestückt war, die als Platzhalter für 15 Geltaschen dienen. Zum Lösen der Agarose im TAE-Puffer wurde diese zuvor in einer Mikrowelle erhitzt. Die DNA wurde durch Elektrophorese bei einer Spannung von 100 V für 1 h aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Olympus Kamera mit vorgeschaltetem Ethidiumbromidfilter unter UV-Licht.

Real Time PCR / quantitative PCR (Q-PCR)

Lyse, Aufreinigung der RNA und Umschreibung in cDNA mit Reverser Transkriptase erfolgte wie bei der RT-PCR.

Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung der Real Time PCR wurde das SYBR-green DNA Amplification Kit (Roche Applied Science) verwendet. Je Ansatz wurden 2 µl der mittels RT erhaltenen cDNA mit 3 µl des PCR Mastermixes (0,5 µl DNA Master SYBRGreen I; 0,25 µl Vorwärts-Primer [10 µM]; 0,25 µl Rückwärts-Primer [10 µM]; 0,6 µl MgCl₂ [4mM]; 1,4 µl A. bidest) in LightCycler[®]-Glaskapillaren pipettiert, die anschließend 5 s bei 200 g zentrifugiert wurden. Die PCR im LightCycler[®] lief unter folgenden Konditionen: 10 s Denaturierung bei 95°C, 5 s Hybridisierung bei primerspezifischer Hybridisierungstemperatur, 10 s Polymerisation bei 72°C und nach 40facher Wiederholung des Zyklus 60 s abschließende Extension bei 72°C. Zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Mengen wurde jeweils eine PCR mit den Primern für S9 durchgeführt. Dieses Gen wird in eukaryonten Zellen konstant exprimiert („house keeping gene“). Alle Q-PCRs wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Methode des Second-Derivate-Maximum. Bei dieser Methode wird zur Bestimmung der Crossingpoints das Maximum der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve genutzt.

Die Schmelztemperatur der entstandenen PCR Produkte wurde mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgewertet. Dieser liegt eine Bewertung der Fluoreszenzintensität in Bezug zur Temperatur zugrunde. Mit steigender Temperatur sinkt die Intensität des

Fluoreszenzfarbstoffes auf Grund abnehmender Doppelstrang-DNA. Überschreitet die Temperatur die Schmelztemperatur der PCR-Produkte, so kommt es zu einem starken Abfall der Intensität. Damit ergibt sich aus der negativen ersten Ableitung der Schmelzkurve bei T_M ein Maximum. Diese Maxima sind abhängig von der Sequenz der PCR-Produkte. Damit können gewünschte von ungewünschten PCR-Produkten, wie z.B. Primer-Dimere, unterschieden werden.

4.2.3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den *E. coli* wurde das HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) eingesetzt. Alle benötigten Puffer sind in dem Kit enthalten und es wurde nach Protokoll vorgegangen.

Das nach Zentrifugation gewonnene Bakterienpellet wurde resuspendiert, lysiert, Proteine gefällt und das Lysat über eine Filtersäule gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Filter ausgewaschen, mit Isopropanol präzipitiert und über einen neuen Filter erneut gewaschen und von letzten Flüssigkeitsresten befreit, bevor sie mit Elutionspuffer gewonnen wurde. Die Messung des DNA-Gehaltes wurde wie bereits bei der PCR-RNA Messung beschrieben durchgeführt und mit folgender Formel berechnet: $OD_{260} \times 5 = \text{DNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$

4.2.3.3 Umklonierung

Um die IpaF-kodierende Sequenz aus dem Plasmid IRAKp961A1050Q in den Vektor pcDNATM 3.1 zu klonieren, wurden beide mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *NotI* 1,5 h bei 37°C geschnitten. Der Ansatz des zu schneidenden Vektors pcDNATM 3.1 enthielt zur Dephosphorylierung und damit zur Vermeidung der Rezirkularisierung zusätzlich *CIP*. Die entstandenen Fragmente wurden nach Zugabe von Orange G (Farbschweremittel) elektrophoretisch aufgetrennt (s. Polymerase-Kettenreaktion RT-PCR) und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Protokoll mit den im Kit enthaltenen Puffern aufgereinigt.

Die DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten, das Gel anschließend aufgelöst, die enthaltene DNA mit Isopropanol gefällt und über eine Filtersäule mehrmals gewaschen, bevor die im Filter haftende DNA eluiert wurde.

Anschließend wurde das Fragment mit der IpaF-kodierende Sequenz mit pcDNATM 3.1 mittels T4 DNA Ligase im Verhältnis 3:1 (Messung des DNA-Gehaltes s.o.) 1,5 h bei Raumtemperatur ligiert und in kompetente *E. coli* transformiert (s. Kapitel Transformation).

4.2.4 Biochemische Methoden

4.2.4.1 Methode zum Nachweis von Proteinen

IFN β Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Messung von sekretiertem IFN β in den Zellkulturüberständen von über 24 h infizierten Zellen wurde der Human Interferon- β (Hu-IFN- β) ELISA Kit (PBL) verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

In die mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper beschichteten Vertiefungen einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden die Standardwerte und Proben pipettiert und gebundenes Antigen anschließend durch einen zweiten Antikörper detektiert. Mit diesem Antikörper verband sich das dann zugesetzte Enzym, welches nachfolgend zugegebenes Substrat enzymatisch umsetzte. Der daraus resultierende Farbumschlag war proportional zur Menge des gebundenen IFN β und konnte optisch gemessen werden. Überschüssiges Material zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils durch mehrmaliges Waschen entfernt. Die Auswertung erfolgte in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Zytotoxizitäts-Detektions-Assay

Zur Quantifizierung der Aktivität der durch zerstörte bzw. sterbende Zellen freigesetzten Laktat-Dehydrogenase (LDH) wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche Applied Science verwendet und nach Protokoll durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden in einer 96-Loch-Zellkulturplatte mit einem Substrat versetzt, das bei vorhandener LDH-Aktivität enzymatisch umgesetzt wurde. Der daraus resultierende Farbumschlag war proportional zur Menge der vorhandenen LDH und konnte optisch gemessen werden. Die Auswertung erfolgte in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm. Sämtliche Werte wurden auf die Totallyse (100% LDH-Aktivität) bezogen.

Western blot

Gesamtproteinextraktion

Von den zu untersuchenden Zellen wurde das Medium auf Eis abgesaugt und die Zellen zweimal mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde restlos abgesaugt, die Zellen mit Lysepuffer zur Gesamtproteinextraktion versetzt und mit Hilfe eines Plastikscharabers abgekratzt. Im Anschluss wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 4°C und 25000 g zentrifugiert. Die das Gesamtprotein enthaltenden Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Fraktionierte Extraktion von zytosolischen und Kernproteinen

Von den zu untersuchenden Zellen wurde das Medium auf Eis abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer wurde restlos

abgesaugt und die Zellen mit Lysepuffer zur Extraktion zytosolischer Proteine versetzt und mit Hilfe eines Plastischabers abgekratzt. Im Anschluss wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, der Ansatz 7 min auf Eis inkubiert und anschließend 3 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Die das zytosolische Protein enthaltenden Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und auf das verbleibende Pellet Lysepuffer zu Extraktion von Kernproteinen gegeben. Nach Durchmischung und 7-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 5 min bei 4°C und 25000 g zentrifugiert und die das Kernprotein enthaltenden Überstände wurden in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Das in dem Lysat vorhandene Protein wurde durch einen BioRad Protein-Assay nach Bradford quantifiziert. Dieses Verfahren nutzt die Tatsache, dass der Farbstoff Comassie Brilliant Blue sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verlagert, wenn er basische und aromatische Aminosäuren bindet. Nach 5-minütiger Inkubation von 5 µl der Proteinlösung in 995 µl der 1:5 verdünnten Farbstofflösung wurde die Absorption bei 595 nm gemessen, wobei eine Küvette mit 1 ml der 1:5 verdünnten Farbstofflösung ohne Protein zur Eichung des Spektralphotometers diente.

Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Proteine wurden auf ein 10%iges Gel aufgetragen.

Dafür wurden die Glasplatten in eine Gießvorrichtung eingespannt und zuerst das Trenngel und anschließend das Sammelgel gegossen, in welches Kämme eingeführt wurden, die als Platzhalter für 10 Geltaschen dienten. Danach wurden die Glasplatten mit den Gelen in die Elektrophoresekammer eingespannt, der Raum zwischen den Glasplatten mit Gelelektrophoresepuffer aufgefüllt und die Kämme vorsichtig gezogen.

Vor dem Auftragen der Proteine auf das Gel wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit Gel-ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C unter Schütteln erhitzt. Jeweils 80 µg Gesamtprotein bzw. Kernprotein wurde nach dem Abkühlen der Proben in die Geltaschen gegeben. Ein Proteinmarker lief zur Größenkontrolle in jedem Gel parallel mit. Die Kammern wurden mit Gelelektrophoresepuffer soweit aufgefüllt, dass die stromführenden Kabel von dem Puffer bedeckt waren. Die Proben liefen für 2 bis 3 h im Gel bei einer Spannung von 100 V.

Protein-blot

Das Gel wurde nach erfolgter Elektrophorese vorsichtig aus der Elektrophoresekammer entnommen und luftblasenfrei auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran aufgelegt. Um die Gel-Membranvorrichtung wurde ein Sandwich gebildet, in dem drei Blotpuffer-getränkte Lagen 3M-Whatman-Filterpapiere je Seite und die Blotvorrichtung gemäß Herstellerangaben verwendet wurden. Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in die Blotkammer eingesetzt und

zusammen mit eiskaltem Blotpuffer bei 100 V, 4°C für exakt 1 h geblottet. Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt. Anschließend wurde sie mit A. bidest. gewaschen, bis das Ponceau-S vollständig entfernt war.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran mit Blockpuffer über Nacht bei 4°C unter leichten Schwenkbewegungen inkubiert. Danach wurde sie über 5 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden primären Antikörper in Blockpuffer mit 0,1% Tween20-Zusatz inkubiert. Nach dreimaligem, jeweils 10-minütigem Waschen (PBS + 0,1% Tween20) wurde für 1 h bei Raumtemperatur ein gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteter sekundärer Antikörper eingesetzt. Die sekundären Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit PBS + 0,1% Tween20 und einmaliges Waschen mit PBS von der Blotmembran entfernt.

Die am primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit einem speziellen lasergestützten Detektionssystem (Odyssee Infrared Imaging System) detektiert und mit einer entsprechenden Software nach den Herstellervorgaben bearbeitet.

4.2.4.2 Methode zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen

Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Von in T₇₅ stimulierten A549 Zellen wurde jeweils nach Ablauf der Stimulationszeit das Medium abgesaugt und durch 10 ml warme Fixierlösung ersetzt. Das darin enthaltene Formaldehyd verhindert die Separation von DNA-gebundenen Proteinen von ihrer DNA-Sequenz. Alle folgenden Schritte wurden zum Schutz der Proteine auf Eis und mit 4°C kalten Substanzen durchgeführt. Nach Entfernen der Fixierlösung und Waschen mit Neutralisationslösung wurden die Zellen in PBS mit einem Schaber abgelöst, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 252 g und 4°C zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS und erneuter Zentrifugation wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml RIPA Puffer mit 20 µl Aprotinin zur Zelllyse resuspendiert. Zur Vorbereitung des Zelllysates für die Immunpräzipitation wurde es 4x 1 min sonifiziert (Zerkleinerung der DNA) und anschließend 20 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert (Entfernung der Zelltrümmer). Das Lysat wurde zu 250 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und nicht benötigte Aliquots bei -80°C weggefroren. Für die Immunpräzipitation wurden die jeweiligen primären Antikörper zu den Lysaten gegeben und über Nacht bei 4°C im Schüttler inkubiert. Mit Hilfe von Protein A und G wurde der Immunkomplex gebunden und anschließend zweimal mit RIPA Puffer, einmal mit High Salt Puffer, noch einmal mit RIPA Puffer und einmal mit TE-Puffer gewaschen (dazwischen jeweils Zentrifugation bei 20000 g und 4°C, nur letzter Schritt bei Raumtemperatur). Nach den Waschsritten wurden die

DNA-Protein Komplexe durch 15-minütige Inkubation bei 30°C mit 55 µl Eluierungspuffer und Abzentrifugation der Beads 1 min bei 20000 g von Protein A und G gelöst und 50 µl des Eluats mit 150 µl TE-Puffer vermischt. Zur Isolierung der DNA wurde das Eluat mit 1 µl RNase A 30 min bei 37°C und nach Zugabe von 5 µl Proteinase K zum Proteinverdau 6 h bei 37°C inkubiert und 6 h bei 65°C im Thermal Cycler verdaut. Die DNA wird mit Hilfe des PCR Purifications Kits (Qiagen) mit im Kit enthaltenen Puffern nach Protokoll aufgereinigt.

Dabei wurde die DNA mit Hilfe eines hoch konzentrierten Salzpuffers und Zentrifugation an die Membran einer Filtersäule gebunden, mehrmals gewaschen und anschließend mit Eluierungspuffer von dem Filter abgewaschen.

Die so isolierte DNA wurde mittels PCR analysiert (s. Kapitel PCR).

4.2.5 Konfokalmikroskopie

Die auf Glasplättchen in 24-Loch-Zellkulturschalen ausgesäten Zellen wurden nach Ablauf der Infektionszeit mit 3%igem PFA 20 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit 1%igem Triton 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach 30-minütigem Blocken mit 5%igem Ziegen Serum wurden die Legionellen mit einem spezifischen primären Antikörper angefärbt und dieser anschließend mit einem sekundären Antikörper detektiert. Zum Abschluss wurde das zelluläre Aktin mit Phalloidin für 30 min bei Raumtemperatur angefärbt. Zwischen allen Schritten, außer nach dem Blocken, erfolgte ein dreimaliges 5-minütiges Waschen mit PBS. Die so behandelten Präparate wurden auf Objektträger mit Eindeckelmedium verbracht, mit Nagellack versiegelt und bis zum Mikroskopieren bei 4°C gelagert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop (LSM5 Pacal) der Firma Zeiss und der dazugehörigen Software „AxioVision“.

4.2.6 Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des „One way ANOVA“ und dem Newman Keuls post Test oder des „Two way ANOVA“ und dem Bonferroni post Test. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Zur Erstellung der Diagramme und für die Berechnung der Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzen wurden die Programme Excel (Microsoft Excel ®) und PRISM5.0 (Graph Pad Prism ®) verwendet.

Die Abbildungen von Western blot, PCR und CHIP Analysen zeigen jeweils repräsentative Gele von wenigstens drei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen mit gleichem Ergebnis.

5 Ergebnisse

Obwohl sich Legionellen effizient in pulmonalen Epithelzellen replizieren (Gao et al., 1998b), sind deren Beitrag zum Verlauf der Infektion und dabei involvierte Signalwege weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden die molekularen Mechanismen der angeborenen Immunantwort auf eine *L. pneumophila*-Infektion in der pulmonalen Alveolarepithelzelllinie A549 näher untersucht.

5.1 Die *Legionella pneumophila*-induzierte IFN β -Produktion über IPS-1 und IRF3 in humanen Lungenepithelzellen beeinflusst die bakterielle Replikation

Aktuelle Untersuchungen weisen auf eine wesentliche Rolle der Typ I IFN bei Infektionen mit intrazellulären Bakterien hin (Auerbuch et al., 2004; Carrero et al., 2004; O'Connell et al., 2004; Schiavoni et al., 2004; Stockinger et al., 2002). Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob eine Infektion der humanen Lungenepithelzellen mit Legionellen zur Produktion von IFN β führt. Desweiteren sollten im ersten Teil dieser Arbeit Signalkaskaden sowie der Einfluss dieser Signalkaskaden bzw. vom produzierten IFN β auf die Legionellenvermehrung in den Epithelzellen untersucht werden.

5.1.1 *Legionella pneumophila* induziert die IFN β -Produktion in humanen Lungenepithelzellen *in vitro*

Zur Untersuchung des Einflusses von *L. pneumophila* auf Lungenepithelzellen wurden humane pulmonale Epithelzellen (A549 Zellen) mit Bakterien in unterschiedlichen MOI infiziert. Im Anschluß wurde zum Einen die IFN β -Produktion im Zellüberstand mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Immunoassays (ELISA) bestimmt und zum Anderen die IFN β -mRNA-Expression mit spezifischen Primern in der semiquantitativen RT-PCR untersucht. Zur Überprüfung gleicher RNA-Mengen in allen Reaktionen wurde zeitgleich eine PCR mit spezifischen Primern zum Nachweis der GAPDH angesetzt.

Die Abbildung 5.1-1 zeigt eine dosisabhängige IFN β -Produktion der A549 Zellen nach Infektion mit den *L. pneumophila* Wildtypstämmen 130b, JR32 und Corby (Serogruppe 1) (Abb. 5.1-1 A – C obere Teilbilder) und der Flagellin-defizienten Mutante von *L. pneumophila* Corby (Abb. 5.1-1 C oberes Teilbild) nach 24 h sowie eine dosisabhängige Induktion der IFN β -mRNA nach 7 h (Abb. 5.1-1 A-D untere Teilbilder). Bereits eine Stimulation mit einer MOI von 1 führte zu einer signifikanten Erhöhung ($p < 0,05$) der IFN β -Produktion, die bei einer MOI von 10 noch weiter zunahm. Im Gegensatz dazu kam es nach einer Infektion mit Typ IVB Sekretionssystem-defizienten *L. pneumophila* JR32 (Abb. 5.1-1 B) und hitzeinaktivierten *L. pneumophila* 130b (Abb. 5.1-1 D) nicht zu einer Steigerung der basalen IFN β -Expression.

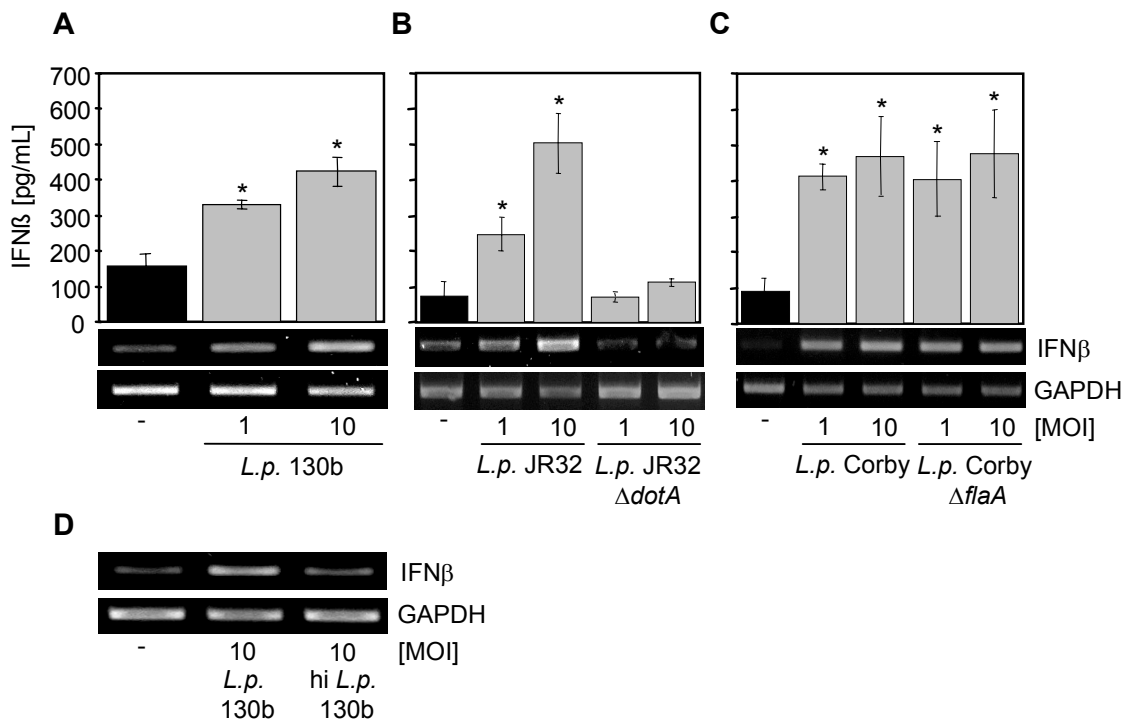


Abbildung 5.1-1 A – D: Dosisabhängige IFN β -Produktion von *L. pneumophila*-infizierten humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden mit den *L. pneumophila* (*L.p.*) Wildtypstämmen 130b (A), JR32 (B) und Corby (C) sowie einer Typ IVB Sekretionssystem-Deletionsmutante (*L.p.* JR32 $\Delta dotA$; B) und einer Flagellin-Deletionsmutante (*L.p.* Corby $\Delta flaA$; C) in unterschiedlichen MOIs infiziert. Nach 24 h bzw. 7 h wurden die IFN β -Konzentrationen in den Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert bzw. die IFN β - und GAPDH-Expressionen semiquantitativ mittels RT-PCR analysiert. Abbildung 5.1-1 D zeigt die semiquantitative Bestimmung der IFN β - und GAPDH-Expression nach Infektion von A549 Zellen mit dem Wildtypstamm *L.p.* 130b mit einer MOI von 10 oder mit einer gleichen Anzahl von hitzeinaktivierten Legionellen (hi *L.p.* 130b). Die hier abgebildeten Graphen zeigen Mittelwerte von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (\pm SEM). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

5.1.2 *Legionella pneumophila* induziert die IRF3-Aktivierung in humanen Lungenepithelzellen

Auf Grund des Wissens, dass die Expression von IFN α/β durch den Transkriptionsfaktor IRF3 kontrolliert wird (Barnes et al., 2002; Sakaguchi et al., 2003; Barnes et al., 2002) und der ersten Ergebnisse zur IFN β -Antwort von humanen Lungenepithelzellen nach *Legionella pneumophila*-Infektion, wurde im nächsten Schritt der mögliche Einfluß der Legionelleninfektion auf die IRF3-Aktivierung überprüft.

Dafür wurden A549 Zellen mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* 130b [MOI 10] unterschiedlich lange infiziert (30 min bis 240 min) und anschließend die Kerntranslokation von IRF3 im Western blot untersucht. Da die IRF3-Aktivierung einhergeht mit einer Kerntranslokation, ist die IRF3-Translokation ein Maß für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Lin et al., 1998).

In Abbildung 5.1-2 A ist zu sehen, dass die Infektion von A549 Zellen mit *L. pneumophila* 130b zeitabhängig zu einer nukleären Translokation und damit Aktivierung von IRF3 führte. IRF3 war bereits im Leerwert (unstimulierte A549 Zellen) schwach im Kern detektierbar. Nach Legionelleninfektion kam es zu einer nukleären Anreicherung von IRF3 bis zu einem Zeitraum von 240 min. Neben IRF3 translozierte auch die NF- κ B Untereinheit p65/RelA in den Kern Legionellen-infizierter Epithelzellen. Zur Kontrolle gleichmäßig eingesetzter Proteinmengen wurde auf derselben Membran mit einem spezifischen Antikörper das konstant im Kern exprimierte USF2 detektiert.

Für weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses von *L. pneumophila* auf diese Transkriptionsfaktoren, wurde ein ChIP Assay mit *ifn β* -Promotor-spezifischen Primern durchgeführt. Diese Technik ermöglicht den Nachweis einer Bindung von z.B. IRF3, NF- κ B und der Polymerase II an den endogenen *ifn β* -Promotor. A549 Zellen wurden mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] unterschiedlich lange infiziert (30 bis 240 min) und die Zelllysate mit IRF3, p65 und RNA Polymerase II Antikörpern immunopräzipitiert. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der an diesen Präzipitaten gebundenen DNA-Sequenzen mittels *ifn β* -Promotor-spezifischen Primern in der RT-PCR.

Wie in Abbildung 5.1-2 B dargestellt, führte die Infektion mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] zur temporären Bindung von IRF3 und p65 an den *ifn β* -Promotor. Die Bindung von IRF3 war bereits nach 30 min zu sehen und zeigte nach 60 min ihre stärkste Ausprägung. p65 wurde nach 30 min und insbesondere nach 60 min an den *ifn β* -Promotor rekrutiert, danach war bis zum letztgemessenen Zeitpunkt von 240 min keine Bindung über Leerwert-Niveau mehr nachweisbar. Die Rekrutierung der RNA Polymerase II an den *ifn β* -Promotor nach 60 min indizierte die stattfindende Gentranskription. Zur Kontrolle, dass gleiche Mengen Zelllysate/Gesamt-DNA eingesetzt wurden, wurde der *ifn β* -Promotor vom DNA-Protein-Komplex vor der Immunpräzipitation amplifiziert (Input).

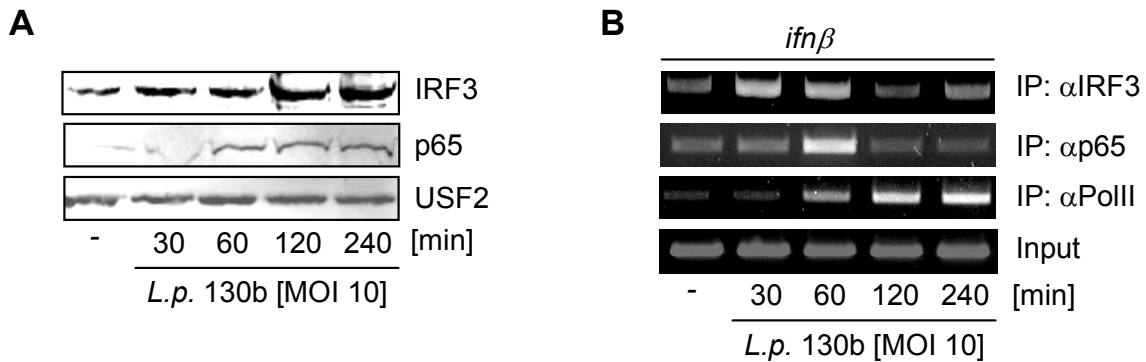


Abbildung 5.1-2 A – B: *L. pneumophila* induziert eine IRF3- und p65-Kerntranslokation und *ifnβ*-Promotorbindung in humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* (*L.p.*) 130b [MOI 10] für 30 min, 60 min, 120 min und 240 min infiziert und anschließend (A) die Kernextrakte mittels Western blot mit spezifischen Antikörpern bzw. (B) die Lysate mit einem ChIP Assay und anschließender Amplifikation des *ifnβ*-Promotors mittels RT-PCR untersucht. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde im Western blot das konstant im Kern exprimierte Protein USF2 detektiert. Als Nachweis der gleichmäßig eingesetzten DNA-Mengen im ChIP Assay wurde der *ifnβ*-Promotor vor der Immunpräzipitation im Gesamtzelllysate amplifiziert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

5.1.3 Die *L. pneumophila*-induzierte IFN β -Expression ist IRF3-abhängig

Nachdem die Aktivierung und *ifnβ*-Promotorbindung von IRF3 in humanen Lungenepithelzellen nach Legionelleninfektion gezeigt werden konnte, wurde als nächstes mit Hilfe von RNAi- („RNA interference“) Experimenten untersucht, ob IRF3 tatsächlich eine essentielle Bedeutung für die *L. pneumophila*-induzierte IFN β -Expression hat.

Hierfür wurden A549 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer IRF3 siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] für 7 h infiziert und sowohl eine quantitative Q-PCR als auch eine semiquantitative RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Zur Überprüfung der gleichmäßig eingesetzten Gesamtmenge an mRNA in den verschiedenen Ansätzen bei der RT-PCR wurde zeitgleich eine PCR zum Nachweis der GAPDH angesetzt. Bei der Q-PCR wurde die IFN β -mRNA normalisiert im Verhältnis zur S9-mRNA und die mit Kontroll siRNA transfizierten und mit *L. pneumophila* 130b stimulierten Werte gleich 100% gesetzt.

Wie Abbildung 5.1-3 zeigt, induzierte die Infektion mit *L. pneumophila* 130b die IFN β -Expression in den mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen. Die IRF3-spezifische siRNA inhibierte die *L. pneumophila*-aktivierte IFN β -Induktion signifikant ($p < 0,05$). Um zu kontrollieren, dass die verwendete siRNA spezifisch wirkte, wurde die mRNA-Expression von IL-8 mittels RT-PCR überprüft. IL-8 stellt ein hauptsächlich NF- κ B-reguliertes, nicht jedoch

IRF3-abhängiges Gen dar (Mukaida et al., 1990). Wie in der Abbildung zu sehen ist, wurde die Legionellen-induzierte IL-8-Genexpression durch die verwendete IRF3 siRNA nicht beeinflusst. Als weitere Kontrolle wurde die mRNA-Expression von IRF3 und der IRF3 siRNA-spezifische „knock-down“ von IRF3 dargestellt.

Zusammenfassend zeigte dieser Versuch, dass die Legionellen-infizierten Lungenepithelzellen IRF3-abhängig IFN β exprimierten, wohingegen die Legionellen-induzierte IL-8-Expression IRF3-unabhängig verlief.

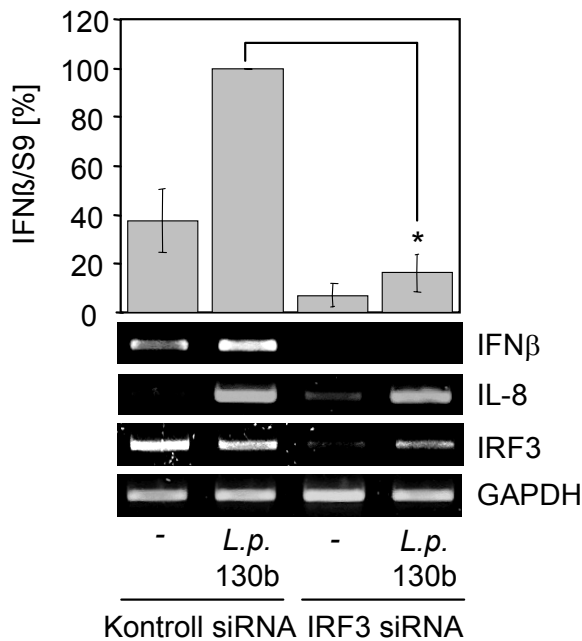


Abbildung 5.1-3: Untersuchung der Rolle von IRF3 bei der *L. pneumophila*-induzierten IFN β -Expression.

A549 Zellen wurden mit Kontroll siRNA und spezifischer IRF3 siRNA transfiziert und 72 h später mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* (*L.p.*) 130b [MOI 10] infiziert. Nach 7 h wurde die IFN β -Expression quantitativ und semiquantitativ und die IL-8-, IRF3- und GAPDH-Expression semiquantitativ bestimmt.

Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für insgesamt drei unabhängige Experimente, der Q-PCR-Graph zeigt Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

5.1.4 Die *L. pneumophila*-induzierte IFN β -Expression ist IPS-1-abhängig

IPS-1 (MAVS/VISA/Cardif) ist das entscheidende Adaptermolekül in den RIG-I- und MDA5-abhängigen Signalwegen, die u.a. zur IRF3-Aktivierung führen (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Mit dem Wissen, dass in der TLR-Familie verschiedene TLRs über ein gemeinsames Adaptermoleküle ihre Signaltransduktion vermitteln (Beutler, 2005; Kawai and Akira, 2005), schien es möglich, dass IPS-1 auch (möglicherweise RIG-I- und MDA5-unabhängige) Signalkaskaden vermittelt, die bei der Legionellen-induzierten IFN β -Antwort eine Rolle spielen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden A549-Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit zwei unterschiedlichen, bereits in den initialen Publikationen zu IPS-1/MAVS verwendeten, IPS-1 siRNAs transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] für 7 h infiziert. Anschließend wurde die IFN β -mRNA-Expression in einer quantitativen Q-

PCR und semiquantitativen RT-PCR überprüft. Zur Kontrolle der gleichmäßig eingesetzten Gesamtmenge an mRNA in den verschiedenen Ansätzen bei der RT-PCR erfolgte zeitgleich eine PCR mit spezifischen Primern zum Nachweis der GAPDH. Bei der Q-PCR wurde die IFN β -mRNA normalisiert im Verhältnis zur S9-mRNA und die Werte, welche Kontroll-siRNA-transfizierte und *L. pneumophila* 130b-infizierte Zellen repräsentierten gleich 100% gesetzt.

Abbildung 5.1-4 zeigt, dass die Infektion mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] die IFN β -Expression in den mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen induzierte und beide IPS-1 siRNA-Sequenzen (IPS-1a und IPS-1b) diese IFN β -Induktion signifikant ($p < 0,05$) inhibierten. Um zu kontrollieren, dass die verwendete siRNA spezifisch wirkte, wurde die mRNA-Expression von IL-8 mittels RT-PCR überprüft. Wie in der Abbildung zu sehen ist, wurde die Legionellen-induzierte IL-8-Genexpression durch die verwendeten IPS-1 siRNAs nicht beeinflusst. Als weitere Kontrolle wurde die mRNA-Expression von IPS-1 und der IPS-1 siRNA-spezifische „knock-down“ von IPS-1 dargestellt.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass Legionellen-infizierte Lungenepithelzellen IPS-1-abhängig IFN β , jedoch IPS-1-unabhängig IL-8 induzierten.

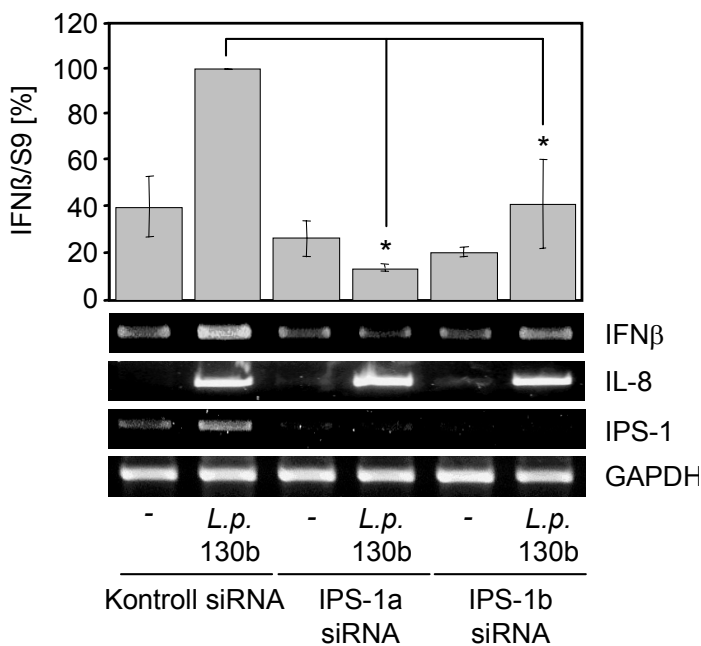


Abbildung 5.1-4: Untersuchung der Rolle von IPS-1 bei der *L. pneumophila*-induzierten IFN β -Expression.

A549 Zellen wurden mit Kontroll siRNA und zwei verschiedenen IPS-1 siRNAs transfiziert und nach 72 h mit Wildtyp *L. pneumophila* (*L.p.*) 130b [MOI 10] für 7 h infiziert. Im Anschluß wurde die IFN β -Expression semi- und quantitativ und die IL-8-, IRF3- und GAPDH-Expression semiquantitativ bestimmt. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für insgesamt drei unabhängige Experimente, der Q-PCR-Graph zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten, die in Doppelwerten durchgeführt wurden.

5.1.5 Die *L. pneumophila*-induzierte IFN β -Expression ist RIG-I-, MDA5-, ASC-, Nod5-, Nod27-, PIDD- und Naip-unabhängig

Das Adaptermolekül IPS-1 kann mit seiner CARD-Domäne mit den übergeordnet lokalisierten, ebenfalls CARD-Domänen enthaltenden Rezeptormolekülen RIG-I und MDA5 interagieren (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). In ähnlicher Weise interagiert das TLR-Adaptermolekül MyD88 mit seiner TIR-Domäne mit den übergeordnet lokalisierten TLRs. Da in den vorherigen Versuchen gezeigt werden konnte, dass IPS-1 die Legionellen-induzierte IFN β -Expression vermittelt, schien es möglich, dass das stromaufwärts von IPS-1 liegende putative Legionellen-erkennende und IFN β -induzierende PRR-Molekül oder ein zwischengeschaltetes Adaptermolekül ebenfalls eine CARD-Domäne besitzt.

Um mögliche Rezeptoren oder Adaptermoleküle mit CARD-Domänen bzw. Rezeptoren, die mit CARD-enthaltenden Adaptermolekülen interagieren, zu finden, wurde eine Suche in der Pfam Datenbank (Finn et al., 2006) und in publizierten Arbeiten (Martinon and Tschopp, 2005) durchgeführt. Ein Teil der dabei identifizierten Moleküle wurde nachfolgend auf ihre Rolle bei der IFN β -Antwort auf *L. pneumophila* hin untersucht. Dafür wurden A549 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit jeweils spezifischer siRNA gegen RIG-I, MDA5, ASC, Nod27, Nod5, PIDD oder Naip transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit *L. pneumophila* 130b [MOI 10] für 7 h infiziert und die IFN β -Expression mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle wurde erneut die GAPDH-Expression bestimmt.

Die Abbildungen 5.1-5 A – G zeigen, dass die *L. pneumophila* 130b-Infektion die IFN β -Expression in den mit Kontroll siRNA transfizierten Zellen induzierte. Darüber hinaus war in den mit spezifischer siRNA gegen RIG-I, MDA5, ASC, Nod5, Nod27, PIDD und Naip transfizierten Zellen eine Induktion der IFN β -Expression zu sehen, die mit der in den Kontrollzellen vergleichbar war. Um zu kontrollieren, dass die verwendeten siRNAs zu einem „knock-down“ ihrer Zielgene führten, wurde die Expression der untersuchten Gene jeweils mit spezifischen Primern mittels RT-PCR überprüft (Abb. 5.1-5 A – G).

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass RIG-I, MDA5, ASC, Nod5, Nod27, PIDD und Naip bei der IPS-1-abhängigen IFN β -Expression in Legionellen-infizierten Epithelzellen nicht von Bedeutung zu sein schienen.

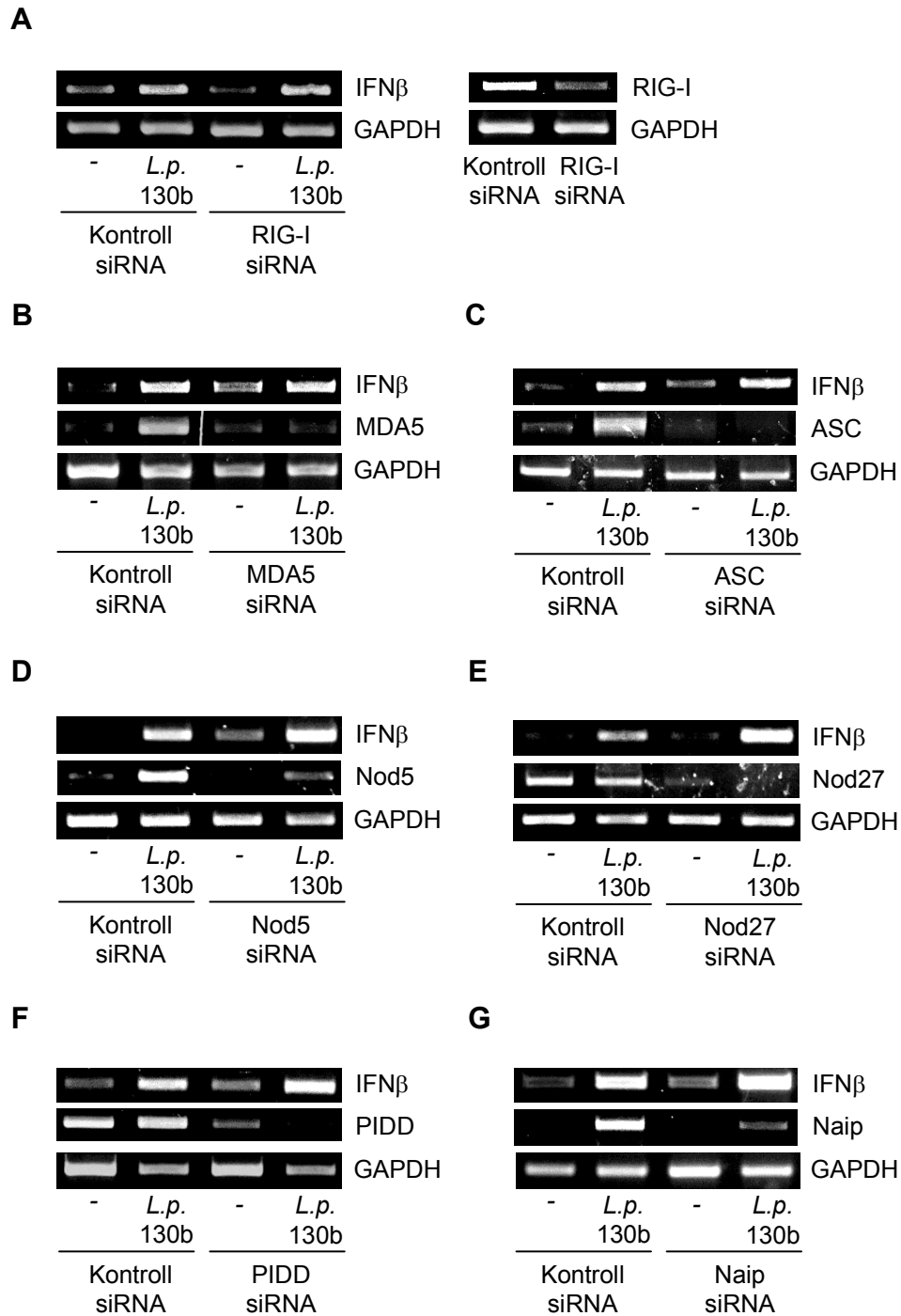


Abbildung 5.1-5 A - G: Untersuchung der Rolle von RIG-I (A), MDA5 (B), ASC (C), Nod5 (D), Nod27 (E), PIDD (F) und Naip (G) bei der *L. pneumophila*-induzierten IFNβ-Expression.

A549 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder spezifischer siRNA gegen RIG-I, MDA5, ASC, Nod5, Nod27, PIDD oder Naip transfiziert und 72 h später mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* (*L.p.*) 130b [MOI 10] für 7 h infiziert. Nachfolgend wurde die IFNβ- und GAPDH-Expression sowie die Expression des jeweiligen Zielgens der siRNA semiquantitativ bestimmt. Die dargestellten RT-PCR-Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

5.1.6 IFN β reguliert negativ die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Legionellen-infizierte Lungenepithelzellen IFN β produzieren (siehe 5.1.1), stellte sich die Frage nach einem potentiellen regulatorischen Einfluss von IFN β auf die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien in humanen Lungenepithelzellen.

Um diese Frage zu prüfen, wurde ein Teil der A549 mit rekombinantem IFN β (rIFN β) vorinkubiert. Nach 16 h wurden diese vorbehandelten sowie nicht vorbehandelte Zellen mit dem Wildtypstämmen *L. pneumophila* 130b oder Corby [MOI 0,1] für 2 h infiziert und anschließend die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums der Legionellen ausgezählt.

Wie die Abbildungen 5.1-6 A und B zeigen, vermehrte sich sowohl der *L. pneumophila* Wildtypstamm 130b (A) als auch *L. pneumophila* Corby (B) über einen Zeitraum von 48 h in A549 Zellen. Dabei sind keine wesentlichen Unterschiede in der Replikation zwischen den beiden Wildtypstämmen feststellbar. Zudem zeigen die Abbildungen, dass die durchgehende IFN β -Behandlung der pulmonalen Epithelzellen eine deutliche Abschwächung der intrazellulären Legionellenvermehrung im Vergleich zu nicht-rIFN β -behandelten Zellen verursachte. Dies erreichte nach 48 h Signifikanz-Niveau ($p < 0,05$).

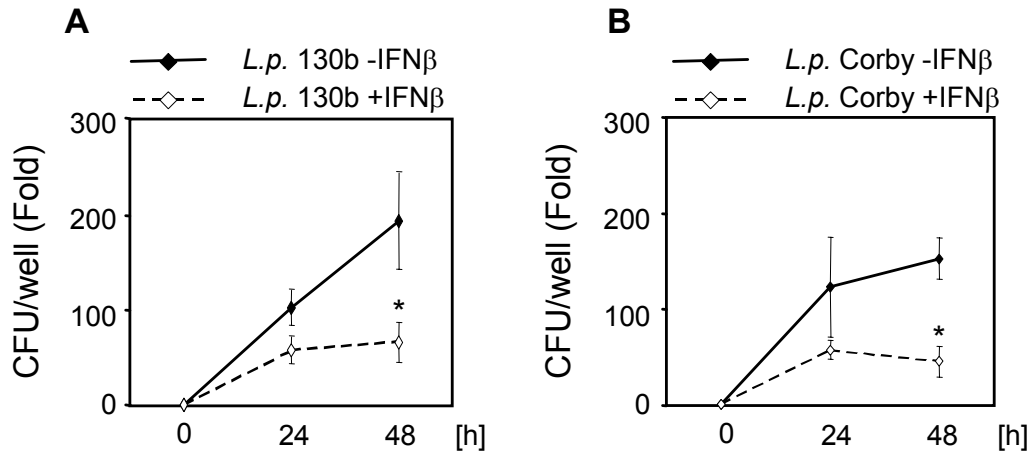


Abbildung 5.1-6 A, B: Einfluss von rIFN β auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden zum Teil mit 1000 IU/ml rIFN β vorbehandelt und 16 h später mit *L. pneumophila* 130b (A) bzw. mit *L. pneumophila* Corby (B) [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h mit bzw. ohne rIFN β -Behandlung wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

5.1.7 IRF3 und IPS-1 regulieren negativ die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Zugabe von rIFN β die Legionellenreplikation hemmt (siehe 5.1.6) und dass *L. pneumophila*-infizierte Lungenepithelzellen IPS-1- und IRF3-abhängig IFN β produzieren (siehe 5.1.3 und 5.1.4), sollte im Folgenden der Hypothese nachgegangen werden, dass IPS-1 und IRF3 (über die Vermittlung der Produktion von endogenem IFN β) das intrazelluläre Wachstum von *L. pneumophila* negativ beeinflussen.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden A549 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer siRNA gegen IRF3 bzw. IPS-1 transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde darüber hinaus 56 h nach der Transfektion mit rIFN β vorinkubiert. Alle Zellen wurden nach weiteren 16 h mit *L. pneumophila* 130b [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums der Legionellen ausgezählt.

Die Abbildungen 5.1-7 A und B zeigen jeweils analog zur Abbildung 5.1-6 A, dass sich *L. pneumophila* 130b in Kontroll-transfizierten Zellen über 48 h vermehrte und dass eine rIFN β -Behandlung der Zellen die Legionellenvermehrung abschwächte. Darüber hinaus ist zu sehen, dass die Gesamtbakterienzahl in den rIFN β -unbehandelten Zellen, in denen die Expression von IRF3 (A) oder IPS-1 (B) spezifisch durch siRNA inhibiert wurde, nach 48 h signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zu den mit Kontroll siRNA transfizierten und rIFN β -unbehandelten Zellen erhöht war. Die Behandlung mit rIFN β verminderte die Anzahl intrazellulärer Bakterien in den mit spezifischer siRNA transfizierten Zellen und hob den Effekt der IRF3 und IPS-1 siRNA wieder auf. In den IPS-1-Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse bei der Verwendung von beiden IPS-1-siRNA-Sequenzen (IPS-1a und IPS-1b) erzielt, dargestellt in Abbildung 5.1-7 B ist eine Zusammenfassung der mit IPS-1b siRNA durchgeführten Experimente. Der Nachweis für die Funktionalität der verwendeten siRNAs wurde bereits in den vorangegangenen Experimenten erbracht (siehe Abbildungen 5.1-3 und 5.1-4).

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass IPS-1 und IRF3 negativ die intrazelluläre Legionellenvermehrung in humanen pulmonalen Epithelzellen regulierten. Die Ergebnisse gaben zudem deutliche Hinweise darauf, dass (IPS-1- und IRF3-abhängig) endogen produziertes IFN β auto- oder parakrin negativ auf das Legionellenwachstum wirkte.

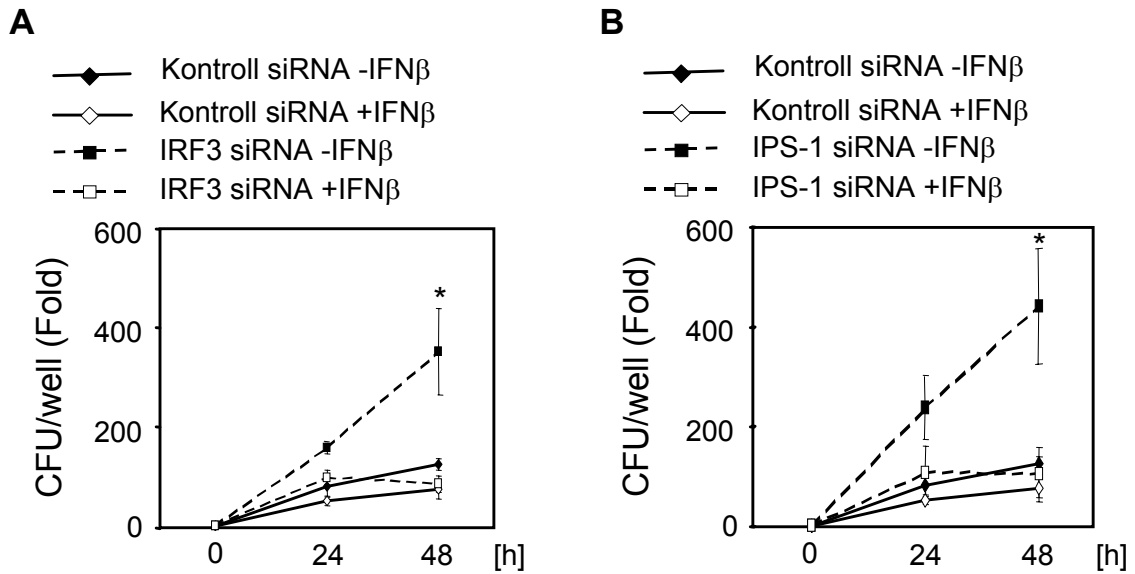


Abbildung 5.1-7 A, B: Einfluss von IRF3 und IPS-1 auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden entweder mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer IRF3 (A) bzw. IPS-1b (B) siRNA transfiziert, ein Teil 56 h später mit 1000 IU/ml rIFNβ vorinkubiert und weitere 16 h später alle Zellen mit *L. pneumophila* 130b [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h mit bzw. ohne rIFNβ-Behandlung wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

5.2 Humanes Naip und Ipaf sind beteiligt an der Erkennung und der Kontrolle der *Legionella pneumophila*-Infektion in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen

Auch wenn die vorherigen Versuche zeigten, dass Naip nicht an der IFN β -Produktion in Legionellen-infizierten humanen Lungenepithelzellen beteiligt war (siehe 5.1.5), beschreibt die aktuelle Literatur eine wesentliche Rolle für Maus-Naip5 (mNaip5) und auch von Maus-Ipaf (mIpaf) für die (IFN β -unabhängige) Wirtszellresistenz in Mausmakrophagen auf eine *L. pneumophila*-Infektion (Amer et al., 2006; Diez et al., 2003; Fortier et al., 2005; Fortier et al., 2007; Wright et al., 2003; Zamboni et al., 2006). Humane Orthologe zu mNaip5 und mIpaf wurden bisher im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen, und insbesondere *L. pneumophila*-Infektionen, nicht untersucht.

5.2.1 Die *L. pneumophila* Flagellin-Mutante vermehrt sich in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen besser als der Wildtypstamm

Für die Kontrolle der Vermehrung von *L. pneumophila* in Mausmakrophagen ist die Erkennung von zytosolischem Legionellen-Flagellin durch mNaip5 und mIpaf als wesentlich beschrieben worden (Amer et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006).

Um eine mögliche Funktion von den humanen Orthologen von mNaip5 und mIpaf in der Wirtszellresistenz gegenüber *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen zu untersuchen, wurden zunächst sowohl A549 Zellen als auch adhärenente THP-1 Zellen mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* Corby bzw. der Flagellin-Deletionsmutante *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ mit einer von MOI 0,1 (A549) oder 0,02 (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Außerdem wurden analog zum Vergleich Infektionen mit *L. pneumophila* JR32-Wildtyp bzw. der Typ IV Sekretionssystem-Deletionsmutante *L. pneumophila* JR32 $\Delta dotA$ durchgeführt. Die Zellen wurden nachfolgend entweder sofort oder nach 24 h und 48 h lysiert und das Lysat ausplattiert oder nach 48 h die Zellen für die Konfokalmikroskopie fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Nach zwei Tage wurden die Kolonie-bildenden-Einheiten (colony forming units; CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums ausgezählt.

Abbildung 5.2-1 zeigt, dass sich die Flagellin-Deletionsmutante von *L. pneumophila* Corby sowohl in A549 (A) als auch in THP-1 (B) Zellen nach 48 h signifikant ($p < 0,05$) stärker vermehrte als Wildtyp *L. pneumophila* Corby. Auch in den Konfokalmikroskopiebildern ist der Unterschied in der Vermehrung zwischen dem Wildtypstamm *L. pneumophila* Corby und der

Flagellin-Deletionsmutante *L.p.* Corby $\Delta flaA$ nach 48 h sowohl in A549 (E) als auch in THP-1 (F) Zellen zu sehen. Die Abbildungen 5.2-1 C und D zeigen, dass sich in Lungenepithelzellen und THP-1-Makrophagen Wildtyp *L. pneumophila* JR32, nicht aber eine JR32-basierte Typ IV Sekretionssystem-Deletionsmutante ($\Delta dotA$) vermehrte. Weder die Expression von Flagellin noch die vom Typ IV Sekretionssystem hatte einen Einfluss auf die Invasion der Bakterien (Daten nicht gezeigt).

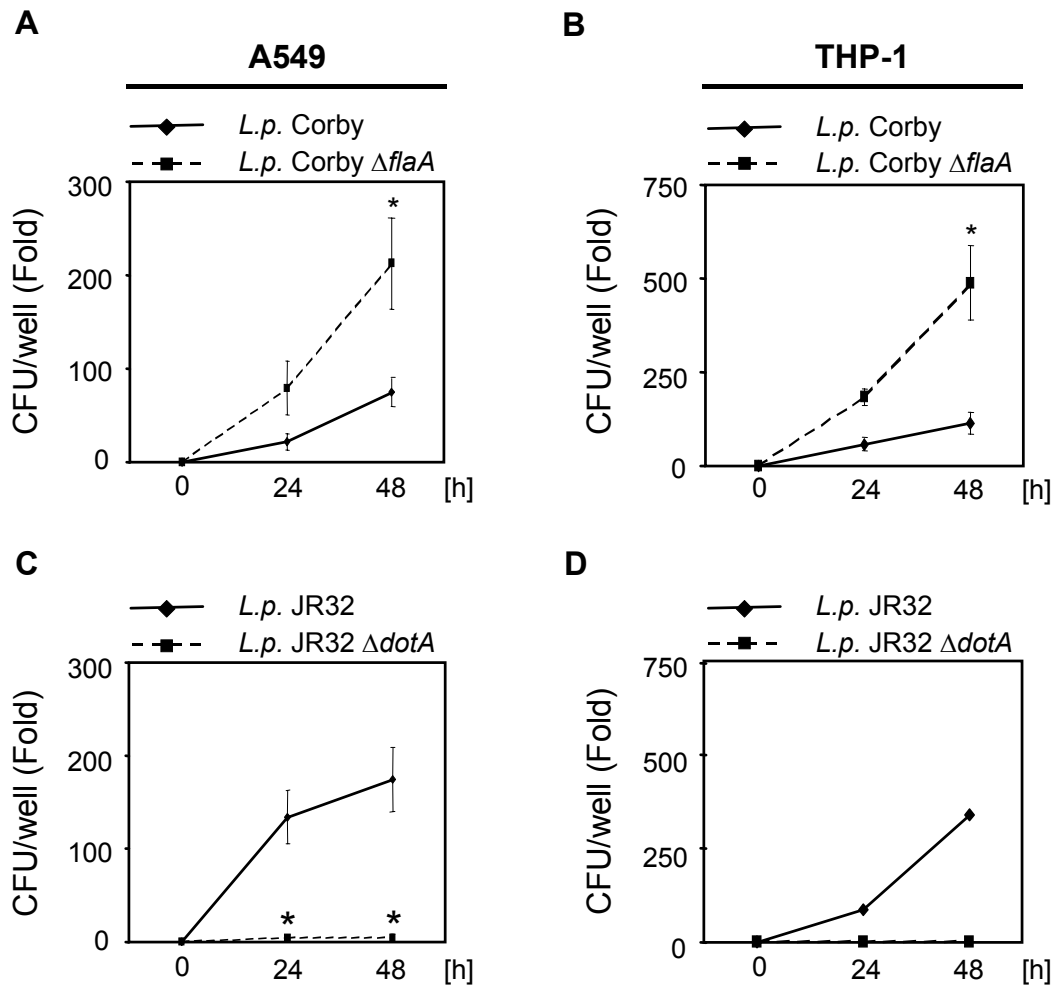


Abbildung 5.2-1 A – D: Vergleich der Vermehrung von *L.p.* Corby, *L.p.* Corby $\Delta flaA$, *L.p.* JR32 und *L.p.* JR32 $\Delta dotA$ in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 und adhärenzte THP-1 Zellen wurden mit *L.p.* Corby, *L.p.* Corby $\Delta flaA$ bzw. *L.p.* JR32 und *L.p.* JR32 $\Delta dotA$ [MOI 0,1] (A549) oder [MOI 0,02] (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Bakterienwachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Die dargestellten Ergebnisse zeigen die Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten (Ausnahme: 5.2-1 D zeigt einen repräsentativen von 3 Versuchen). Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

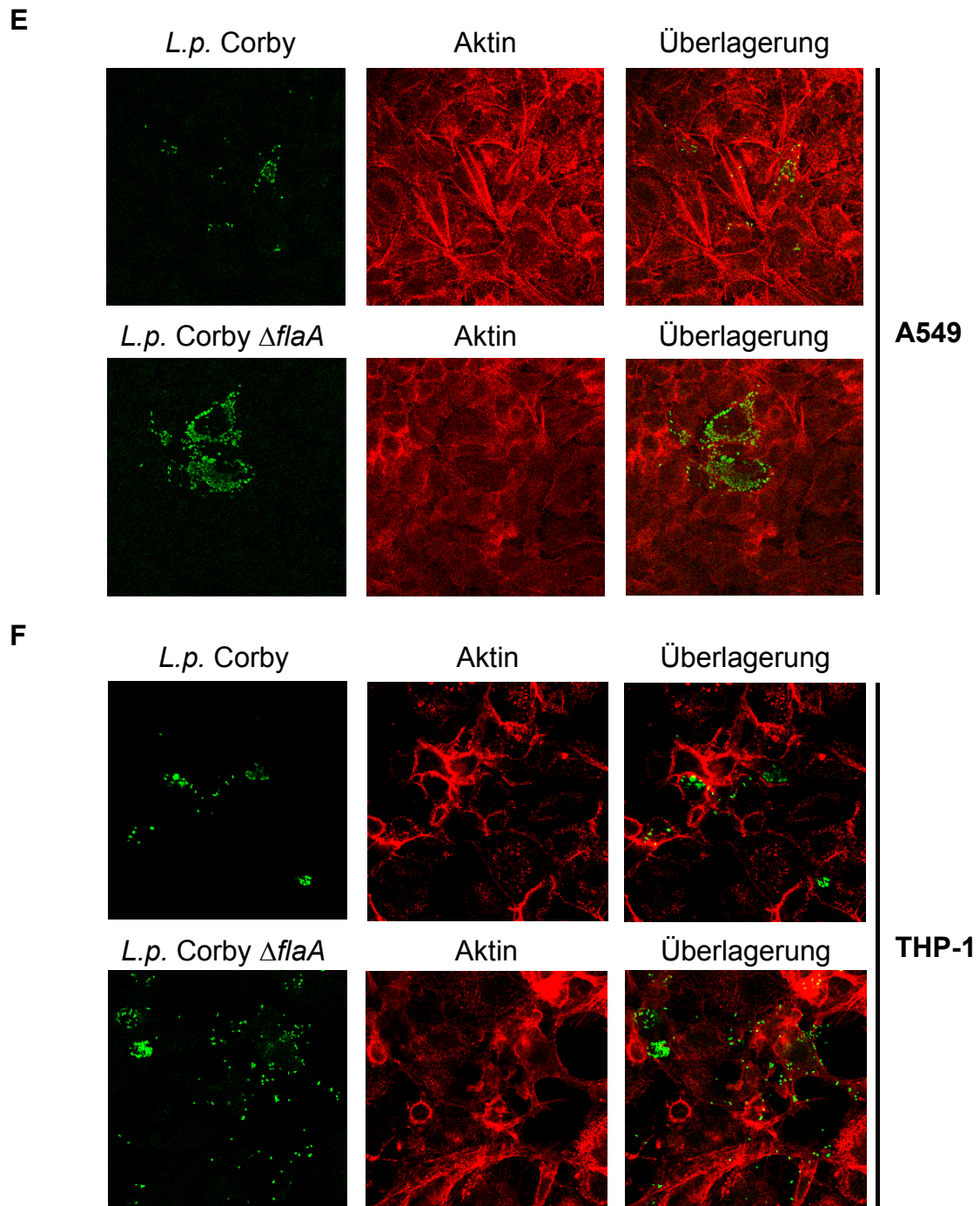


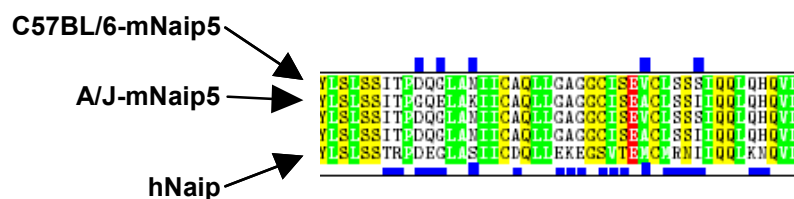
Abbildung 5.2-1 E – F: Vergleich der Vermehrung von *L.p. Corby* und *L.p. Corby $\Delta flaA$* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 und adhärenzte THP-1 Zellen wurden mit *L.p. Corby* und *L.p. Corby $\Delta flaA$* [MOI 0,1] (A549) oder [MOI 0,02] (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 48 h wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert und mit 1% Triton permeabilisiert. Nach der Legionellen- und Aktin-Färbung wurden die Ergebnisse mit einem LSM5 Pascal Zeiss Mikroskop visualisiert. Dargestellt sind jeweils die mit einem spezifischen Antikörper grün gefärbten Legionellen, dass mit Phalloidin rot gefärbte Aktin und eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

5.2.2 Humanes Naip wird in Lungenepithelzellen und Makrophagen, humanes Ipaf nur in Makrophagen exprimiert

In Mausmakrophagen scheinen mNaip5 und mlpaf Legionellen-Flagellin zu erkennen und nachfolgend die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen zu begrenzen. Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass sich auch in humanen Wirtszellen Flagellindefiziente Legionellen besser vermehren konnten als Wildtyp-Legionellen. Diese Beobachtung führte somit zur Hypothese, dass in humanen Zellen mNaip5- bzw. mlpaf-Orthologe existieren, welche Legionellen-Flagellin erkennen und das intrazelluläre Wachstum der Legionellen begrenzen.

Menschen exprimieren hlpaf, das sehr homolog zu mlpaf ist. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich Mensch und Maus beträchtlich in der Expression der Naip-Proteine. Während Mäuse 7 *naip*-Gene (u.a. *mnaip5*) exprimieren, findet sich im humanen Genom nur ein *naip*-Gen, welches sehr homolog zu *mnaip5* ist. Abbildung 5.2-2.1 zeigt einen Ausschnitt des Aminosäuresequenzvergleich von C57BL/6-Maus-Naip5 (funktionell, Resistenzvermittelnd) und A/J-Maus-Naip5 (nicht funktionell, Mäuse sind empfänglich) mit dem nächsten humanen Homolog Naip/Birc1 (68% Sequenzidentität). Die beiden Mausstämme weichen an 14 Positionen mit je einer Aminosäure voneinander ab. Bezüglich dieser offensichtlich für die Funktion von mNaip5 wichtigen 14 Aminosäuren ist humanes Naip gleich „nah verwandt“ oder „weit entfernt“ von den beiden Maus-Naip5-Allelen (C57BL/6-Maus- und A/J-Maus-Naip5). In fünf Aminosäuren verhält es sich wie C57BL/6-Maus-Naip5, in fünf wie A/J-Maus-Naip5 und in vier Aminosäuren ist es von C57BL/6-Maus-Naip5 und A/J-Maus-Naip5 verschieden. Es stellte sich somit die Frage, ob humanes Naip „funktionell“ oder „nicht-funktionell“ im Sinne einer Legionellenrestriktion in humanen Wirtszellen ist.



Zuerst wurde jedoch die Expression von humanem Naip und Ipaf in Lungenepithelzellen und Makrophagen als wichtige Zielzellen der Legionellen untersucht. Hierfür wurden A549-Lungenepithelzellen und adhärenente Makrophagen-ähnliche THP-1 Zellen mit dem Wildtyp *L. pneumophila* Corby [MOI 10] für 2 h bis 6 h infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Gesamtproteinextraktion für die Western blot Analyse lysiert. Im Western blot wurde mit spezifischen Antikörpern die Naip- und Ipaf-Expression auf Proteinebene untersucht. Als Kontrolle einer infektionsbedingten Zellaktivierung diente der Nachweis von COX-2 (N'Guessan et al., 2007) und als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung das konstant exprimierte Protein p38.

Wie in der Abbildungen 5.2-2.2 zu sehen ist, wurde Naip in A549 (A) und THP-1 Zellen (B) exprimiert. Eine Ipaf-Proteinexpression und Ipaf-mRNA-Expression (Daten nicht gezeigt) ist nur in THP-1 (B), nicht jedoch in A549 Zellen (A) zu sehen. Die Legionelleninfektion führte zu einer leichten Expressionszunahme von Naip und Ipaf in A549 und/oder THP-1 Zellen.

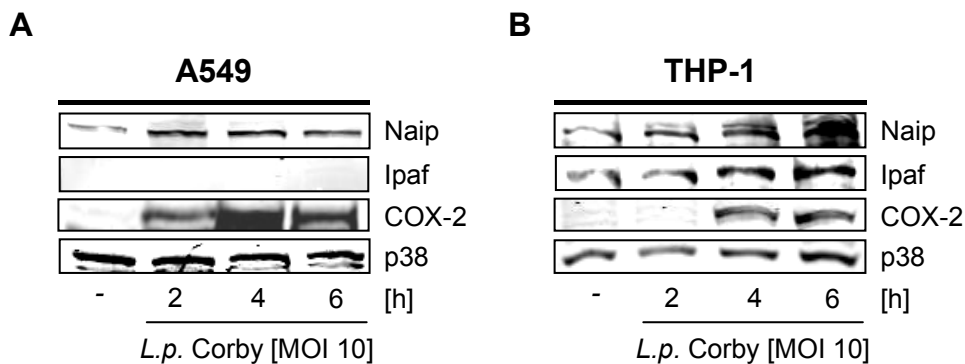


Abbildung 5.2-2.2 A, B: Expression von Naip und Ipaf in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 (A) und adhärenente THP-1 Zellen (B) wurden über 2 h, 4 h und 6 h mit *L.p. Corby* [MOI 10] infiziert. Nachfolgend wurde die Naip-, Ipaf-, COX-2- und p38-Expression mit spezifischen Antikörpern im Western blot bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils drei unabhängige Experimente.

5.2.3 Das Ausschalten von humanem Naip führt zur verstärkten Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen

Nach dem Nachweis der Expression von hNaip in humanen Lungenepithelzellen und THP-1 Zellen wurde die Funktionalität von Naip bezüglich der Legionellenreplikation untersucht.

Dafür wurden A549 und THP-1 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer siRNA gegen Naip (Pool aus zwei verschiedenen gegen Naip gerichteten

Sequenzen) transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* Corby oder *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ mit einer MOI von 0,1 (A549) oder 0,02 (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nachfolgend wurden die Zellen zum Einen nach 0 h, 24 h und 48 h lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums ausgezählt. Zum Anderen wurden die infizierten Zellen nach 48 h für die Konfokalmikroskopie fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

Die Abbildungen 5.2-3 A und B zeigen analog zu den Abbildungen 5.2-1 A und B, dass sich der Wildtyp *L. pneumophila* Corby und die Flagellin-Deletionsmutante *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ in Kontroll-transfizierten A549 (A) und THP-1 (B) Zellen über 48 h replizierten, wobei sich die Flagellin-defizienten Legionellen in beiden Zelltypen nach 48 h signifikant ($p < 0,05$) besser vermehrten als die Wildtyp-Bakterien. Zudem vermehrten sich Wildtyp-Legionellen verstärkt in Zellen, in denen die Naip-Expression mittels siRNA gehemmt wurde im Vergleich zu Kontroll siRNA-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu waren keine signifikanten Unterschiede in der intrazellulären Vermehrung der Flagellin-defizienten Legionellen in Kontroll siRNA- und in Naip siRNA-transfizierten Zellen zu sehen. Die Transfektion der siRNAs an sich hatte keinen Einfluss auf die Legionellenreplikation (Daten nicht gezeigt). Zur Kontrolle der Wirksamkeit der verwendeten siRNA wurden A549 und THP-1 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer siRNA gegen Naip (Pool aus zwei verschiedenen gegen Naip gerichteten Sequenzen) transfiziert und 72 h später die Expression von Naip mittels Western blot untersucht. Wie in den Abbildungen 5.2-3 A und B zu sehen, wurde die Expression des Ziel-Proteins in beiden Zelltypen durch die verwendeten siRNAs deutlich reduziert. Die gleichmäßige Beladung im Western Blot wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das konstant exprimierte Protein Akt überprüft.

Die Abbildungen 5.2-3 C und D zeigen die Unterschiede in der Replikation nach 48 h von *L. pneumophila* Corby und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ in Kontroll siRNA- und Naip siRNA-transfizierten A549 (C) und THP-1 (D) Zellen in Konfokalmikroskopiebildern. Es ist zu sehen, (I) dass sich Wildtyp-Legionellen in Kontroll-transfizierten Zellen schlechter vermehrten als Flagellin-defiziente Legionellen und (II) dass Wildtyp-Legionellen verstärkt in Naip siRNA-transfizierten A549 (C) und THP-1 (D) Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen replizierten.

Diese Ergebnisse unterstützten somit die Ergebnisse der vorangegangenen Vermehrungsversuche und zeigten, dass sich Wildtyp-Legionellen (kaum jedoch Flagellin-defiziente Legionellen) verstärkt in Naip-„knock-down“-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen vermehrten.

Insgesamt deuteten die Ergebnisse dieser RNAi-Experimente eine negative Beeinflussung der intrazellulären Replikation der Wildtyp-Legionellen, nicht aber der Flagellin-defizienten Legionellen durch Naip an.

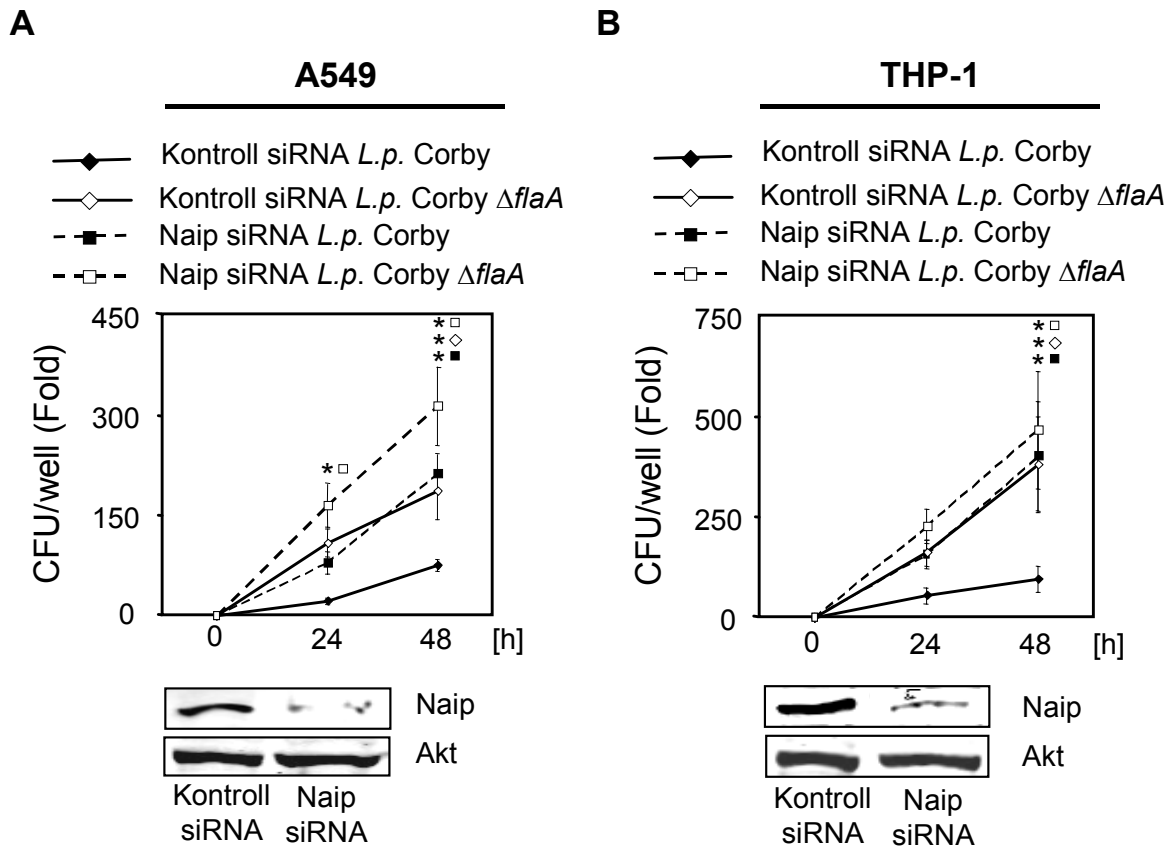
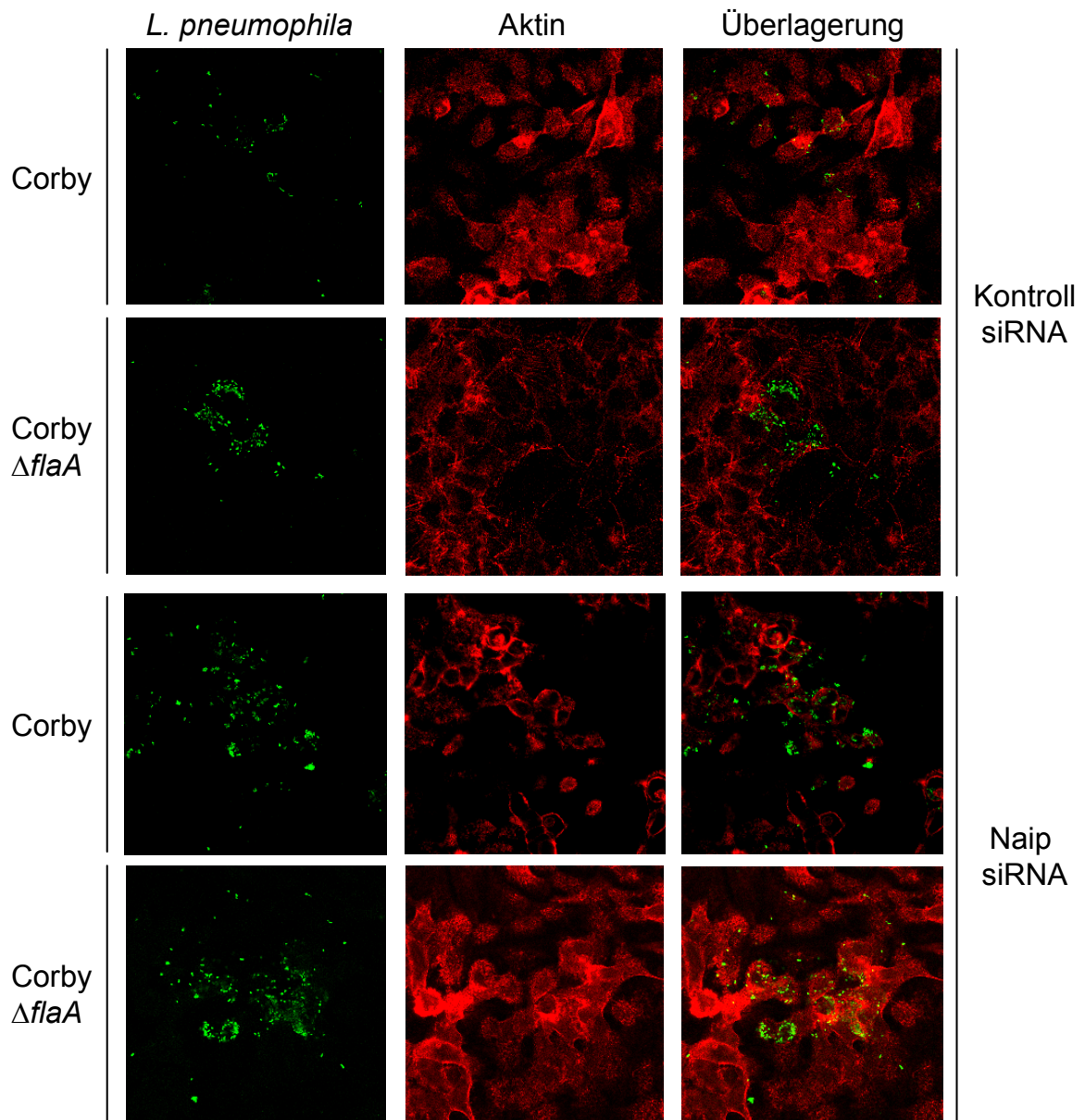


Abbildung 5.2-3 A und B: Einfluss der Expressionshemmung von Naip auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 und THP-1 Zellen wurden entweder mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA (Pool aus zwei verschiedenen gegen Naip gerichteten Sequenzen) transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby und *L.p.* Corby $\Delta flaA$ mit einer MOI von 0,1 (A549) oder 0,02 (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert und das Lysat ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden die Koloniebildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als $(CFU \text{ zum Zeitpunkt } x) / (CFU \text{ zum Zeitpunkt } 0 \text{ h})$ und dargestellt als CFU/well (Fold). Die dargestellten Ergebnisse zeigen Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede bezogen auf Kontroll- transfizierte und mit *L. pneumophila* Corby infizierte Zellen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern und dem jeweils gewählten graphischem Symbol gekennzeichnet. Für die Western blot Analyse wurden A549 und THP-1 Zellen mit Kontroll siRNA oder mit Naip siRNA transfiziert und 72 h später lysiert. Das Gesamtproteinextrakt wurde nachfolgend mit spezifischen Antikörpern untersucht. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch die Detektion des konstitutiv exprimierten Proteins Akt.

C

A549



D

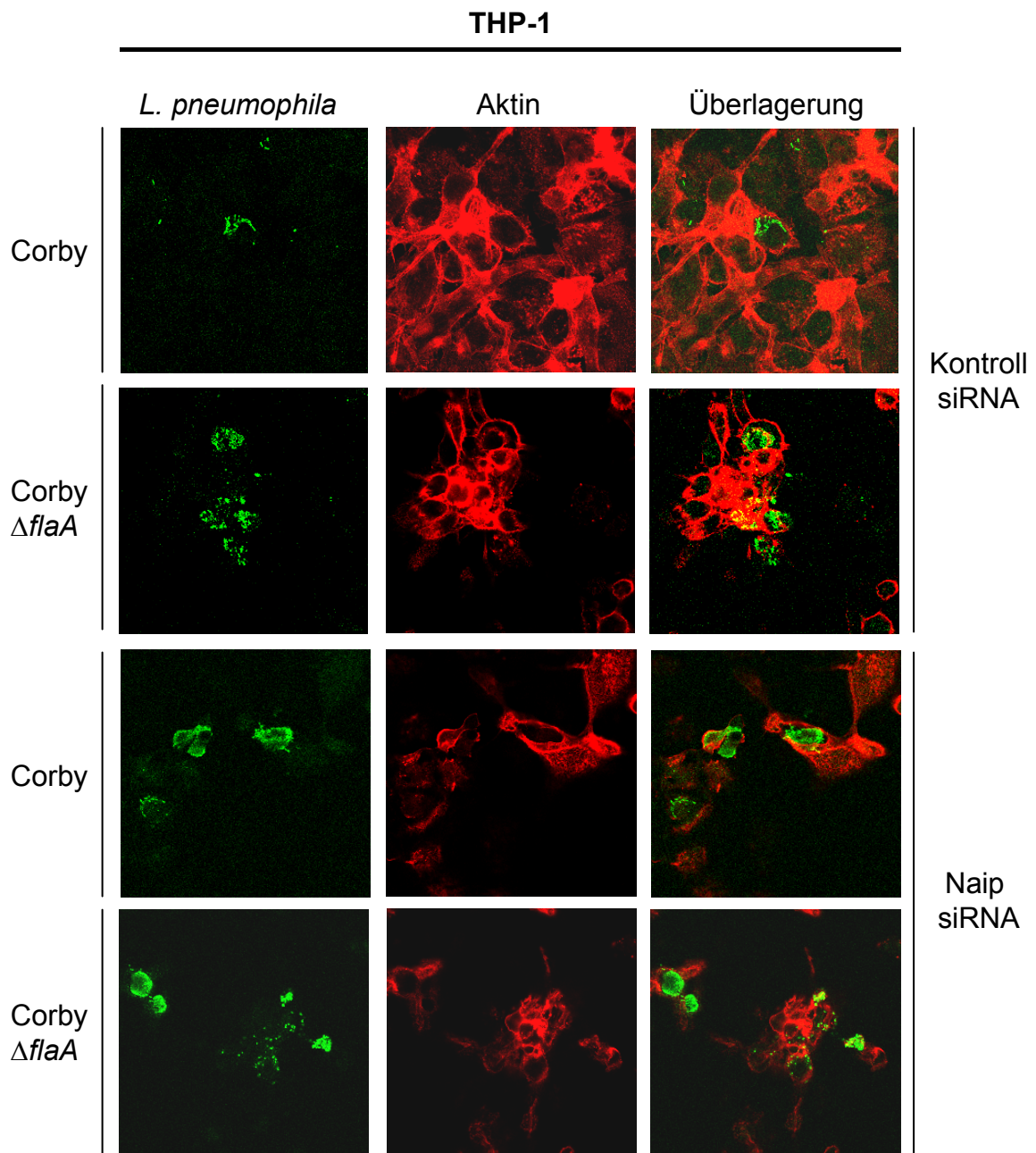


Abbildung 5.2-3 C und D: Einfluss der Expressionshemmung von Naip auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 und THP-1 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder mit Naip siRNA (Pool aus zwei verschiedenen gegen Naip gerichteten Sequenzen) transfiziert und nach 72 h mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby und *L.p.* Corby $\Delta flaA$ mit einer MOI von 0,1 (A549) oder 0,02 (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet. Nach 48 h wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert und mit 1% Triton permeabilisiert. Nach der Legionellen- und Aktin-Färbung wurden die Ergebnisse mit einem LSM5 Pascal Zeiss Mikroskop visualisiert. Dargestellt sind jeweils die mit einem spezifischen Antikörper grün gefärbten Legionellen, dass mit Phalloidin rot gefärbte Aktin und eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

5.2.4 Überexpression von humanem Naip reduziert die Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen

Um die in den „knock-down“-Versuchen (5.2.3) gewonnene Hypothese, dass humanes Naip das Wachstum von *L. pneumophila* kontrolliert, zu bestätigen, wurden nachfolgend Überexpressionsexperimente durchgeführt.

Dafür wurden A549 Zellen entweder untransfiziert gelassen oder mit einem Leervektor bzw. humaner Naip-, A/J-Maus mNaip5- (welches die Legionellenvermehrung in Mausmakrophagen nicht verhindert) oder C57BL/6-Maus mNaip5- (vermittelt Resistenz gegenüber *L. pneumophila* in Mausmakrophagen) Plasmid-DNA transfiziert und 24 h später mit *L. pneumophila* Corby [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums ausgezählt.

Die Abbildung 5.2-4 zeigt, dass sich die Wildtyp-Legionellen (*L. pneumophila* Corby) in den untransfizierten und mit dem Leervektor transfizierten Zellen in etwa gleichem Maße über 48 h vermehrten. In den hNaip- und C57BL/6-Maus mNaip5-überexprimierten Zellen vermehrte sich *L. pneumophila* Corby ebenfalls über 48 h, aber die Legionellen replizierten hier signifikant schlechter im Vergleich zu den mit dem Leervektor transfizierten Zellen (nach 48 h $p < 0,05$). In den A/J-Maus mNaip5-transfizierten Zellen war ebenfalls eine eingeschränkte Vermehrung von *L. pneumophila* Corby im Vergleich zu den untransfizierten und mit dem Leervektor transfizierten Zellen (nicht signifikant), aber eine bessere Vermehrung im Vergleich zu den hNaip- und C57BL/6-Maus mNaip5-transfizierten Zellen (nicht signifikant) zu beobachten. Zur Kontrolle der Überexpression der Naip-Orthologe, wurde die Naip/mNaip5-Protein-Expression im Western blot nachgewiesen. Wie in der Abbildung 5.2-4 zu sehen ist, wurde Naip basal in untransfizierten und mit dem Leervektor transfizierten A549 Zellen exprimiert. Im Vergleich dazu ist in den mit hNaip- oder mNaip5-Plasmid-DNA transfizierten Zellen jedoch eine stärkere Expression zu sehen. Die Transfektion mit hNaip-, C57BL/6-Maus mNaip5- und A/J-Maus mNaip5-Plasmid-DNA führte zu annähernd gleichen Expressionen von hNaip/mNaip5 (rechtes Teilbild, Abb. 5.2-4). Die Beladungskontrolle erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das konstant exprimierte Protein Akt.

Zusammengenommen zeigten die „knock-down“- und Überexpressionsexperimente an, dass humanes Naip die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen negativ kontrollierte.

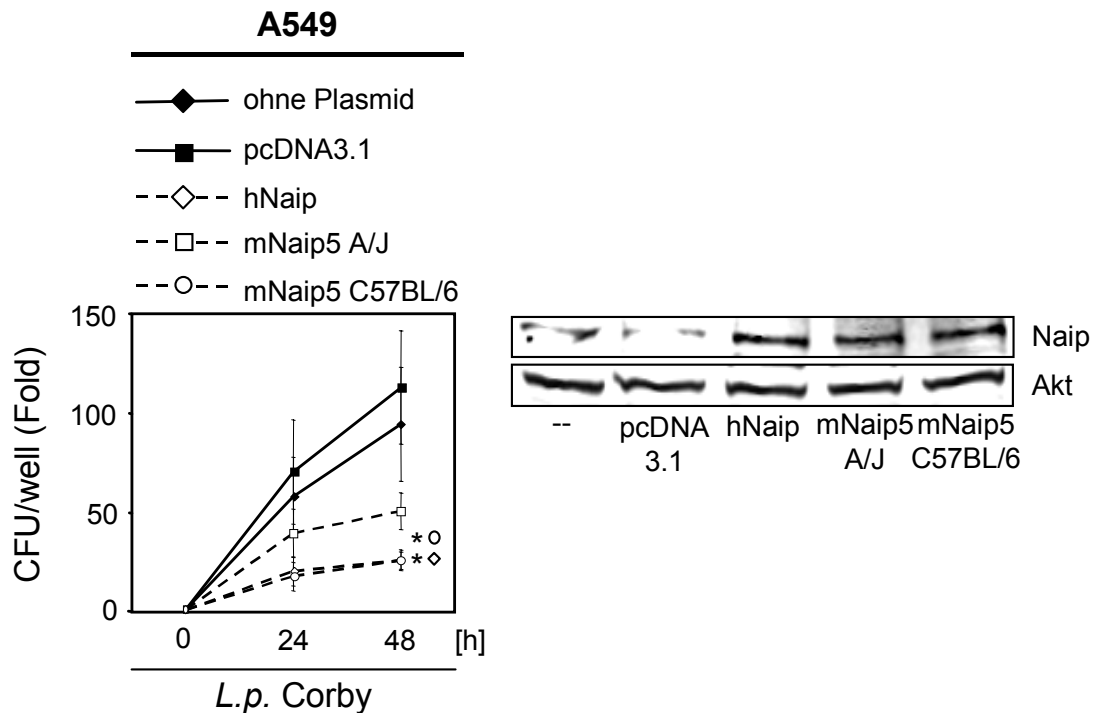


Abbildung 5.2-4: Einfluss der Überexpression von hNaip auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden untransfiziert belassen oder mit pcDNA3.1, hNaip oder A/J-Maus mNaip5 bzw. C57BL/6-Maus mNaip5 transfiziert und 24 h später mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Koloniebildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Das dargestellte Ergebnis zeigt Mittelwerte (\pm SEM) von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen Leervektor- und spezifisch-transfizierten Zellen wurden mit einem Stern und dem dazugehörigen graphischen Symbol für die transfizierte DNA gekennzeichnet. Für die Western blot Analyse wurden A549 Zellen untransfiziert belassen oder mit pcDNA3.1, hNaip oder A/J-Maus mNaip5 bzw. C57BL/6-Maus mNaip5 transfiziert und 24 h später lysiert und das Gesamtproteinextrakt mit einem spezifischen sowohl hNaip als auch mNaip5 erkennenden Antikörper untersucht. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch Detektion des konstant exprimierten Proteins Akt.

5.2.5 Der „knock-down“ von humanem Ipaf führt zur verstärkten Replikation von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen

Da Ipaf nur in humanen Makrophagen, nicht aber in Lungenepithelzellen exprimiert wird (siehe 5.2.2), wurden siRNA Experimente zur Untersuchung der Funktionalität von Ipaf bezüglich der Legionellenreplikation in THP-1 nicht aber in A549 Zellen durchgeführt.

Hierfür wurden THP-1 Zellen entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer Ipaf siRNA transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* Corby oder *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ [MOI 0,02] für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Die so behandelten Zellen wurden nach 0 h, 24 h und 48 h lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums der Legionellen ausgezählt. In anderen Experimenten wurden die Zellen nach 48 h für die Konfokalmikroskopie fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

In der Abbildung 5.2-5 A ist erneut zu sehen, dass sich Flagellin-defiziente Legionellen (*L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$) besser in Kontroll-transfizierten THP-1 Makrophagen vermehrten als Wildtyp *L. pneumophila* Corby. Zudem replizierten Wildtyp *L. pneumophila* deutlich besser in Ipaf-„knock-down“-Zellen verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen. Signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten und *L. pneumophila* Corby infizierten Zellen waren dabei nach 48 h folgende Werte: Vermehrung von *L. pneumophila* Corby in Ipaf-transfizierten Zellen und *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ in Kontroll- und siRNA Ipaf-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu war die Replikation der Flagellin-defizienten Legionellen in Kontroll-transfizierten und Ipaf siRNA-transfizierten Zellen nicht signifikant unterschiedlich. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der verwendeten siRNA, wurde die Expression von Ipaf mittels Western blot überprüft. Die Abbildung 5.2-5 A (rechtes Teilbild) zeigt eine deutliche Expressionsminderung von Ipaf durch Ipaf-spezifische siRNA. Die gleichmäßige Beladung wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das konstant exprimierte Protein Akt überprüft.

Zur Bestätigung der Vermehrungsversuche wurden im Folgenden Konfokalmikroskopieexperimente durchgeführt. Die Abbildung 5.2-5 B zeigt erneut eine stärkere intrazelluläre Vermehrung der Wildtyp-Legionellen in Ipaf-„knock-down“-Zellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Im Gegensatz dazu wurde die (verstärkte) Replikation der Flagellin-defizienten Legionellen kaum durch die Hemmung der Ipaf-Expression beeinflusst.

Insgesamt deuteten die Ergebnisse dieser RNAi-Experimente eine negative Beeinflussung der intrazellulären Replikation der Wildtyp-Legionellen, nicht aber der Flagellin-defizienten Legionellen durch humanes Ipaf an.

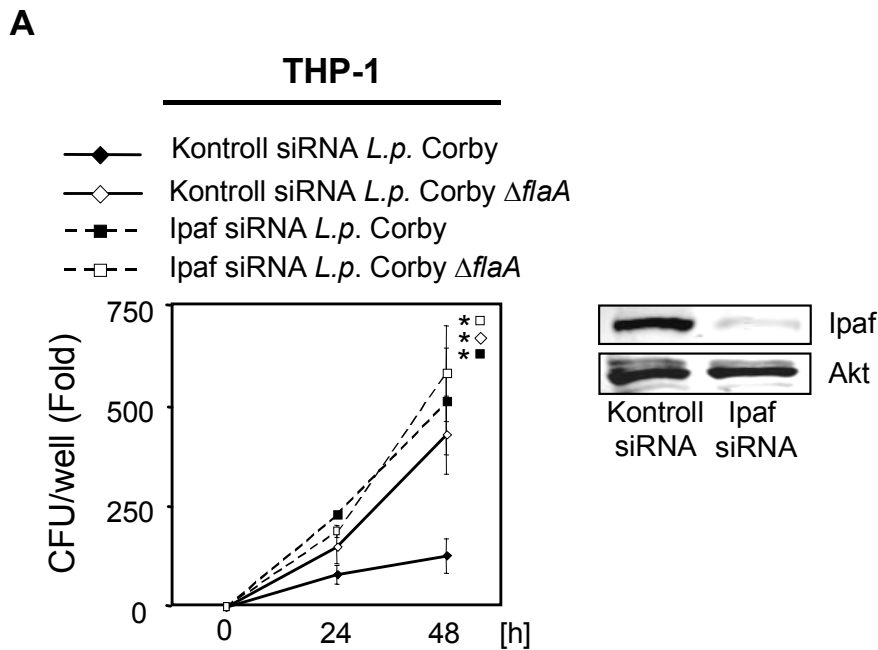


Abbildung 5.2-5 A: Einfluss der Expressionshemmung von Ipaf auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen.

THP-1 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder mit Ipaf siRNA transfiziert und nach 72 h mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby oder *L.p.* Corby $\Delta flaA$ [MOI 0,02] für 2 h infiziert. Nachfolgend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Das dargestellte Ergebnis zeigt die Mittelwerte (\pm SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede bezogen auf Kontroll-transfizierte und mit *L.p.* Corby infizierte Zellen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern und dem jeweils gewählten graphischem Symbol gekennzeichnet. Für die Western blot Analyse wurden THP-1 Zellen mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer Ipaf siRNA transfiziert, nach 72 h lysiert und das Gesamtproteinextrakt mit spezifischen Antikörpern untersucht. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch Detektion des konstant exprimierten Proteins Akt.

B

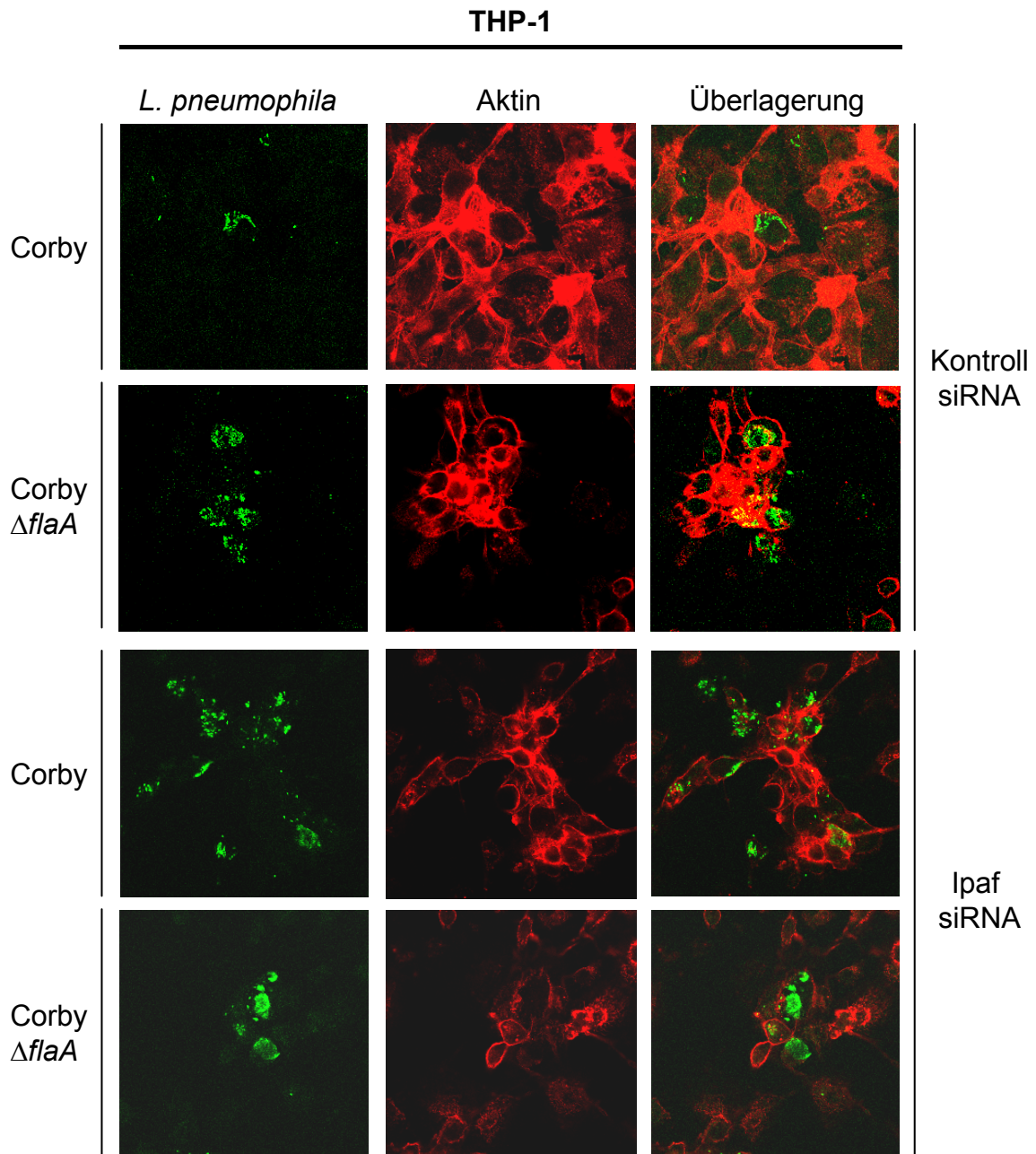


Abbildung 5.2-5 B: Einfluss der Expressionshemmung von Ipaf auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Makrophagen.

THP-1 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder mit Ipaf siRNA transfiziert und nach 72 h mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby und *L.p.* Corby $\Delta flaA$ [MOI 0,02] für 2 h infiziert. Nachfolgend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 48 h wurden die Zellen mit 3% PFA fixiert und mit 1% Triton permeabilisiert. Nach der Legionellen- und Aktin-Färbung wurden die Ergebnisse mit einem LSM5 Pascal Zeiss Mikroskop visualisiert. Dargestellt sind jeweils die mit einem spezifischen Antikörper grün gefärbten Legionellen, dass mit Phalloidin rot gefärbte Aktin und eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die dargestellten Bilder sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

5.2.6 Überexpression von humanem Ipaf reduziert die Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen

Zur Überprüfung der mittels siRNA-Versuchen (5.2.5) gewonnenen Hypothese, dass humanes Ipaf die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* restringiert, wurden im Folgenden Überexpressionsexperimente durchgeführt.

Dafür wurden A549 Zellen entweder untransfiziert belassen, mit einem Leervektor oder humanem Ipaf (pIpaf) transfiziert. 24 h später wurden die Zellen mit *L. pneumophila* Corby [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Nachfolgend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert und das Lysat ausplattiert. Zwei Tage wurden später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums ausgezählt.

Die Abbildung 5.2-6 zeigt, dass sich der Wildtypstamm *L. pneumophila* Corby in den untransfizierten und mit dem Leervektor transfizierten Zellen in etwa gleichem Maße über 48 h vermehrte. In den Ipaf-überexprimierten Zellen vermehrte sich *L. pneumophila* Corby signifikant ($p < 0,05$) schlechter im Vergleich zu untransfizierten und mit Leervektor transfizierten Zellen. Zur Kontrolle der Überexpression von Ipaf wurde die Expression von Ipaf im Western blot untersucht. Die Abbildung 5.2-6 zeigt eine Expression von Ipaf in den Ipaf-transfizierten, nicht aber in den Kontroll-transfizierten A549 Zellen. Die Beladungskontrolle erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das konstant exprimierte Protein FAK.

Zusammengenommen zeigten die „knock-down“- und Überexpressionsexperimente, dass humanes Ipaf die intrazelluläre Replikation von Legionellen in humanen Wirtszellen negativ kontrollierte.

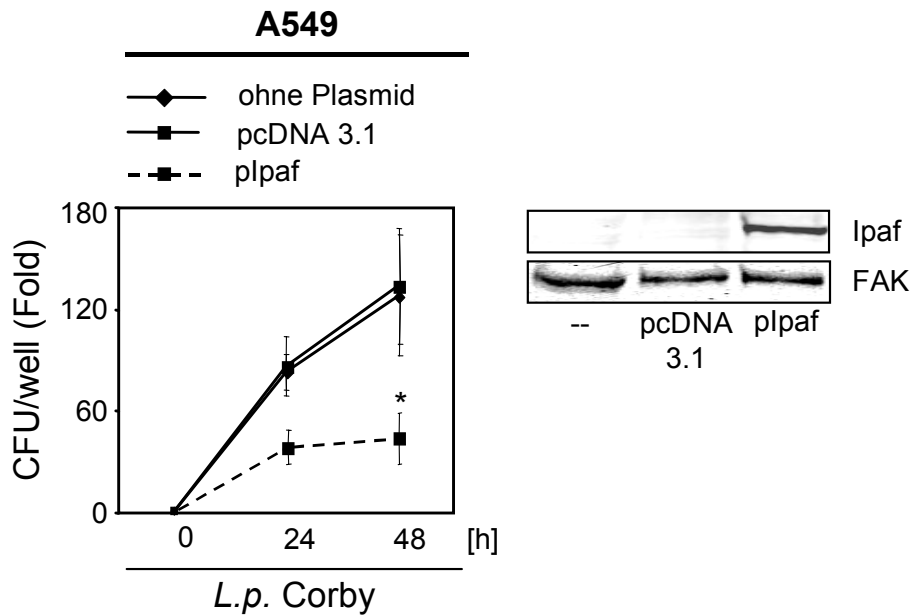


Abbildung 5.2-6: Einfluss der Überexpression von Ipaf auf die Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen.

A549 Zellen wurden unbehandelt gelassen, mit dem Leervektor pcDNA 3.1 oder mit plpaf transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby [MOI 0,1] für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Das dargestellte Ergebnis zeigt die Mittelwerte (\pm SEM) von vier unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten in Kontroll-transfizierten und Ipaf-transfizierten Zellen wurden mit einem Stern ($p < 0,05$) gekennzeichnet. Für die Western blot Analyse wurden A549 Zellen unbehandelt gelassen, mit dem Leervektor pcDNA 3.1 oder mit plpaf transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und das Gesamtproteinextrakt mit einem spezifischen Ipaf-Antikörper im Western Blot untersucht. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch Detektion des konstant exprimierten Proteins FAK.

5.2.7 Humanes Naip und Ipaf regulieren negativ die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in primären humanen Makrophagen

Zur Bestätigung der in den Zelllinien gewonnenen Ergebnisse wurde im Folgenden die Bedeutung von humanem Naip und Ipaf für die Legionellenreplikation in primären Makrophagen untersucht.

Dafür wurden peripheren humane Blutmonozyten gewonnen und entweder mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA (Pool aus zwei verschiedenen Sequenzen) oder mit spezifischer Ipaf siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. 5 d nach der siRNA Transfektion wurden die Makrophagen mit Wildtyp *L. pneumophila* Corby oder mit Flagellin-defizienten Legionellen (*L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$) mit einer MOI von 0,02 für 2 h infiziert. Nachfolgend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h und 24 h der Infektion wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) zur Beurteilung des intrazellulären Wachstums der Legionellen ausgezählt.

Die Abbildungen 5.2-7 A und B zeigen, dass sich Flagellin-defiziente Legionellen verglichen mit Wildtyp-Legionellen signifikant ($p < 0,05$) besser in humanen primären Makrophagen vermehrten. Zudem zeigte sich, dass die Hemmung der Naip- (Abb. 5.2-7 A) und Ipaf- (Abb. 5.2-7 B) Expression eine signifikant ($p < 0,05$) verstärkte Vermehrung von *L. pneumophila* Corby verglichen mit Kontroll-transfizierten Zellen zur Folge hatte. Demgegenüber hatte die Expression von endogenem Naip (Abb. 5.2-7 A) bzw. endogenem Ipaf (Abb. 5.2-7 B) wenig Einfluss auf die (verstärkte) Replikation der Flagellin-defizienten Legionellen. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der verwendeten siRNA, wurden die primären Makrophagen mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA (Pool aus zwei verschiedenen Sequenzen) oder spezifischer Ipaf siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Monozyten in Makrophagen. 5 d nach der Transfektion wurde die Expression von Naip bzw. Ipaf mittels Western blot untersucht. Wie in den Abbildungen 5.2-7 A und B zu sehen ist, wurde das Ziel-Protein in beiden Fällen durch die verwendeten siRNAs ausgeschaltet. Die gleichmäßige Beladung wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen das konstant exprimierte Protein FAK überprüft.

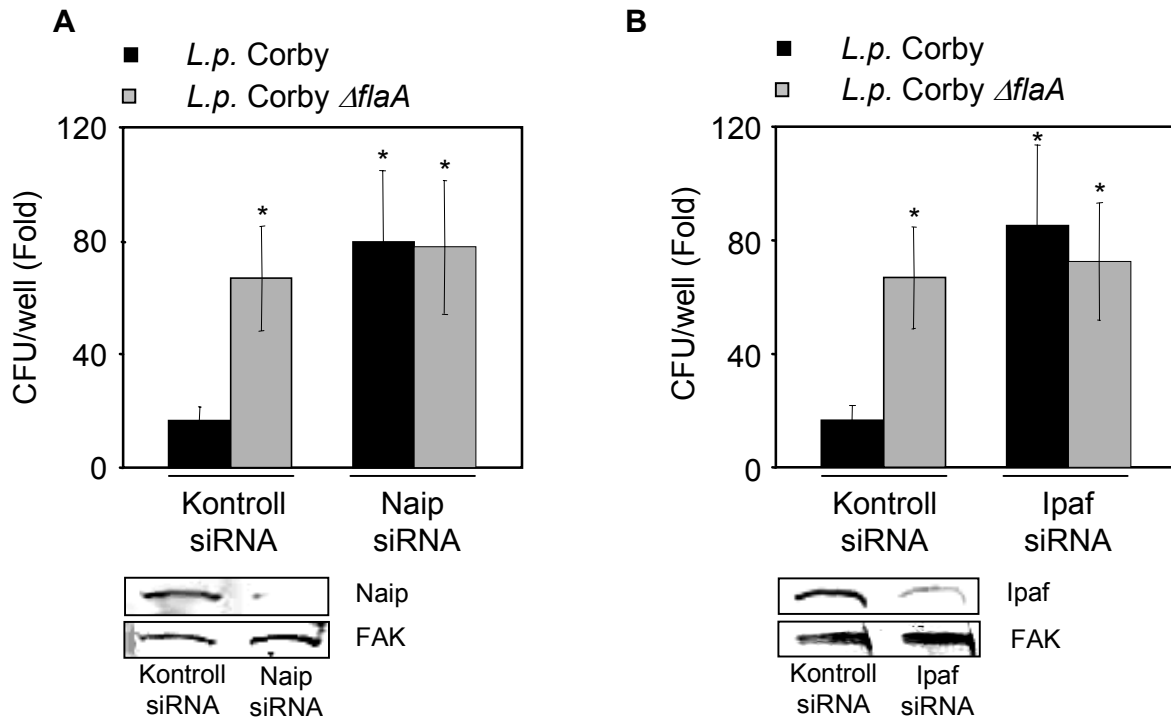


Abbildung 5.2-7 A und B: Humanes Naip und Ipaf kontrollieren die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in primären humanen Makrophagen

Primäre humane Monozyten wurden mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA (Pool aus zwei verschiedenen Sequenzen) bzw. Ipaf siRNA transfiziert. In den folgenden 5 Tagen erfolgte die Differenzierung in Makrophagen durch Adhäsion an das Kulturgefäß. Am 5. Tag wurden die Zellen mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby und *L.p. Corby ΔflaA* [MOI 0,02] für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h und 24 h wurden die Zellen lysiert, das Lysat ausplattiert und zwei Tage später die Kolonie-bildenden-Einheiten (CFU) ausgezählt. Das intrazelluläre Wachstum wurde berechnet als (CFU zum Zeitpunkt x)/(CFU zum Zeitpunkt 0 h) und dargestellt als CFU/well (Fold). Die dargestellten Ergebnisse zeigen jeweils die Mittelwerte (\pm SEM) von acht unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Für die Western blot Analyse wurden primäre humane Monozyten mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA bzw. Ipaf siRNA transfiziert. In den folgenden 5 Tagen erfolgte die Differenzierung in Makrophagen durch Adhäsion. Am 5. Tag wurden die Zellen lysiert und das Gesamtproteinextrakt mit spezifischen Naip- oder Ipaf-Antikörpern untersucht. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch Detektion des konstitutiv exprimierten Proteins FAK.

5.2.8 Humanes Naip und Ipaf haben keinen Einfluss auf die LDH-Freisetzung nach Legionelleninfektion von humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen

In einigen, aber nicht allen aktuellen Publikationen zu murinem Naip5 und Ipaf wird diskutiert, ob der Effekt von mNaip5 und mlpaf auf die intrazelluläre Legionellenvermehrung in Mausmakrophagen durch einen vermehrten mNaip5- bzw. mlpaf-abhängigen programmierten Zelltod hervorgerufen wird. So wurde in einigen Untersuchungen ein Einfluss vom mNaip5 und mlpaf auf den Zelltod, bestimmt über die Menge der freigesetzten Laktat-Dehydrogenase- (LDH), gezeigt (Amer et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006).

Um den Einfluss von humanem Naip und Ipaf auf einen (Legionellen-bedingten) programmierten Zelltod in humanen Wirtszellen zu analysieren, wurden A549 und THP-1 Zellen mit unspezifischer Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip siRNA bzw. Ipaf siRNA (Ipaf nur in THP-1 Zellen) transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* Corby oder *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ [MOI 0,1] (A549) oder [MOI 0,02] (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären Bakterien durch Waschen entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 0 h, 24 h und 48 h wurde in den Überständen mit Hilfe eines Zytotoxizitäts-Detektions-Assays die LDH-Aktivität als Indikator des Zelltods (Ren et al., 2006) gemessen.

24 h oder 48 h nach Legionelleninfektion kam es zu keiner oder nur minimalen Zunahme der LDH-Freisetzung im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (Abbildung 5.2-8 A und B und Daten nicht gezeigt). Die LDH-Aktivität schien darüber hinaus nicht durch den „knock-down“ von Naip oder Ipaf beeinflusst zu sein. Ebenso konnte kein Unterschied in der LDH-Freisetzung von mit Wildtyp-Legionellen und mit Flagellin-defizienten Legionellen infizierten Wirtszellen beobachtet werden. Es muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass die Messung der LDH-Freisetzung eventuell nicht sensitiv genug gewesen ist. Da niedrige MOIs bei der Legionelleninfektion benutzt wurden, war auch nach 48 h nur ca. jede 20. Wirtszelle infiziert, so dass eventuelle Unterschiede in der LDH-Freisetzung möglicherweise maskiert wurden (siehe 6.2.3).

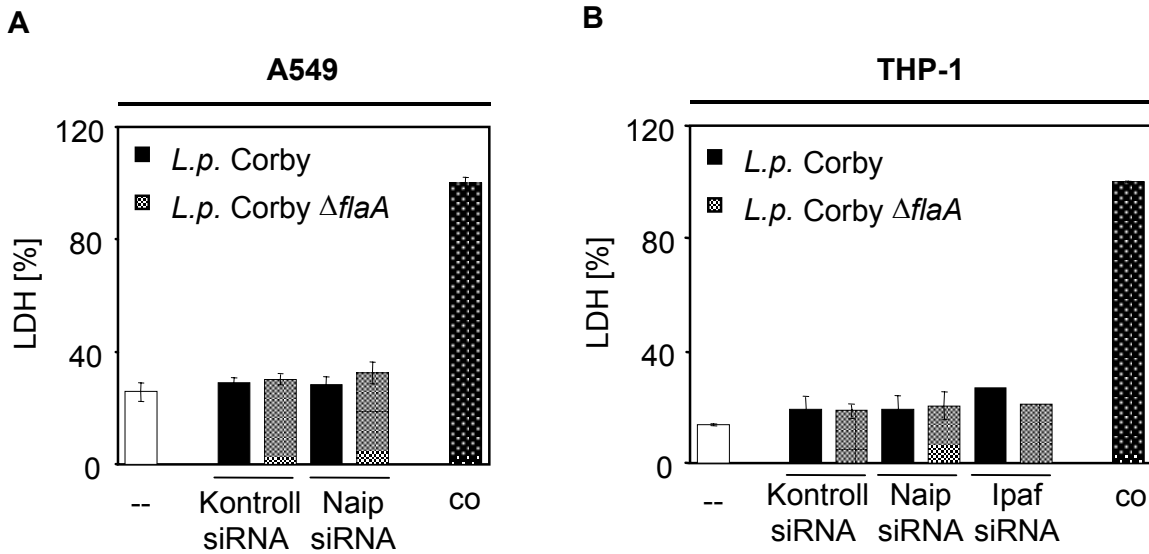


Abbildung 5.2-8 A und B: Einfluss von Naip und Ipaf auf die LDH-Freisetzung in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

A549 und THP-1 Zellen wurden mit Kontroll siRNA oder mit spezifischer Naip und Ipaf (nur THP-1) siRNA transfiziert und 72 h später mit *L. pneumophila* (*L.p.*) Corby und *L.p. Corby* Δ *flaA* [MOI 0,1] (A549) oder [MOI 0,02] (THP-1) für 2 h infiziert. Anschließend wurden extrazelluläre Bakterien durch Waschen mit PBS entfernt bzw. mit Gentamycin abgetötet (Zeitpunkt 0 h). Nach 24 h wurden die Überstände genommen und mit einem Zytotoxizitäts-Detektions-Assay die LDH-Aktivität gemessen. Als Leerwert diente Überstand von untransfizierten und uninfizierten Zellen, als Kontrollwert (co) Überstand von vollständig lysierten Zellen. Sämtliche Werte wurden auf die Totallyse (100% LDH-Aktivität) bezogen. Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte von Zweifachbestimmungen dar und sind repräsentativ für mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmalig zwei verschiedene Mechanismen der angeborenen Immunabwehr nach Infektion von humanen Zellen mit *Legionella pneumophila* auf. Dabei handelt es sich zum Einen um IPS-1-IRF3-IFN β -abhängige Prozesse und zum Anderen um Naip- und Ipaf-vermittelte zellautonome Abwehrmechanismen. In beiden Fällen handelt es sich um wahrscheinlich PRR-vermittelte aber TLR-unabhängige Mechanismen, die zu einer partiellen Restriktion der Legionellenreplikation führen.

Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse entsprechend dem Ablauf der angeborenen Immunantwort über Erkennung entsprechender MAMPs durch PRRs, ausgelöste Signalkaskaden und anschließende Resistenzvermittlung jeweils für die IPS-1-IRF3-IFN β - und die Naip-/Ipaf-vermittelte Legionellenrestriktion diskutiert.

6.1.1 Bei der Restriktion der Vermehrung von *L. pneumophila* beteiligte aktivierende mikrobielle Moleküle (MAMPs)

6.1.1.1 MAMPs in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung humaner Lungenepithelzellen durch *L. pneumophila* und anschließende IFN β -Produktion Flagellin-unabhängig ist, da sowohl der *L. pneumophila* Wildtypstamm Corby als auch die Flagellin-Deletionsmutante *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$ in gleichem Maße in der Lage waren, die IFN β -Sekretion zu induzieren. Die IFN β -Produktion in Legionellen-infizierten humanen Lungenepithelzellen war jedoch abhängig von einer Substrattranslokation durch das Typ IVB Sekretionssystem der Legionellen und/oder von der intrazellulären Replikation. So führte weder eine Infektion mit Typ IVB Sekretionssystem-defizienten Legionellen, denen ein essentielles Gen für die Substrattranslokation und damit auch die Fähigkeit zur Replikation fehlt (Roy and Isberg, 1997), noch eine Stimulation der Lungenepithelzellen mit hitzeinaktivierten Legionellen zu einer Induktion der IFN β -Produktion.

Diese Ergebnisse decken sich mit kürzlich publizierten Erkenntnissen von Stetson und Medzhitov, die ebenfalls zeigen konnten, dass eine Infektion mit *L. pneumophila*, nicht aber *L. pneumophila* $\Delta dotA$ zu einer IFN β -Sekretion führte. Darüber hinaus wurde in dieser Studie gezeigt, dass DNA von *Listeria monocytogenes*, welche ins Wirtszellzytosol gelangte, zur Induktion von IFN β führte. Daraufhin wurde vermutet, dass es bei einer Legionelleninfektion zu einer Typ IVB Sekretionssystem-abhängigen Translokation von Bakterien-DNA ins Wirtszellzytosol, zu einer Erkennung der Bakterien-DNA durch zytosolische PRRs und nachfolgend einer Aktivierung der IFN β -Antwort kommt (Stetson and Medzhitov, 2006). Zu

dieser Hypothese passen zum Einen Studien, die zeigten, dass eine Transfektion von embryonalen Mausfibroblasten und HEK293 Zellen (humane Nierenepithelzelllinie) mit synthetischer dsDNA (B-Form DNA) oder bakterieller nicht-CpG-DNA zur Produktion von IFN β führte (Ishii et al., 2006). Zum Anderen ist das Typ IVB Sekretionssystem der Legionellen per se in der Lage, DNA zu transferieren (Segal et al., 1998; Vogel et al., 1998). Nichtsdestotrotz wurde bisher nicht bewiesen, dass tatsächlich Legionellen-DNA als MAMP die IFN β -Produktion von Wirtszellen hervorruft. Ähnlichkeiten im Mechanismus der IFN β -Antwort auf intrazelluläre Infektionen mit *Listeria monocytogenes* und *L. pneumophila* wären denkbar, auf Grund der bestehenden Unterschiede (z.B. zytosolische Replikation versus Replikation im LCP und Gram-positiv versus Gram-negativ) sind weitere Untersuchungen diesbezüglich jedoch dringend nötig.

6.1.1.2 MAMPs der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion

Beim zweiten hier untersuchten angeborenen zellautonomen Abwehrmechanismus hingegen scheint die Erkennung des MAMPs Legionellen-Flagellin von Bedeutung zu sein. Zum Einen vermehrte sich die Flagellin-Deletionsmutante in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen besser als der Legionellen-Wildtypstamm, was auf eine generelle Bedeutung von Flagellin als MAMP bei der Restriktion der Legionellenvermehrung hinweist. Zum Anderen hatte der Einsatz von spezifischer Naip und Ipaf siRNA kaum, oder zumindest keinen signifikanten, Einfluss auf die (ohnehin verstärkte) Vermehrung von *L. pneumophila* Corby $\Delta flaA$. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass eine Erkennung von Legionellen-Flagellin bei dem Naip- und/oder Ipaf-abhängigen Restriktionsmechanismus beteiligt ist.

Unterstützt wird diese Hypothese zudem durch aktuelle Publikationen, die zeigten, dass die Erkennung von Flagellin über mNaip5 (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006) oder mIpaf (Amer et al., 2006; Lamkanfi et al., 2007; Amer et al., 2006) in Mausmakrophagen zur Hemmung des Legionellenwachstums führte. Darüber hinaus wurde Salmonellen-Flagellin als Ligand für mIpaf in der Salmonelleninfektion von Mausmakrophagen beschrieben (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006).

Zusammengenommen handelt es sich bei den hier untersuchten Mechanismen der angeborenen Immunantwort auf *L. pneumophila*-Infektion wahrscheinlich um zwei unterschiedliche Prozesse, von denen einer abhängig ist von der Erkennung von Legionellen-Flagellin und der andere möglicherweise von der Erkennung von Legionellen-DNA durch die Wirtszelle.

6.1.2 Bei der Kontrolle der Legionellenreplikation beteiligte mustererkennende Rezeptoren (PRRs)

6.1.2.1 PRRs in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion

Die Beobachtung dieser Arbeit, dass die IFN β -Produktion nach Legionelleninfektion (welche nachfolgend die Legionellenreplikation negativ kontrolliert) abhängig von einer Typ IVB Sekretionssystem-abhängigen Substrattranslokation ins Wirtszellzytosol bzw. von einer intrazellulären Vermehrung der Legionellen ist, lässt darauf schließen, dass der beteiligte PRR zytosolisch lokalisiert ist. Auf Grund dessen und der Beteiligung von IPS-1 bei der IFN β -Antwort nach Legionelleninfektion humaner Lungenepithelzellen (Ergebnis dieser Arbeit) sowie des Wissens, dass IPS-1 über homologe CARD-CARD-Interaktionen mit den bekannten, im Signalweg oberhalb lokalisierten Rezeptormolekülen RIG-I und MDA5 interagiert (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005), wurden in dieser Arbeit verschiedene intrazelluläre CARD-enhaltene PRR- oder Adaptermoleküle bzw. Moleküle, die mit einem CARD-enhaltenden Adaptermolekül interagieren, auf ihre Rolle bei der IFN β -Produktion nach Infektion mit *L. pneumophila* hin untersucht. Die in den „knock-down“-Experimenten gewonnenen Ergebnisse weisen nicht auf eine Beteiligung der PRRs RIG-I und MDA5, des Adaptermoleküls ASC sowie der mit einem CARD-enhaltenden Adaptermolekül interagierenden Moleküle PIDD (interagiert mit CARD-enhaltendem RAIDD (Tinel and Tschopp, 2004)) und Naip (interagiert möglicherweise mit ASC und/oder Ipaf (Damiano et al., 2004; Zamboni et al., 2006)) bei der IFN β -Antwort in Legionellen-infizierten Wirtszellen hin. Die Moleküle Nod27 (Nod4) und Nod5, die eventuell eine CARD-Domäne oder eine atypische CARD-Domäne zu exprimieren scheinen (Martinon and Tschopp, 2005), scheinen ebenfalls nicht involviert zu sein.

Anhand publizierter Studien können zudem Nod1 und Nod2 sowie die TLRs als möglicherweise die IFN β -Antwort auf Legionelleninfektion-vermittelnde PRRs ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass MyD88- und Trif- (zwei Hauptmediatoren der TLR-Signalwege) Doppel-„knock-out“-Zellen bzw. MyD88- und Rip2- (Rip2 als kritisches Adaptermolekül des Nod1- und Nod2-Signalweges) Doppel-„knock-out“-Zellen eine mit Wildtypzellen vergleichbare IFN β -Antwort nach Infektion mit *L. pneumophila* aufzeigten (Stetson and Medzhitov, 2006). Die TLR- und Nod1/2-Unabhängigkeit der IFN β -Produktion konnte auch für Infektionen mit dem Gram-positiven Bakterium *Listeria monocytogenes* gezeigt werden (O'Connell et al., 2005; Opitz et al., 2006a; Stockinger et al., 2004). Diese Listerienstudien, in denen extrazellulär verbleibende bzw. in der Vakuole „gefangene“ Listerienmutanten keine IFN β -Antwort auslösten (O'Riordan et al., 2002; Stockinger et al., 2002), unterstützen zudem die Hypothese, dass tatsächlich ein

zytoplasmatisch lokalisierter PRR eine IFN β -Antwort in Bakterien-infizierten Wirtszellen vermittelt. Das ebenfalls CARD-exprimierende Nod3-Molekül kann als PRR für die IFN β -Produktion nach Legionelleninfektion im verwendeten Versuchsaufbau ebenso ausgeschlossen werden, da dieser Rezeptor in den untersuchten A549 Zellen nicht exprimiert wird (Conti et al., 2005). Ipaf könnte auf Grund seiner CARD-Domäne ebenfalls als potentieller Rezeptor in Frage kommen. Da aktuelle Publikationen jedoch besagen, dass mlpaf Legionellen-Flagellin in der Legionelleninfektion erkennt (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006), Flagellin-defiziente Legionellen jedoch sehr wohl in der Lage waren, eine IFN β -Antwort in humanen Lungenepithelzellen hervorzurufen, gilt auch die Beteiligung von Ipaf an der IFN β -Antwort nach Legionelleninfektion humaner Lungenepithelzellen als unwahrscheinlich. Zudem zeigt eine aktuelle Publikation, dass die Typ I IFN-Antwort nach einer Infektion mit *L. pneumophila* in Mausmakrophagen mNaip5- und mlpaf-unabhängig ist (Coers et al., 2007). Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass sich viele Mechanismen der angeborenen Immunantwort zwischen Mensch und Maus deutlich unterscheiden und dass Makrophagen der meisten Mausstämme eine intrazelluläre Vermehrung der Legionellen verhindern, während humane Epithelzellen und Makrophagen empfänglich gegenüber der Legionelleninfektion sind (Gao et al., 1998b; Horwitz and Silverstein, 1980; Yamamoto et al., 1994). Aus diesem Grund sollten zur endgültigen Abklärung einer Beteiligung von Ipaf zukünftig Experimente im gewählten Untersuchungssystem (humane Lungenepithelzellen) durchgeführt werden.

Von der Annahme ausgehend, dass es sich bei dem die IFN β -Antwort stimulierenden MAMP tatsächlich um bakterielle DNA handelt, muss auf Grund neuester Untersuchungen DAI („DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors“) (auch DLM-1 oder ZBP1 („Z-DNA binding protein“) genannt) als möglicher Legionellen-„erkennender“ und IFN β -Produktion-„vermittelnder“ PRR in Betracht gezogen werden (Takaoka et al., 2007). DAI (DLM-1/ZBP1) ist in der Lage, DNA zu binden und wurde ursprünglich mit der Wirtsantwort auf Tumore assoziiert (Fu et al., 1999). In der aktuellen Publikation konnte gezeigt werden, dass (I) DAI-Überexpression eine Typ I IFN-Antwort auf Z- und B-Form bzw. virale und bakterielle DNA in Mausfibroblasten verstärkte, (II) DAI-„knock-down“ die Typ I IFN-Antwort auf Z- und B-Form bzw. virale und bakterielle DNA in Mausfibroblasten abschwächte, (III) DAI mit B-Form DNA interagiert und (IV) DAI mit TBK-1 und IRF3 interagiert (Takaoka et al., 2007). Zusammengenommen existieren also deutliche Hinweise dafür, dass DAI Legionellen-DNA im Wirtszellzytosol erkennen und eine IFN β -Antwort vermitteln könnte. Diese Hypothese, wie auch die Frage, ob noch weitere DNA-Rezeptoren existieren, bedarf genauer zukünftiger Untersuchungen.

Ein weiterer Schwerpunkt zukünftiger Studien könnte auch in der Rolle von dem DAI-verwandten Molekül ADAR1 („adenosine deaminase acting on RNA 1“) liegen, welches wahrscheinlich ebenfalls eine Bedeutung in der angeborenen Immunantwort hat (Nie et al., 2005).

6.1.2.2 PRRs in der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass humanes Naip und/oder Ipaf, vergleichbar mit mNaip5 und mIpaf eine Restriktion des Bakterienwachstums vermitteln. Darauf lassen zum Einen die „knock-down“-Versuche schließen, die zeigten, dass ein Ausschalten von Naip bzw. Ipaf mittels spezifischer siRNA zu einer besseren Vermehrung von *L. pneumophila* Corby führte. Zum Anderen bestätigten die Überexpressionsversuche diese Daten, da die Legionellenreplikation in Naip- und Ipaf-überexprimierenden Zellen signifikant gehemmt wurde.

Dabei ist jedoch zu beachten, dass humane Makrophagen und Epithelzellen eine stärkere Vermehrung von *L. pneumophila* (ca. 100fach nach 48 h) zulassen als Makrophagen von Mäusen, die ein „funktionelles“, Resistenz-vermittelndes mNaip5 exprimieren und somit insgesamt resistent gegenüber der Legionelleninfektion sind (z.B. C57BL/6) (nicht mehr als 10fache Vermehrung) (Derre and Isberg, 2004; Fortier et al., 2007; Lamkanfi et al., 2007; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass humanes Naip und Ipaf prinzipiell funktionell in humanen Wirtszellen, aber weniger effektiv bei der Restriktion des Legionellenwachstums sind als mNaip5 und mIpaf in Mausmakrophagen. Der Umstand, dass humanes Naip bezüglich der Aminosäuresequenz gleich „nah verwandt“ oder „weit entfernt“ von C57BL/6-Maus-Naip5 (funktionell, Resistenz-vermittelnd) und A/J-Maus-Naip5 (nicht funktionell, Mäuse sind empfänglich) ist (siehe 5.2.2 und Abbildung 5.2-2.1), könnte diese Hypothese unterstützen. Die mit den Überexpressionsexperimenten gewonnenen Daten sprechen jedoch dagegen, da hier humanes Naip ähnlich effektiv in der Restriktion der Legionellenvermehrung zu sein scheint wie C57BL/6-Maus-Naip5 (resistenter Mausstamm). Eine andere Erklärung könnte in der Verwendung unterschiedlicher *L. pneumophila*-Stämme in dieser Studie und den meisten Mausstudien liegen. So wurde hier *L. pneumophila* Corby verwendet, während in den meisten Mausstudien *L. pneumophila* Philadelphia verwendet wurde (Amer et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006). Der möglicherweise wahrscheinlichste Erklärungsansatz könnte in der Existenz und der maßgeblichen Bedeutung von weiteren, Naip- und Ipaf-unabhängigen Mechanismen (z.B. dem IFN β -System) der zellautonomen Resistenz gegenüber Legionellen in humanen Wirtszellen liegen. So wäre es möglich, dass die unterschiedliche Suszeptibilität von Maus- und humanen Zellen durch die

unterschiedliche Funktionalität eines dieser potentiellen Naip- und Ipaf-unabhängigen Mechanismen zur Restriktion der Legionellenreplikation bedingt ist (siehe 6.1.4).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass Naip in beiden untersuchten Zellarten (humane Lungenepithelzellen und Makrophagen) exprimiert wurde, Ipaf hingegen nur in humanen Makrophagen, nicht aber in Lungenepithelzellen. Nach Legionelleninfektion wurde die Proteinexpression von Naip und Ipaf in den Zellen, in denen sie exprimiert wurden, induziert. Für Mäuse konnte bereits gezeigt werden, dass mNaip5 in Makrophagen exprimiert wird, wobei die Expression in Makrophagen von empfänglichen Mäusen (A/J-Mäusen) signifikant geringer war als die in Makrophagen resistenter Mausstämme (z.B. C57BL/6). Auch hier konnte ein Anstieg der Proteinexpression nach Infektion mit *L. pneumophila* oder *Salmonella typhimurium* sowie nach Inkubation mit Latexkügelchen gezeigt werden (Diez et al., 2000).

Mausstudien zeigten eine (direkte oder indirekte) Erkennung von Flagellin über mNaip5 und mlpaf (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006). Darüber hinaus wird diskutiert, ob während einer *L. pneumophila*-Infektion Flagellin Typ IVB Sekretionssystem-abhängig in das Wirtszellzytosol und somit in die „Nähe“ vom mNaip5 und mlpaf transloziert wird (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006). Ein direktes Zusammenspiel von mNaip5 und mlpaf erscheint möglich (eventuell als Teile eines Rezeptorkomplexes), da gezeigt werden konnte, dass sowohl Naip und Ipaf als auch mNaip5 und mlpaf heterodimerisieren können (Damiano et al., 2004; Zamboni et al., 2006). Die hier gewonnenen Ergebnisse sprechen jedoch gegen eine obligate Beteiligung von Ipaf an der Naip-vermittelten Legionellenrestriktion, da auch in den A549-Lungenepithelzellen, welche kein Ipaf exprimieren, Naip eine Restriktion der Flagellin-exprimierenden Legionellen vermittelte. Zudem deutet eine aktuelle Publikation an, dass mNaip5 und mlpaf über zwei unterschiedliche Mechanismen eine Legionellenrestriktion bewirken. So wurde gezeigt, dass die mlpaf-abhängige Hemmung der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* in Mausmakrophagen Flagellin- und Caspase-1-abhängig, aber mNaip5-unabhängig erfolgte. Im Gegensatz dazu war die mNaip5-abhängige Legionellenrestriktion unabhängig von der Ipaf-vermittelten Caspase-1-Aktivierung (Lamkanfi et al., 2007).

Bisher konnte weder eine direkte Bindung von Flagellin an mNaip5 noch an mlpaf gezeigt werden. Es stellt sich somit die Frage, ob Flagellin direkt oder indirekt über ein übergeordnetes Rezeptormolekül erkannt wird. TLRs, insbesondere TLR5 als bekannter membranständiger Rezeptor für extrazelluläres Flagellin (Hayashi et al., 2001), sind an den hier diskutierten Prozessen nicht beteiligt, wie Versuche mit MyD88-„knock-out“-und TLR5-„knock-out“-Mausmakrophagen klar zeigen konnten (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006). Zusätzlich weisen weitere

Publikationen darauf hin, dass es sich um einen zytosolischen Rezeptor und nicht um einen membranständigen handelt, da direkt ins Zytosol appliziertes Flagellin erkannt wird (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006). Nichtsdestotrotz müsste streng genommen zum Einen die Bedeutung von TLR5 für die Naip- und Ipaf-vermittelte Legionellenrestriktion in humanen Zellen eventuell auch noch geprüft werden. Zum Anderen kann eine Bedeutung von TLR5 u.a. TLRs für die Legionellenrestriktion über einen separaten, Naip- und Ipaf-unabhängigen Mechanismus nicht ausgeschlossen werden, zumal gezeigt werden konnte, dass TLR5-Stop-Codon-Polymorphismen mit dem vermehrten Auftreten von Legionelleninfektionen in Menschen assoziiert waren (Hawn et al., 2003).

6.1.3 An die Erkennung der MAMPs durch PRRs anschließende Signalkaskaden, die zur Restriktion der Replikation von *Legionella* führen

6.1.3.1 Signalmoleküle in der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, dass das Adaptermolekül IPS-1 entscheidend an der Legionellen-induzierten IFN β -Produktion humaner Lungenepithelzellen beteiligt ist. So führte ein „knock-down“ von IPS-1 zur Reduktion der IFN β -Expression in *L. pneumophila*-infizierten Lungenepithelzellen und zu einer gesteigerten intrazellulären Vermehrung der Legionellen.

IPS-1 ist bisher bekannt als Adaptermolekül für die RIG-I- und MDA5-vermittelte IFN β -Aktivierung (Kawai et al., 2005; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Xu et al., 2005). Bezüglich der Beteiligung von IPS-1 bei der IFN β -Induktion durch B-Form DNA (als möglicher die IFN β -Antwort induzierender MAMP der Legionellen) existieren jedoch kontroverse Publikationen. Einerseits konnten verschiedene Studien in humanen Zellen eine Beteiligung von IPS-1 bei der Aktivierung von IFN β durch eine Stimulation mit dsDNA aufzeigen (Cheng et al., 2007; Ishii et al., 2006). Andererseits zeigte sich in IPS-1-„knock-out“-Mäusen/-Mauszellen eine intakte oder nur leicht abgeschwächte IFN β -Induktion nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder nach Stimulation mit B-DNA (Kumar et al., 2006; Soulat et al., 2006; Sun et al., 2006). Diese Diskrepanz spiegelt möglicherweise Unterschiede zwischen dem humanen und murinen angeborenen Immunsystem wieder, wie sie auch in der Expression, Regulation und Funktion anderer wichtiger Gene (z.B. den TLRs oder den p47-GTPasen) beschrieben werden (Mestas and Hughes, 2004; Taylor, 2007). Zudem besteht natürlich weiterhin die Möglichkeit, dass nicht DNA sondern ein anderes Legionellen-MAMP von einem PRR erkannt wird und über IPS-1 eine Signaltransduktion aktiviert.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die IFN β -Expression in Legionellen-infizierten humanen Lungeneithelzellen abhängig ist von dem Transkriptionsfaktor IRF3. Dafür spricht, dass IRF3 nach Legionelleninfektion in den Kern translozierte und an den endogenen *ifn β* -Promotor band. Zudem führte ein „knock-down“ von IRF3 zur Hemmung der IFN β -Expression in *L. pneumophila*-infizierten humanen Lungeneithelzellen.

Der Transkriptionsfaktor IRF3 wurde zusammen mit IRF7 als der Schlüsselregulator der Typ I IFN-Antwort auf virale Infektionen und als potenter Aktivator des *ifn β* -Gens beschrieben (Sato et al., 1998; Sato et al., 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass auch eine Listerien- oder B-DNA-induzierte IFN β -Antwort IRF3-abhängig war (O'Connell et al., 2004; Stetson and Medzhitov, 2006; Stockinger et al., 2004).

Die Proteinkinasen TBK1 und IKK β phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 und bewirken somit die IRF3- und IRF7-Kerntranslokation (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass TBK1 und IKK β die IRF3- und IRF7-Aktivierung im IPS-1-Signalweg vermitteln (Kawai et al., 2005; Kumar et al., 2006; Meylan et al., 2005; Seth et al., 2005; Sun et al., 2006; Xu et al., 2005).

Zusammenfassend kann auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit und der hier diskutierten Publikationen von folgender, die IFN β -Expression-vermittelnder Signalkaskade in Legionellen-infizierten humanen Lungeneithelzellen ausgegangen werden: Nach einer Legionelleninfektion kommt es über einen noch unbekanntem Rezeptor (siehe 6.1.2) zur Rekrutierung des Adaptermoleküls IPS-1 und anschließend zur Aktivierung der Kinasen TBK1/IKK β . TBK1/IKK β bewirken eine Phosphorylierung, Aktivierung und Kerntranslokation von IRF3 und möglicherweise IRF7 und führen somit zur *ifn β* -Gentranskription mit anschließender Translation und IFN β -Sekretion (Abbildung 6.1-1). Natürlich wurde nach Legionelleninfektion humaner Lungeneithelzellen auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert (siehe 5.1.2 Kerntranslokation und *ifn β* -Promotor-Bindung von p65), der ebenfalls wichtig für die IFN β -Expression ist. Da dies aber nicht unmittelbar Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, wird hier nicht näher darauf eingegangen, eine Zusammenfassung ist jedoch in Abbildung 6.1-1 zu sehen.

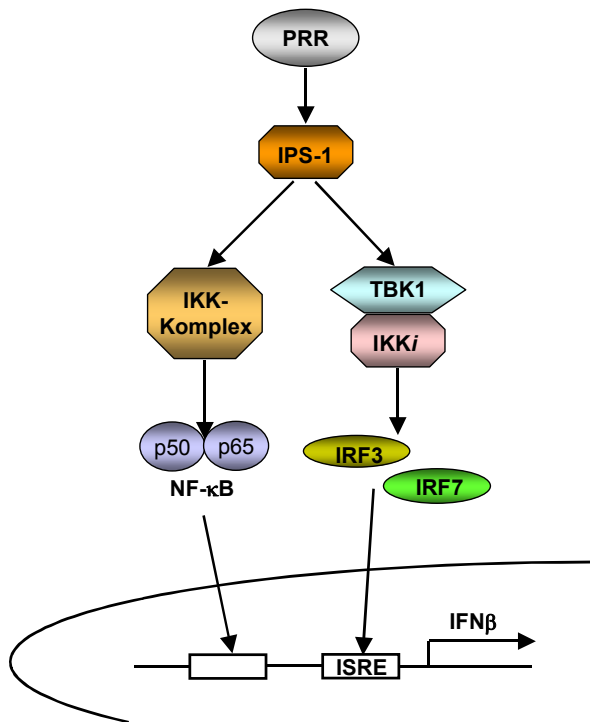


Abbildung 6.1-1 Signalweg der IFNβ-Expression nach Legionelleninfektion humaner Lungenepithelzellen.

Nach einer Legionelleninfektion kommt es über einen noch unbekanntes PRR zur Rekrutierung des Adaptermoleküls IPS-1. Anschließend kommt es einerseits zur Aktivierung der Kinasen TBK1/IKKi, zur Phosphorylierung, Aktivierung und Kerntranslokation von IRF3 und möglicherweise IRF7. Andererseits erfolgt die Aktivierung des IKK-Komplexes und somit die Aktivierung von NF-κB. Die Bindung der Transkriptionsfaktoren (IRF3/7 und NF-κB) an den *ifnβ*-Promotor führt zur Gentranskription von IFNβ.

6.1.3.2 Signalmoleküle in der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Restriktion der Legionellenvermehrung durch humanes Naip und Ipaf abhängig vom Legionellen-Flagellin gezeigt werden. Die Untersuchung der genauen Mechanismen und Signaltransduktion dieses zellautonomen Resistenzmechanismus war hingegen nicht Gegenstand dieser Untersuchungen.

Obwohl die Funktion und Signaltransduktion von murinem Naip5 und Ipaf bisher nur fragmentarisch verstanden sind und z.T. widersprüchliche Ergebnisse publiziert sind, lassen sich dennoch anhand der aktuellen Literatur zu mNaip5 und mlpaf einige Hypothesen über die Signaltransduktion und Wirkmechanismen von humanem Naip und Ipaf aufstellen. So konnte gezeigt werden, dass es nach einer Infektion mit *L. pneumophila* oder *Salmonella typhimurium* mlpaf-abhängig zur Aktivierung der Caspase-1 kam (Amer et al., 2006; Franchi et al., 2006; Mariathasan et al., 2004; Miao et al., 2006). Außerdem wurde in einigen Publikationen gezeigt, dass in Legionellen-infizierten Mausmakrophagen auch mNaip5-abhängig Caspase-1 aktiviert wurde (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006), wohingegen neuere Studien mit transgenen Mauszellen diesen Ergebnissen widersprechen (Lamkanfi et al., 2007). Demzufolge scheint die ursprüngliche Hypothese, dass nach einer Infektion mit *L. pneumophila* mNaip5 aktiviert wird und nachfolgend ein Inflammasom-Komplex aus mlpaf und Caspase-1 gebildet wird, der zur Aktivierung der Caspase-1 führt, möglicherweise widerlegt zu sein. Es scheint sich vielmehr wahrscheinlich um zwei separate Mechanismen der Restriktion der Legionellenreplikation zu handeln, wobei

der Signalweg von mNaip5 noch ungeklärt ist (Lamkanfi et al., 2007). Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass humanes Naip auch in Lungenepithelzellen, welche kein Ipaf exprimieren, die Legionellenvermehrung restringieren kann (siehe auch 6.1.2). Da Unterschiede zwischen den Publikationen möglicherweise auf unterschiedliche Untersuchungsbedingungen (niedrige MOI versus hohe MOI, früher Infektionszeitpunkt versus später Zeitpunkt, direkte versus indirekte Nachweismethoden) zurückzuführen sind, bedarf es weiterer Untersuchungen sowohl im humanen als auch im murinen System, um diese Diskrepanzen zu klären und die genauen Signalkaskaden von Naip und Ipaf zu charakterisieren.

Für humanes Naip wurde in Untersuchungen zur Rolle von Naip bei der Spinalen Muskelatrophie eine Wirkung einerseits über die Bindung und Inhibition der Caspasen-3, -7 und -9 und andererseits über die Aktivierung von JNK1 über das Adaptermolekül TAB1 („TAK1-binding protein 1“) und die Kinase TAK1 („transforming growth factor β activating kinase 1“) beschrieben (Davoodi et al., 2004; Maier et al., 2002; Sanna et al., 2002). Bezüglich JNK und *L. pneumophila* existiert allerdings auch eine Veröffentlichung, die besagt, dass eine Inhibition des JNK- (und p38-) Signalweges die Fähigkeit der Legionellen zur intrazellulären Replikation signifikant vermindert (Welsh et al., 2004). Somit scheint eine mögliche Aktivierung von JNK1 durch Naip also eher förderlich für die Legionellenvermehrung zu sein und die Legionellenrestriktion durch Naip kann mit einer Wirkung auf JNK1 eher nicht erklärt werden. Interessanter erscheinen möglicherweise Ergebnisse, welche einerseits eine Inhibition der Caspase-3 durch Naip nahe legen und andererseits zeigten, dass in Legionellen-infizierten humanen Wirtszellen Caspase-3 (nicht aber Caspase-1 wie in Legionellen-infizierten Mausemakrophagen) aktiviert wurde und Legionellen in Caspase-3-inhibierten Wirtszellen schlechter replizierten (Maier et al., 2002; Molmeret et al., 2004b; Santic et al., 2007). Es könnte somit sein, dass humanes Naip über die Hemmung der Caspase-3 inhibierend auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen wirkt. Insgesamt scheint eine zukünftige Untersuchung der Beteiligung von Caspase-1, Caspase-3 sowie von JNK bei dem in dieser Arbeit dargestellten Effekt von Naip (und eventuell auch Ipaf) auf die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* interessant und empfehlenswert.

6.1.4 Mechanismen der Resistenzvermittlung nach einer Infektion humaner Zellen mit *L. pneumophila*

Beide in dieser Arbeit untersuchten Prozesse (IPS-1-IRF3-IFN β und Naip/Ipaf) können als zellautonome angeborene intrazelluläre Resistenzmechanismen gegenüber der Legionelleninfektion verstanden werden. Darauf lassen zum Einen die Ergebnisse schließen, die zeigen, dass (I) es nach einer Infektion humaner Lungenepithelzellen mit *L. pneumophila* zur IFN β -Produktion kommt, (II) sich *L. pneumophila* schlechter in Zellen vermehrt, die mit rekombinantem IFN β behandelt wurden und (III) ein Ausschalten der für die IFN β -Produktion essentiellen Gene IPS-1 und IRF3 zu einer signifikant besseren Legionellenreplikation führt. Die verstärkte Legionellenvermehrung in IPS-1- bzw. IRF3-„knock-out“-Zellen kann zudem durch die Gabe von rekombinantem IFN β wieder aufgehoben werden. Dieses Ergebnis stellt keinen formellen Beweis, aber einen sehr starken Indiz dafür dar, dass nach einer Infektion humaner Lungenepithelzellen mit *L. pneumophila* endogen produziertes IFN β autokrin oder parakrin die intrazelluläre Legionellenvermehrung kontrolliert. Zum Anderen führt ein Ausschalten von humanem Naip und Ipaf ebenfalls zu einer gesteigerten Vermehrung und die Überexpression von Naip und Ipaf zu einer verminderten Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen und Makrophagen.

6.1.4.1 Mechanismen der IPS-1-IRF3-IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion

Die Bedeutung der Typ I IFN bei der antibakteriellen Abwehr ist bisher relativ wenig untersucht worden. Eine Studie konnte übereinstimmend mit den hier gewonnenen Ergebnissen zeigen, dass die Vermehrung von *L. pneumophila* in Mausmakrophagen durch eine Behandlung mit rekombinantem IFN α/β inhibiert und durch den Einsatz von hemmenden anti-IFN α/β -Antikörpern verstärkt wurde (Schiavoni et al., 2004). Der Effekt der anti-IFN α/β -Antikörpern deutet somit ebenfalls auf eine Rolle von endogenen Typ I IFN bei der Kontrolle der Legionellenvermehrung in Wirtszellen hin. Nach der Publikation der hier dargestellten Ergebnisse konnte die Bedeutung der Typ I IFN bei der Legionelleninfektion auch durch Versuche in IFNAR-defizienten Mausmakrophagen bestätigt werden. In diesen Zellen zeigte sich im Vergleich zu Wildtypzellen eine verstärkte Vermehrung der Legionellen (Coers et al., 2007). Darüber hinaus zeigten IFNAR-defiziente Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit extrazelluläre Keimen (Gruppe B Streptokokken, *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*) (Mancuso et al., 2007). Im Gegensatz dazu scheinen Typ I IFN „schädlich“ bei Infektionen mit *Mycobacterium* und *Listeria monocytogenes in vitro* als auch *in vivo* zu sein (Auerbuch et al., 2004; Bouchonnet et al.,

2002; Carrero et al., 2004; Manca et al., 2001; O'Connell et al., 2004; Stockinger et al., 2002).

Zusammenfassend scheinen Typ I IFN somit sowohl vorteilhaft als auch nachteilig für den Wirt während bakterieller Infektionen (wahrscheinlich abhängig vom jeweiligen Bakterium) wirken zu können. In der Legionelleninfektion *in vitro* wirken Typ I IFN protektiv.

Die Wirkungsmechanismen von IFN β bezüglich der Restriktion der intrazellulären *L. pneumophila*-Vermehrung in humanen Lungenepithelzellen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass Typ I IFN die Induktion vieler hundert ISGs bewirken (Der et al., 1998), von denen einige bereits als antibakteriell-wirkend beschrieben wurden. Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die IFN β -abhängige Legionellenrestriktion über ein oder mehrere ISG(s) vermittelt wird. Einige möglicherweise an der Restriktion der intrazellulären Legionellenreplikation beteiligten ISGs werden im Folgenden näher diskutiert:

(I) Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein IFN-induzierbares Enzym, welches die essentielle Aminosäure Tryptophan abbaut und der Abwehr von tryptophan-abhängigen Krankheitserregern dient. So kommt es z.B. während einer *Chlamydia psittaci*-Infektion zu einer IFN β -abhängigen Induktion von IDO, zu einer IDO-vermittelten Verminderung des Tryptophan-Gehaltes in den Zellen und davon abhängig zu einer Hemmung der Chlamydienreplikation (Carlin et al., 1989). Zu IDO und Legionelleninfektion gibt es noch keine Untersuchungen, es wäre aber möglich, dass es nach Legionelleninfektion von humanen Wirtszellen zu einer IFN β -IDO-vermittelten Restriktion der intrazellulären Bakterienreplikation kommt.

(II) Eine zentrale Rolle wird den Typ I IFN auch bei der NO-abhängigen (über die IFN-bedingte Induktion der iNOS) Wirtsabwehr nach Infektionen mit *Chlamydia* und *Leishmania* zugesprochen (Diefenbach et al., 1998; Gao et al., 1998a). Gegen eine Beteiligung der iNOS an der IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion spricht jedoch eine Studie, die zeigen konnte, dass die NO-Produktion scheinbar keine Rolle bei der Hemmung der intrazellulären Legionellenvermehrung in humanen Monozyten spielt (Neumeister et al., 2001).

(III) Weiterhin besitzt die NADPH-Oxidase Interferon-vermittelte antimikrobielle Aktivität. Sie führt über die Bildung von ROS zum Abtöten von Pathogenen, wie z.B. für *Coxiella burnetii* und *Candida albicans* gezeigt (Brennan et al., 2004; Donini et al., 2007). Die Bedeutung von ROS bei der Legionellenrestriktion wurde bisher noch nicht genau untersucht, es konnte jedoch gezeigt werden, dass in „resistenten“ Mausmakrophagen mehr ROS gebildet wurde als in „empfindlichen“ Mausmakrophagen (Gebran et al., 1994; Kura et al., 1994). Zudem wurde gezeigt, dass virulente *L. pneumophila* die Bildung von ROS in Monozyten und

Neutrophilen inhibieren (Jacob et al., 1994; Saha et al., 1985). Eine Rolle der NADPH-Oxidase bei der IFN β -vermittelten Legionellenrestriktion scheint also möglich.

(IV) Neben den vorher genannten liegt eine weitere mögliche Erklärung der Wirkung der Typ I IFN in einer indirekter Verstärkung der antibakteriellen Immunität durch die Produktion von IFN γ . So konnte z.B. in Infektionen mit *Salmonella typhimurium* gezeigt werden, dass es Typ I IFN-abhängig zur IFN γ -Produktion kommt (Freudenberg et al., 2002). Auch die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit extrazelluläre Bakterien (Gruppe B Streptokokken, *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli*) in IFNAR-defizienten Mäusen könnte z.T., wenn auch nicht ausschließlich, auf eine nicht adäquate Produktion von IFN γ und NO beim Fehlen des IFN α/β -Signalweges zurückzuführen sein (Mancuso et al., 2007). Für Legionellen konnte gezeigt werden, dass IFN γ NO-unabhängig das intrazelluläre Wachstum vermindert, ein Zusammenhang von Typ I IFN mit Typ II IFN und NO in der Legionelleninfektion wurde jedoch bisher nicht hergestellt (Akamine et al., 2007).

(V) Ebenfalls zu den ISGs gehören die IRGs („immunity related GTPases“), auch p47 GTPasen genannt. In der Maus existieren 23 IRGs, welche durch Typ I und/oder Typ II IFN induzierbar sind und antibakteriell auf intrazelluläre Bakterien zu wirken scheinen (Bekpen et al., 2005; MacMicking et al., 2003; Martens et al., 2005; Taylor et al., 2004). Z.B. scheint Irgm1 IFN γ -abhängig durch Autophagie intrazelluläre Mycobakterien abzutöten (Gutierrez et al., 2004). Bei der Autophagie handelt es sich um einen proteolytischen Mechanismus eukaryoter Zellen zur lysosomalen Degradation intrazellulären Materials. Aktuelle Ergebnisse deuten darauf hin, dass Autophagie neben seiner Homöostasefunktion auch als angeborener Immunmechanismus z.B. gegen *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Salmonella enterica* und *Escherichia coli* wirken kann (Amer et al., 2005; Andrade et al., 2006; Birmingham et al., 2006; Gutierrez et al., 2004; Ling et al., 2006; Singh et al., 2006). Hingegen scheinen andere Bakterien und Parasiten, wie z.B. *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Leishmania mexicana*, *Chlamydia trachomatis* und *Coxiella burnetii*, Autophagie möglicherweise zu „benutzen“, um ihre „Replikationsnischen“ zu bilden (Al Younes et al., 2004; Celli et al., 2003; Checroun et al., 2006; Dorn et al., 2001; Gutierrez et al., 2005; Pizarro-Cerda et al., 1998; Schaible et al., 1999). Die Frage, ob Autophagie ein Abwehrmechanismus gegenüber einer Legionelleninfektion darstellt oder vielmehr von den Bakterien für ihre Zwecke „missbraucht“ wird, ist momentan Gegenstand intensiver Forschung. So zeigt z.B. eine Studie, dass es nach Legionelleninfektion von Mausmakrophagen zu Induktion der Autophagie kommt, Legionellen jedoch die Reifung der Autophagosomen (Verschmelzung mit dem Lysosom) verhindern bzw. verzögern, um sich effizient vermehren zu können (in Mausmakrophagen der „empfindlichen“ A/J-Maus). In Mausmakrophagen mit funktionellem mNaip5 (resistent) hingegen kommt es zur rapiden

Induktion der Autophagie und somit zur Limitation der bakteriellen Replikation (Amer and Swanson, 2005).

Im Gegensatz zur Maus gibt es im humanen Genom nur drei *IRG* Gene, die wahrscheinlich nicht durch Interferone induzierbar sind. Aus diesem Grund wurde bisher vermutet, dass sie beim Menschen keine Rolle bei der Vermittlung einer Wirtsresistenz spielen. Aktuelle Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass zumindest auch das humane IRGM, das Homolog zum murinen *Irgm1*, Autophagie zur Elimination intrazellulärer Mycobakterien induziert (Singh et al., 2006). Eine Rolle von IRGM und der beiden anderen humanen IRGs bei der Restriktion auch anderer intrazellulärer Pathogene kann somit angenommen werden. Zusammenfassend bestehen erhebliche Wissenslücken bezüglich der (IFN β -vermittelten) intrazellulären Resistenz. Eine zukünftige Untersuchung der hier diskutierten und anderer ISGs bzw. Mechanismen bei der (IFN-vermittelten) Resistenz gegenüber Legionellen und anderen intrazellulären Pathogenen erscheint somit wünschenswert.

6.1.4.2 Mechanismen der Naip-/Ipaf-vermittelten Legionellenrestriktion

Über den Mechanismus der Restriktion der Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Wirtszellen über Naip und/oder Ipaf können anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keine tiefer gehenden Aussagen getroffen werden. Zwei Schlussfolgerungen können jedoch gemacht werden:

(I) Humanes Naip und Ipaf scheinen unabhängig voneinander wirken zu können. So vermittelte Naip auch in Lungenepithelzellen, welche kein Ipaf exprimieren, eine Restriktion der Flagellin-exprimierenden Legionellen.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu ersten Untersuchungen in Mausmakrophagen, die vermuteten, dass mNaip5 und mIpaf Komponenten des selben Signalweges sind, der einen Caspase-1-abhängigen Zelltod aktiviert und so die Legionellenrestriktion vermittelt (Zamboni et al., 2006). Allerdings zeigt eine aktuelle Studie, dass mNaip5 und mIpaf über zwei unterschiedliche Mechanismen eine Legionellenrestriktion bewirkten (Lamkanfi et al., 2007). So wurde gezeigt, dass die mIpaf-abhängige Hemmung der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* in Mausmakrophagen Flagellin- und Caspase-1-abhängig, aber mNaip5-unabhängig erfolgte. Im Gegensatz dazu war die mNaip5-abhängige Legionellenrestriktion unabhängig von der Ipaf-vermittelten Caspase-1-Aktivierung.

(II) Der Einfluss auf das intrazelluläre Legionellenwachstum wird möglicherweise nicht, wie ursprünglich vorgeschlagen (Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006), über das Auslösen eines Zelltods vermittelt. Darauf lassen die Daten des Zytotoxizitäts-Detektions-Assays schließen, welche keine Zunahme der LDH-Freisetzung (als Zeichen des Zelltods) nach einer Infektion mit *L. pneumophila* Corby oder der entsprechenden Flagellin-

Deletionsmutante anzeigten. Außerdem wurde keine Beeinflussung der LDH-Freisetzung durch das Ausschalten der bei der Restriktion beteiligten Gene Naip und Ipaf beobachtet. Unterstützt wird diese Hypothese durch aktuellen Untersuchungen in der Maus, welche eine mlpaf-vermittelte Zelltod-unabhängige und mNaip5-vermittelte Caspase-1- und Zelltod-unabhängige Restriktion des *L. pneumophila*-Wachstums zeigten (Amer et al., 2006; Lamkanfi et al., 2007). Die Diskrepanzen zwischen diesen Ergebnissen und den initialen Studien, die eine Restriktion der Legionellenvermehrung durch Aktivierung eines Caspase-1-abhängigen Zelltods vermuteten, sind möglicherweise auf unterschiedliche Untersuchungssysteme zurückzuführen. In den initialen Studien wurden deutlich höhere MOIs zur Infektion benutzt. Zudem schließen z.B. Zamboni und Kollegen nicht aus, dass die beobachteten Effekte der Caspase-1 auch auf eine Zelltod-unabhängige proteolytische Degradierung von Faktoren im Wirtszellzytosol zurückzuführen sind, welche möglicherweise wichtig für das intrazelluläre Legionellenwachstum sind (Zamboni et al., 2006). Nach Infektion von Mausmakrophagen mit *Salmonella typhimurium* konnte ebenfalls eine mlpaf-vermittelte Caspase-1-abhängige Aktivierung des Zelltods gezeigt werden (Franchi et al., 2006; Miao et al., 2006). Dieser mlpaf- und Caspase-1-abhängige Zelltod nach Salmonelleninfektion konnte auch von Amer und Kollegen nachvollzogen werden, die jedoch in derselben Studie eine mlpaf- und Caspase-1-abhängige, aber Zelltod-unabhängige Restriktion der Legionellenvermehrung zeigten (Amer et al., 2006).

Ein weiteres Modell besagt, dass mNaip5 und mlpaf nach Legionelleninfektion von Mausmakrophagen die Phagosommaturation (verstärkte Fusion der LCP mit dem Lysosom) auslösen und so zur lysosomalen Degradation der intraphagosomalen *L. pneumophila* und zur Restriktion der Replikation führen (Amer et al., 2006; Amer and Swanson, 2005; Fortier et al., 2007). Die mlpaf-vermittelte Phagosommaturation ist Caspase-1-abhängig (Amer et al., 2006; Lamkanfi et al., 2007), der genaue Wirkmechanismus wurde jedoch noch nicht aufgedeckt. Möglicherweise werden durch die aktivierte Caspase-1 bei der Formation und/oder dem Transport des LCP involvierte Wirtszellproteine oder zur Bildung des LCP benötigte bakterielle Faktoren prozessiert (Fortier et al., 2007). Die mNaip5-vermittelte verstärkte Fusion des LCP mit dem Lysosom hingegen ist wahrscheinlich Caspase-1-unabhängig (Lamkanfi et al., 2007) und wird eventuell über verstärkte Autophagy vermittelt (Amer and Swanson, 2005) (siehe auch 6.1.4.1). Ein weiterer denkbarer Wirkmechanismus könnte z.B. eine direkte Interaktion von mNaip5 mit Proteinen des Zytoskelettes oder mit den Rab-Proteinen sein, welche bereits in Zusammenhang gebracht wurden mit der Bildung des LCPs (Fortier et al., 2007; Lu and Clarke, 2005).

Zudem scheint es möglich zu sein, dass mNaip5/Naip über die Hemmung der Caspase-3 und nachfolgende Aktivierung der Phagosommaturation inhibierend auf die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen wirkt. Dafür sprechen Untersuchungen, die zeigen konnten,

dass Caspase-3 durch Naip inhibiert wurde (Maier et al., 2002), Caspase-3 essentiell für die Evasion der lysosomalen Fusion ist und Legionellen in Caspase-3-inhibierten Wirtszellen schlechter replizierten (Molmeret et al., 2004b).

Zusammengefasst scheint die Kontrolle der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* sehr viel komplexer zu sein als bisher angenommen und durch verschiedene, z.T. noch unerforschte, Mechanismen bewirkt zu werden.

Die angeborene Resistenz gegenüber einer *L. pneumophila*-Infektion (und wahrscheinlich auch anderer intrazellulärer Bakterien) scheint insgesamt von Typ I IFN- und auch Naip- und Ipaf- vermittelten Prozessen abzuhängen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um zwei unabhängige, zellautonome Abwehrmechanismen der angeborenen Immunantwort nach *Legionella pneumophila*-Infektion, die beide für die Resistenz gegen Legionelleninfektionen von Bedeutung sind. Dafür sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, dass (I) die IFN β -vermittelte Legionellenrestriktion Flagellin- und Naip-unabhängig erfolgt, (II) die Naip-vermittelte Hemmung der Legionellenvermehrung jedoch Flagellin-abhängig ist. Unterstützt wird diese Hypothese durch aktuelle Studien, die zeigten, dass nach Legionelleninfektion von Mausmakrophagen weder mNaip5 und mIpaf für die Typ I IFN-Induktion noch die Typ I IFN für die mNaip5- und mIpaf-vermittelten Prozesse von Bedeutung waren (Coers et al., 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Legionellenvermehrung sowohl in Mausmakrophagen mit nicht-funktionellem mNaip5 (aber intaktem IFN β -Signalweg) als auch in IFNAR-„knock-out“-Zellen (mit funktionellem mNaip5 und mIpaf) zu beobachten war (Coers et al., 2007). Nichtsdestotrotz können Verbindungen zwischen den zwei „Systemen“ nicht ausgeschlossen werden. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Typ I IFN-Antwort nach *Francisella tularensis*- und *Listeria monocytogenes*-Infektion essentiell war für die Aktivierung des Caspase-1-Inflammasom-vermittelten Zelltods (Henry et al., 2007). Zusammengefasst bedarf es weiterer Untersuchungen bezüglich der Wirkmechanismen von IFN β und Naip und Ipaf und deren Interaktion.

Desweiteren deuten aktuelle Studien auf eine Bedeutung von Typ II IFN, TNF α , Nramp1 und antimikrobiellen Peptiden bei der angeborenen Resistenz gegenüber Legionellen hin (Akamine et al., 2007; Peracino et al., 2006; Radtke and O'Riordan, 2006; Schiavoni et al., 2004) und sollten deshalb ebenfalls in zukünftigen Überlegungen und Untersuchungen zur angeborenen intrazellulären Resistenz gegenüber Legionellen mit einbezogen werden.

6.2 Diskussion der eingesetzten Materialien und Methoden

6.2.1 Auswahl der Zelllinien

Obwohl bekannt ist, dass sich *L. pneumophila* als Erreger schwerer Pneumonien effizient in humanen Lungenepithelzellen vermehren kann, die über 95% der Lungenoberfläche darstellen und direkt mit eindringenden Pathogenen interagieren können (Gao et al., 1998b), weiß man bisher wenig über diese Zellen als Effektorsystem der angeborenen Immunantwort nach Legionelleninfektion. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit die humane Alveolar Typ II Epithelzelllinie A549 verwendet. Zudem wurde zur Bearbeitung der zweiten Fragestellung (Rolle der humanen Orthologe Naip und Ipaf in der Legionelleninfektion im Vergleich zu den in Mausmakrophagen beschriebenen mNaip5 und mlpaf) zur besseren Vergleichbarkeit mit den publizierten Ergebnissen zusätzlich die humane Monozytenzelllinie THP-1 verwendet.

Bei beiden handelt es sich um etablierte Zelllinien, die über die „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ erworben und auf Grund ihrer Tumorgenese über lange Zeit ohne Probleme für die *in vitro* Kultivierung verwendet werden können (Giard et al., 1973; Tsuchiya et al., 1980). Für die Überexpressionsexperimente wurden A549 Zellen verwendet, da die cDNA-Transfektionseffizienz im Vergleich zu den THP-1 Zellen hier höher (55%) ist. Im Gegensatz zur DNA-Transfektion lassen sich beide Zelllinien sehr gut mit siRNAs transfizieren (Transfektionseffizienz > 90%).

Mit Hilfe von PMA können monozytären THP-1 Zellen zu Makrophagen-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden, die mit primären Makrophagen vergleichbare Eigenschaften besitzen (Auwerx, 1991). Neben dem Einfluss auf die Differenzierung hat PMA jedoch auch einen aktivierenden Effekt, so dass ein eventueller Einfluss auf die Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann. Desweiteren sind, trotz der Praktikabilität, mit Tumorzellen gewonnene Ergebnisse generell kritisch zu betrachten, da veränderte biologische Reaktionen im Verhältnis zu primären Zellen nicht auszuschließen sind. Aus diesen Gründen wurden zentrale Versuche zur Rolle von humanem Naip und Ipaf in primären humanen Makrophagen verifiziert. Da diese Versuche schwer zu standardisieren (Unterschiede bei der Gewinnung, Ausdifferenzierung und spenderspezifische Einflüsse) und aus diesem Grund höhere Versuchszahlen nötig sind, wurden nicht alle Experimente mit primären Makrophagen wiederholt. Für zukünftige Versuche ist zudem geplant, in A549 Zellen gewonnene Ergebnisse zur Bedeutung der Typ I IFN in der Legionelleninfektion in primären humanen Makrophagen und eventuell auch in primären humanen Lungenepithelzellen zu bestätigen.

6.2.2 Auswahl der Legionellenstämme

Von den 48 bekannten *Legionella*-Spezies verursacht die Spezies *L. pneumophila* 90% der humanen Legionellosefälle (Marston et al., 1994; Doleans et al., 2004). Aus diesem Grund wurde für die Versuche der vorliegenden Arbeit *L. pneumophila* verwendet. Speziell kamen dabei Wildtypstämme und daraus hergestellte Mutanten der Serogruppe 1 zum Einsatz, da diese bei 95% der durch *L. pneumophila* hervorgerufenen Krankheitsfälle beteiligt ist (Doleans et al., 2004). Da bekannt ist, dass *L. pneumophila* ein heterogenes Genom besitzt und 10-14% der Gene Bakterienstamm-spezifisch sind (Cazalet et al., 2004), wurden Grundbeobachtungen mit mehreren Wildtypstämmen verifiziert. So wurde z.B. die IFN β -Produktion von humanen Lungenepithelzellen nach *L. pneumophila*-Infektion mit drei verschiedenen Wildtypstämmen (130b, Corby, JR32) untersucht. Da hier keine wesentlichen Unterschiede festzustellen waren, kann darauf geschlossen werden, dass es sich um Spezies-spezifische und nicht Bakterienstamm-spezifische Ergebnisse handelt. Die weiteren Experimente wurden daraufhin exemplarisch mit dem Wildtypstamm *L. pneumophila* 130b durchgeführt, wobei die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen und der Einfluss von IFN β auf die Legionellenreplikation noch einmal mit einem zweiten Wildtypstamm (Corby) bestätigt wurden. Im zweiten Teil der Arbeit zur Rolle von humanem Naip und Ipaf bei der Legionelleninfektion wurden *L. pneumophila* Corby und JR32 eingesetzt, da hier spezifische Flagellin- und Typ IVB Sekretionssystem-Deletionsmutanten zur Verfügung standen. Die im Zusammenhang mit der Rolle von mNaip5 und mIpaf bei der Legionelleninfektion von Mausmakrophagen publizierten Untersuchungen in Mausmakrophagen wurden ebenfalls mit dem Wildtyp *L. pneumophila* Corby und dazugehöriger Mutante (Akamine et al., 2007) sowie mit einem Weiteren (*L. pneumophila* Philadelphia) durchgeführt (Amer et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006). Zum Ausschluss des Einflusses des gewählten Wildtypstammes auf die gewonnenen Ergebnisse ist zukünftig eine Bestätigung von Schlüsselexperimenten mit einer andere *L. pneumophila* Flagellin-Deletionsmutante empfehlenswert.

6.2.3 Zytotoxizitäts-Detektions-Assay

Beim Zytotoxizitäts-Detektions-Assay wird die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) über die Menge des umgesetzten Substrats (Tetrazoliumsalz INT) in farbiges Formazan quantifiziert. Dieses Enzym kommt praktisch in jeder Zelle gelöst im Zytoplasma vor und wird beim Verlust der Zellmembranintegrität, z.B. bei zerstörten bzw. sterbenden Zellen, freigesetzt. Im Gegensatz zur traditionellen aber teuren und gefährlichen Methode der Messung der Freisetzung von radioaktiv gekennzeichneten Isotopen (^3H und ^{51}Cr) ist dieser Assay schnell, einfach und gefahrlos durchzuführen, dabei aber genauso präzise, denn die

LDH-Freisetzung korreliert mit der ^{51}Cr -Freisetzung (Decker and Lohmann-Matthes, 1988; Korzeniewski and Callewaert, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde der Zelltod mit Hilfe des Zytotoxizitäts-Detektions-Assay überprüft, da dieser ebenfalls in den Untersuchungen zum Einfluss vom mNaip5 und mIpaf auf den Zelltod in Mausmakrophagen verwendet wurde (Amer et al., 2006; Molofsky et al., 2006; Ren et al., 2006; Zamboni et al., 2006). Im gewählten Versuchsaufbau muss jedoch kritisch angemerkt werden, dass die Messung der LDH-Freisetzung eventuell nicht sensitiv genug gewesen ist. Da niedrige MOIs bei der Legionelleninfektion benutzt wurden, war auch nach 48 h nur ca. jede 20. Wirtszelle infiziert, so dass eventuelle Unterschiede in der LDH-Freisetzung möglicherweise maskiert wurden. Zur Bestätigung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wären demzufolge weiterführende Untersuchungen mit anderen, direkten Methoden (z.B. Durchflusszytometerbasierte lebend/tot-Assays) ratsam.

6.2.4 RNAi- („RNA interference“) Experimente

RNAi wurde erstmals beschrieben als posttranskriptionelles Ausschalten von Genen in Pflanzen (Napoli et al., 1990). Das Prinzip ist die sequenzspezifische Degradierung von mRNA sowie ein negativer Einfluss auf die Translation durch dsRNA, die homolog zur Zielsequenz ist. Aus zellulären dsRNAs wird durch Spaltung durch das Enzym Dicer siRNA produziert und eine siRNA-Duplex gebildet. Diese Duplex wird anschließend durch eine RNA-Helikase entwunden und in einen Komplex namens RISC („RNA induced silencing complex“) eingebaut. RISC leitet die „sense“ siRNA via Sequenzspezifität zur Ziel-mRNA, was zur Spaltung der Ziel-mRNA und damit zur Hemmung der Expression des Zielgens führt (Mak, 2005). 2001 konnte erstmals gezeigt werden, dass synthetische 21 Basenpaare große doppelsträngige siRNA (wie die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs), die in Säugetierzellen transfiziert wurde, den Effekt der Dicer-Produkte imitierte (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001a). Diese Methode hat sich in den letzten Jahren zu einer sehr guten experimentellen Möglichkeit zur Untersuchung des Einflusses eines gezielten Ausschaltens von Zielgenen entwickelt.

Auf Grund der Komplexität dieser Methode ist die Gefahr von Artefakten jedoch relativ groß, so dass interne Kontrollen von großer Bedeutung sind. Zum Einen besteht die Möglichkeit eines Einflusses auf das zu untersuchende Gen durch die gewählte Transfektionsmethode an sich und nicht durch die spezifische siRNA. Aus diesem Grund wurden immer auch Versuche mit Zellen mit Kontroll siRNA, das heißt mit Nonsense siRNA, durchgeführt, um zu bestätigen, dass in diesen Zellen kein Einfluss auf das Zielgen zu sehen ist. Um bei den Vermehrungsversuchen einen Einfluss der Transfektion auf die Replikation von *L. pneumophila* auszuschließen, wurden in Vorabversuchen die Legionellenvermehrung in

unbehandelten Zellen und Kontroll siRNA transfizierten Zellen verglichen und keine Unterschiede festgestellt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass einige siRNAs über die Aktivierung von TLR7 die Typ I IFN-Produktion induzierten (Hornung et al., 2005). Diese unspezifische IFN β -Induktion könnte unabhängig vom Effekt der Expressionshemmung des Zielgens einen negativen Einfluss auf die Legionellenvermehrung haben (wie diese Arbeit zeigt). Aus diesem Grund wurde vorab auf mRNA- und Proteinebene mittels RT-PCR und IFN β -ELISA ausgeschlossen, dass die verwendeten siRNAs zur IFN β -Produktion führten. Eine weitere Fehlerquelle liegt in den sogenannten „off-target effects“. Dabei kommt es zur Inhibition von Nicht-Zielgenen durch den „antisense“ siRNA-Strang, da eine Übereinstimmung von 10 bis 14 Aminosäuren für eine Bindung an die mRNA ausreichen kann (nach Vortrag von Gunter Meister, TSIS 2007, München). Um dies ausschließen zu können, wurde der Einfluss der verwendeten siRNAs auf die Expression des Nicht-Zielgens IL-8 mit überprüft. Dabei war zu sehen, dass es zu einer Hemmung der Expression der Zielgene, nicht aber von IL-8 durch die verwendeten siRNAs kam. Im zweiten Teil dieser Arbeit kann weiterhin von einem spezifischen Effekt der Naip und Ipaf siRNAs ausgegangen werden, da kaum ein Einfluss auf die Vermehrung der Flagellin-Deletionsmutante zu sehen war, wie es bei einem unspezifischen Effekt auf die Legionellenreplikation zu vermuten wäre. Zudem wurden die siRNA-Ergebnisse des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit durch Überexpressionsexperimente bestätigt. Zur Untermauerung der siRNA-Ergebnisse des ersten Teils dieser Arbeit wären zukünftig eventuell ebenfalls Überexpressionsexperimente empfehlenswert.

6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Mechanismen der zellautonomen intrazellulären angeborenen Immunabwehr gegen *L. pneumophila*-Infektionen in humanen Zellen aufgezeigt: Zum Einen aktiviert die Legionelleninfektion eine IPS-1-IRF3 Signalkaskade und nachfolgend eine IFN β -Produktion, welche der Legionellenvermehrung entgegenwirkt. Zum Anderen vermitteln Naip und Ipaf über die Detektion von *Legionella*-Flagellin eine Restriktion der Legionellenvermehrung.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die IFN β -Produktion humaner Lungenepithelzellen nach einer Infektion mit *L. pneumophila* abhängig vom Typ IVB Sekretionssystem der Legionellen, aber unabhängig von Flagellin ist. Zukünftig wäre es interessant herauszufinden, welche *L. pneumophila*-Struktur durch welchen Wirtsrezeptor erkannt wird und eine IFN β -Antwort hervorruft. Auf Grund aktueller Publikationen sollte dabei v.a. die Hypothese einer Erkennung von Legionellen-DNA über das zytosolische Wirtszellmolekül DAI/ZBP1 geprüft werden (Stetson and Medzhitov, 2006; Takaoka et al., 2007). Außerdem sollten weitere Substrate des Typ IVB Sekretionssystems Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein, deren Erkennung möglicherweise über noch nicht charakterisierte zytoplasmatische Rezeptormoleküle erfolgt oder die anderweitig die IFN β -Produktion der Wirtszellen beeinflussen. Über 30 Proteinsubstrate des *L. pneumophila* Typ IVB Sekretionssystems wurden mittlerweile identifiziert. Während für einige eine Bedeutung für die Legionellenreplikation aufgezeigt wurde (z.B. SdhA), ist die Funktion vieler anderer zum großen Teil noch ungeklärt (Laguna et al., 2006; Ninio and Roy, 2007).

In dieser Arbeit konnte ebenfalls demonstriert werden, dass Naip und Ipaf eine Restriktion der Legionellenvermehrung in humanen Zellen vermitteln. Dieser Mechanismus ist jedoch im Gegensatz zur IFN β -vermittelten Kontrolle der Replikation von *L. pneumophila* Flagellin-abhängig. Fortführend wäre es interessant zu untersuchen, ob Naip und Ipaf direkt als Rezeptoren für *Legionella*-Flagellin fungieren oder ob es sich um Adaptermoleküle handelt und übergeordnete, noch nicht charakterisierte Flagellin-Rezeptoren (zusätzlich zu dem hier nicht beteiligten TLR5) existieren. Zudem wäre es interessant herauszufinden, ob es ein Zusammenwirken der beiden Moleküle gibt oder ob es sich um zwei separate Mechanismen handelt.

Von großem Interesse wäre weiterhin eine Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen der in dieser Arbeit untersuchten Wege der Resistenzvermittlung.

Im Falle von IFN β sollte zuerst ein Hauptaugenmerk auf ISGs gelegt werden, die durch eine Bindung von IFN β an den IFN α/β -Rezeptor und der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges

induziert werden. Dabei wäre es interessant herauszufinden, welche der ISGs nach einer Infektion humaner Zellen mit *L. pneumophila* hochreguliert werden und ob diese eine Rolle bei der Restriktion der Legionellenvermehrung spielen. Einige potentielle Kandidaten wurden bereits in 6.1.4 diskutiert.

Ebenso gilt es zukünftig die genauen Mechanismen der Naip- und Ipaf-vermittelten Resistenz in humanen Zellen zu untersuchen. Besonders lohnenswert wäre hierbei die folgenden Hypothesen der Wirkungsweise von humanem Naip und Ipaf zu prüfen: (I) einen Einfluss auf die Phagosommaturation, eventuell über (a) Autophagie, (b) Caspase-1- oder (c) Caspase-3-Aktivierung oder (II) eine Vermittlung eines Caspase-1-abhängigen oder -unabhängigen Zelltods.

In den meisten Mausstämmen verhindern potente angeborene Abwehrmechanismen (mNaip5, mlpaf, Typ I und Typ II IFN) eine Erkrankung der Maus nach Legionelleninfektion. Mausstämme, in denen eines dieser Abwehrsysteme nicht funktioniert (wie z.B. das nicht-funktionelle mNaip5 der A/J-Maus) zeigen eine stark abgeschwächte Resistenz gegenüber Legionellen und erkranken nach Infektion mit *L. pneumophila*. Dies zeigt die große Bedeutung dieser zellautonomen angeborenen Abwehrmechanismen in der Legionelleninfektion. Im Gegensatz zu den meisten Mausstämmen zeigen (zumindest einige) Menschen trotz offensichtlich funktionellem Naip-, Ipaf- und IFN-Systems (Ergebnisse dieser Arbeit) eine Empfänglichkeit für Infektionen mit *L. pneumophila*, indem sie an dem akuten, fiebrigen, aber selbstlimitierenden Pontiac-Fieber oder einer schweren Pneumonie, der so genannten Legionärskrankheit, erkranken (Fraser et al., 1977; Glick et al., 1978). Erkrankungen sowie Schweregrad sind zum Teil abhängig von Risikofaktoren wie Alter, Rauchen, chronische Lungenerkrankungen, Krebs und Immunsuppression. Andererseits treten auch bei gesunden unter 50 Jahre alten Personen schwere Formen der Legionellenpneumonie auf (Falguera et al., 2001). Zusammengenommen lassen sich hieraus mindestens zwei Hypothesen über die Gründe der „Empfänglichkeit“ mancher Menschen gegenüber der Legionelleninfektion aufstellen: Zum einen wäre es möglich, dass weitere, noch nicht genau charakterisierte (angeborene) Abwehrmechanismen zur Resistenz der Maus gegenüber der Legionelleninfektion beitragen, die im Menschen nicht oder nur abgeschwächt funktionell sind (z.B. verfügen Mäuse über > 20 IRGs, Menschen nur über 3 IRGs; die Bedeutung der IRGs für die Legionelleninfektion in der Maus und in Menschen ist bisher nicht untersucht). Zum Anderen ist es vorstellbar, dass, ähnlich zu den verschiedenen mNaip5-Allelen der C57BL/6- und A/J-Mäuse, Polymorphismen in Naip oder anderen Genen der angeborenen Immunantwort in Menschen existieren und die Empfänglichkeit bzw. Resistenz gegenüber der Legionelleninfektion und deren Ausprägung (Pontiac-Fieber versus Legionärskrankheit) maßgeblich beeinflussen. Ergebnisse über Polymorphismen in den

PRR-kodierenden Genen *tlr4* und *tlr5*, die mit einer Resistenz oder Empfänglichkeit gegenüber Legionelleninfektion in Zusammenhang gebracht wurden, unterstützen diese Hypothese potentiell (Hawn et al., 2003; Hawn et al., 2005). In Anbetracht dessen wäre es sehr interessant, in zukünftige Studien zu untersuchen, ob Variationen im humanen *naip*-Gen existieren und ob diese die Empfänglichkeit für Legionelleninfektionen und/oder die verschiedenen Krankheitsbilder beeinflussen.

Noch einmal zusammengefasst zeigt die vorliegende Arbeit, dass bei der Kontrolle der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* in humanen Zellen mindestens zwei verschiedene Mechanismen der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Neben diesen beiden Systemen scheinen jedoch weitere Resistenzmechanismen wichtig in der Legionelleninfektion zu sein. So wurde auch für $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\gamma$ -abhängige Prozesse, $\text{TNF}\alpha$, Nramp1 und antimikrobielle Peptide eine Rolle bei der Restriktion der Legionellenreplikation beschrieben oder vermutet (Akamine et al., 2007; Coers et al., 2007; Opitz et al., 2006b; Peracino et al., 2006; Radtke and O'Riordan, 2006; Schiavoni et al., 2004). Für das volle Verständnis dieser komplexen Resistenzmechanismen und der Bedeutung für die *L. pneumophila*-Infektion (und wahrscheinlich auch Infektionen durch andere intrazelluläre Bakterien) sollten zukünftige Arbeiten, auch im Hinblick auf eventuelle neue Therapieansätze, auf diese und weitere Wege der angeborenen Immunabwehr und das mögliche Zusammenspiel dieser Faktoren fokussieren.

In jedem Fall sind weitere Versuche im humanen System zur Vervollständigung des fragmentarischen Wissens über die angeborene Immunantwort, speziell auf intrazelluläre Bakterien, unumgänglich, da („knock-out“-) Mausstudien zwar einen einmaligen Beitrag zum Verständnis biologischer Prozesse leisten, viele Abwehrmechanismen des Immunsystems sich aber beträchtlich zwischen Mensch und Maus unterscheiden.

7 Zusammenfassung / Summary

7.1 Zusammenfassung

Nicht-TLR-abhängige Mechanismen der angeborenen Immunantwort auf *Legionella pneumophila* in humanen Wirtszellen

Eindringende Pathogene, wie z.B. das fakultativ intrazelluläre Gram-negative Bakterium *Legionella pneumophila*, werden durch das wirtseigene angeborene Immunsystem bekämpft. Dieses erkennt Mikroorganismen mittels sogenannter mustererkennender Rezeptoren, wie z.B. den Toll-like Rezeptoren (TLRs), und initiiert nachfolgende Abwehrmechanismen. Aktuelle Studien zeigen eine entscheidende Bedeutung von Typ I Interferonen in bakteriellen Infektionen an. Darüber hinaus demonstrieren genetische Studien in verschiedenen Mausstämmen, dass verschiedene Allele des Nod-like Rezeptor *mnaip5*-Gens entscheidend die Resistenz oder Empfänglichkeit von Mausmakrophagen – sowie davon abhängig von Mäusen *in vivo* - gegenüber der *L. pneumophila*-Infektion beeinflussen. Während also insgesamt in den meisten Mausstämmen leistungsfähige angeborene Abwehrmechanismen eine Resistenz gegenüber *L. pneumophila*-Infektionen vermitteln, können Menschen schwere Pneumonien nach einer Legionelleninfektion entwickeln.

In dieser Arbeit wurden zwei Mechanismen der TLR-unabhängigen angeborenen intrazellulären Resistenz gegenüber *L. pneumophila* untersucht (siehe Abbildung 7.1-1). Es konnte zum Einen gezeigt werden, dass Legionellen-infizierte Lungenepithelzellen abhängig vom Typ IVB Sekretionssystem der Legionellen sowie der Wirtszellproteine IPS-1 und IRF3 IFN β produzierten. Endogen produziertes oder exogen zugegebens IFN β führte zu einer Restriktion der intrazellulären Legionellenvermehrung. Zum Anderen konnte mittels „knock-down“- und Überexpressionsexperimenten gezeigt werden, dass eine Erkennung von Legionellen-Flagellin durch die Wirtszellmoleküle Naip und Ipaf in humanen Makrophagen und Lungenepithelzellen ebenfalls zu einer zellautonomen Abwehr gegenüber *L. pneumophila* führte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Existenz zweier funktionsfähiger Rezeptor-vermittelter aber TLR-unabhängiger Mechanismen der angeborenen Immunabwehr gegen *Legionella pneumophila* in humanen Zellen an, die zu einer (partiellen) Restriktion der Legionellenreplikation führen. In zukünftigen Studien bleibt zu klären, ob Polymorphismen in diesen Abwehrsystemen oder Unterschiede in zusätzlichen Immunmechanismen die unterschiedliche Empfänglichkeit von (den meisten) Mäusen und dem Menschen begründen.

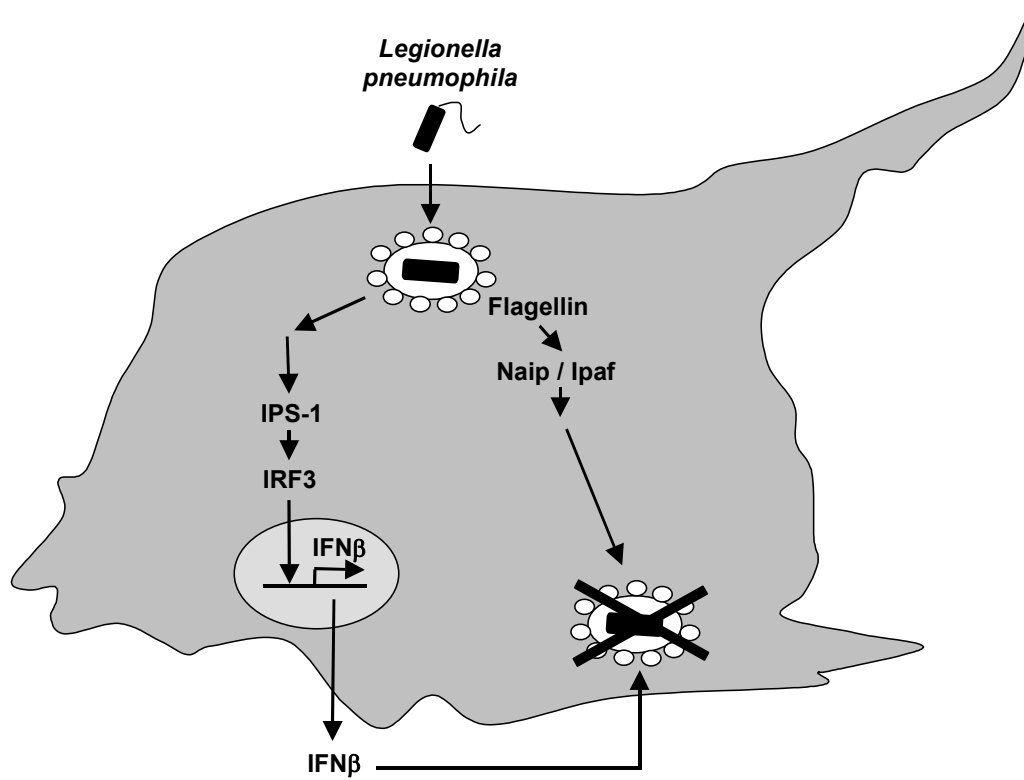


Abbildung 7.1-1: Zusammenfassung der in der Arbeit untersuchten angeborenen Abwehrmechanismen gegen eine *L. pneumophila*-Infektion in humanen Zellen

7.2 Summary

TLR-independent innate defence against *Legionella pneumophila* in human host cells

The innate immunity is the first line defence against invading pathogens, such as the facultative intracellular, Gram-negative bacterium *Legionella pneumophila*. It senses microorganisms by so-called pattern recognition receptors, e.g. Toll-like receptors (TLRs), and initiates subsequent defence mechanisms. Recent studies indicated an important role of type I interferons in bacterial infections. Moreover, genetic studies in different mice strains demonstrated that different alleles of the Nod-like receptor gene *mnaip5* determine whether macrophages restrict or support intracellular replication of *L. pneumophila* and whether a mouse is resistant or susceptible to *Legionella* infection. While in most mice strains powerful innate immune mechanisms mediate resistance to *Legionella* infection, humans can develop severe pneumonia.

In this study two mechanisms of the TLR-independent innate intracellular resistance against *L. pneumophila* were examined (see figure 7.2-1). On the one hand it was shown that *Legionella* infected lung epithelial cells produced IFN β dependent on the *Legionella* type IVB secretion system and the host cell proteins IPS-1 and IRF3. Endogenously produced IFN β or exogenously added IFN β restricted the intracellular *Legionella* replication. On the other hand knock-down and overexpression experiments demonstrated that recognition of *Legionella* flagellin by the host cell molecules Naip and Ipaf also induced cell autonomous resistance against *L. pneumophila* in human macrophages and lung epithelial cells.

Taken together the results of this work indicate the existence of two functional, receptor-mediated but TLR-independent innate immune mechanisms which result in (partial) growth restriction of *Legionella* in human cells. In future studies it might be interesting to examine whether polymorphisms in genes involved in these defence systems or differences in additional immune mechanisms are responsible for the different susceptibilities of (most) mice strains and humans.

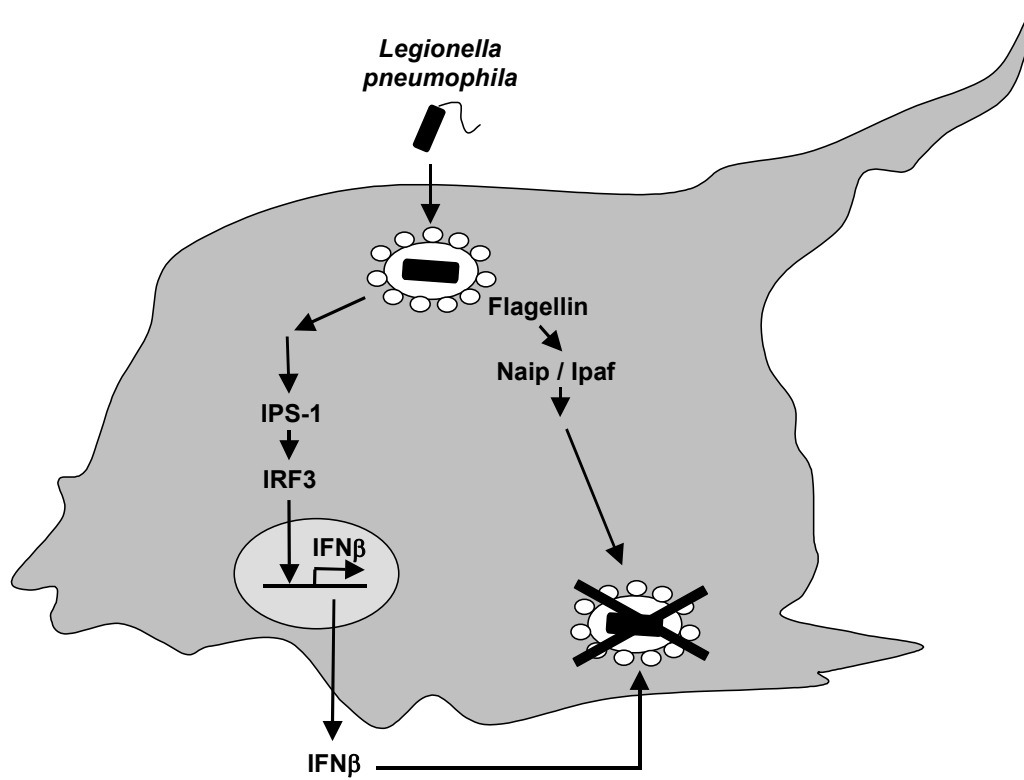


Figure 7.2-1: Summary of the examined innate defence mechanisms against *L. pneumophila* in human cells.

8 Referenzen

- Aderem,A., and Ulevitch,R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Agostini,L., Martinon,F., Burns,K., McDermott,M.F., Hawkins,P.N., and Tschopp,J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity* **20**, 319-325.
- Akamine,M., Higa,F., Haranaga,S., Tateyama,M., Mori,N., Heuner,K., and Fujita,J. (2007). Interferon-Gamma Reverses the Evasion of Birc1e/Naip5 Gene Mediated Murine Macrophage Immunity by Legionella pneumophila Mutant Lacking Flagellin. *Microbiol. Immunol.* **51**, 279-287.
- Akira,S., and Takeda,K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499-511.
- Akira,S., Uematsu,S., and Takeuchi,O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
- Akiyama,Y., Griffith,R., Miller,P., Stevenson,G.W., Lund,S., Kanapa,D.J., and Stevenson,H.C. (1988). Effects of adherence, activation and distinct serum proteins on the in vitro human monocyte maturation process. *J. Leukoc. Biol.* **43**, 224-231.
- Al Younes,H.M., Brinkmann,V., and Meyer,T.F. (2004). Interaction of Chlamydia trachomatis serovar L2 with the host autophagic pathway. *Infect. Immun.* **72**, 4751-4762.
- Albert-Weissenberger,C., Cazalet,C., and Buchrieser,C. (2007). Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 432-448.
- Alli,O.A., Gao,L.Y., Pedersen,L.L., Zink,S., Radulic,M., Doric,M., and Abu,K.Y. (2000). Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* **68**, 6431-6440.
- Amer,A., Franchi,L., Kanneganti,T.D., Body-Malapel,M., Ozoren,N., Brady,G., Meshinchi,S., Jagirdar,R., Gewirtz,A., Akira,S., and Nunez,G. (2006). Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* **281**, 35217-35223.
- Amer,A.O., Byrne,B.G., and Swanson,M.S. (2005). Macrophages rapidly transfer pathogens from lipid raft vacuoles to autophagosomes. *Autophagy* **1**, 53-58.
- Amer,A.O., and Swanson,M.S. (2005). Autophagy is an immediate macrophage response to Legionella pneumophila. *Cell. Microbiol.* **7**, 765-778.
- Anderson,K.V., Jurgens,G., and Nusslein-Volhard,C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**, 779-789.
- Andrade,R.M., Wessendarp,M., Gubbels,M.J., Striepen,B., and Subauste,C.S. (2006). CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* **116**, 2366-2377.
- Andreesen,R., Brugger,W., Scheibenbogen,C., Kreutz,M., Leser,H.G., Rehm,A., and Lohr,G.W. (1990). Surface phenotype analysis of human monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol.* **47**, 490-497.
- Andrejeva,J., Childs,K.S., Young,D.F., Carlos,T.S., Stock,N., Goodbourn,S., and Randall,R.E. (2004). The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 17264-17269.
- Ank,N., West,H., and Paludan,S.R. (2006). IFN-lambda: novel antiviral cytokines. *J. Interferon Cytokine Res.* **26**, 373-379.
- Aragon,V., Kurtz,S., Flieger,A., Neumeister,B., and Cianciotto,N.P. (2000). Secreted enzymatic activities of wild-type and piID-deficient Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* **68**, 1855-1863.

Referenzen

- Auerbuch,V., Brockstedt,D.G., Meyer-Morse,N., O'Riordan,M., and Portnoy,D.A. (2004). Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 200, 527-533.
- Ausubel,F.M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* 6, 973-979.
- Auwerx,J. (1991). The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* 47, 22-31.
- Azuma,M. (2006). Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J. Periodontal Res.* 41, 361-373.
- Banerji,S., Bewersdorff,M., Hermes,B., Cianciotto,N.P., and Flieger,A. (2005). Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 73, 2899-2909.
- Barnes,B., Lubyova,B., and Pitha,P.M. (2002). On the role of IRF in host defense. *J. Interferon Cytokine Res.* 22, 59-71.
- Bekpen,C., Hunn,J.P., Rohde,C., Parvanova,I., Guethlein,L., Dunn,D.M., Glowalla,E., Leptin,M., and Howard,J.C. (2005). The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* 6, R92.
- Bellinger-Kawahara,C., and Horwitz,M.A. (1990). Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* 172, 1201-1210.
- Berger,K.H., Merriam,J.J., and Isberg,R.R. (1994). Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila* dotA gene. *Mol. Microbiol.* 14, 809-822.
- Beutler,B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263.
- Beutler,B. (2005). The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics* 57, 385-392.
- Beutler,B., Jiang,Z., Georgel,P., Crozat,K., Croker,B., Rutschmann,S., Du,X., and Hoebe,K. (2006). Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 353-389.
- Birmingham,C.L., Smith,A.C., Bakowski,M.A., Yoshimori,T., and Brumell,J.H. (2006). Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J. Biol. Chem.* 281, 11374-11383.
- Bogdan,C., Mattner,J., and Schleicher,U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. *Immunol. Rev.* 202, 33-48.
- Boraschi,D., and Tagliabue,A. (2006). The interleukin-1 receptor family. *Vitam. Horm.* 74, 229-254.
- Boshuizen,H.C., Neppelenbroek,S.E., van Vliet,H., Schellekens,J.F., Den Boer,J.W., Peeters,M.F., and Conyn-Van Spaendonck,M.A. (2001). Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires disease. *J. Infect. Dis.* 184, 515-518.
- Bouchonnet,F., Boechat,N., Bonay,M., and Hance,A.J. (2002). Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.* 70, 3020-3025.
- Boyden,E.D., and Dietrich,W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat. Genet.* 38, 240-244.
- Brennan,R.E., Russell,K., Zhang,G., and Samuel,J.E. (2004). Both inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase contribute to the control of virulent phase I *Coxiella burnetii* infections. *Infect. Immun.* 72, 6666-6675.
- Brenner,D.J., Steigerwalt,A.G., and McDade,J.E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90, 656-658.
- Brown,G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 33-43.

Referenzen

- Brown,G.D., Taylor,P.R., Reid,D.M., Willment,J.A., Williams,D.L., Martinez-Pomares,L., Wong,S.Y., and Gordon,S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* *196*, 407-412.
- Bukholm,G., Berdal,B.P., Haug,C., and Degre,M. (1984). Mouse fibroblast interferon modifies Salmonella typhimurium infection in infant mice. *Infect. Immun.* *45*, 62-66.
- Carlin,J.M., Borden,E.C., and Byrne,G.I. (1989). Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. *J. Interferon Res.* *9*, 329-337.
- Carrero,J.A., Calderon,B., and Unanue,E.R. (2004). Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. *J. Exp. Med.* *200*, 535-540.
- Cazalet,C., Rusniok,C., Bruggemann,H., Zidane,N., Magnier,A., Ma,L., Tichit,M., Jarraud,S., Bouchier,C., Vandenesch,F., Kunst,F., Etienne,J., Glaser,P., and Buchrieser,C. (2004). Evidence in the Legionella pneumophila genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* *36*, 1165-1173.
- Celli,J., de Chastellier,C., Franchini,D.M., Pizarro-Cerda,J., Moreno,E., and Gorvel,J.P. (2003). Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum. *J. Exp. Med.* *198*, 545-556.
- Chamaillard,M., Hashimoto,M., Horie,Y., Masumoto,J., Qiu,S., Saab,L., Ogura,Y., Kawasaki,A., Fukase,K., Kusumoto,S., Valvano,M.A., Foster,S.J., Mak,T.W., Nunez,G., and Inohara,N. (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat. Immunol.* *4*, 702-707.
- Checroun,C., Wehrly,T.D., Fischer,E.R., Hayes,S.F., and Celli,J. (2006). Autophagy-mediated reentry of Francisella tularensis into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 14578-14583.
- Cheng,G., Zhong,J., Chung,J., and Chisari,F.V. (2007). Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 9035-9040.
- Cianciotto,N.P. (2001). Pathogenicity of Legionella pneumophila. *Int. J. Med. Microbiol.* *291*, 331-343.
- Ciesielski,C.A., Blaser,M.J., and Wang,W.L. (1986). Serogroup specificity of Legionella pneumophila is related to lipopolysaccharide characteristics. *Infect. Immun.* *51*, 397-404.
- Clark,R., and Kupper,T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* *125*, 629-637.
- Coers,J., Monahan,C., and Roy,C.R. (1999). Modulation of phagosome biogenesis by Legionella pneumophila creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nat. Cell. Biol.* *1*, 451-453.
- Coers,J., Vance,R.E., Fontana,M.F., and Dietrich,W.F. (2007). Restriction of Legionella pneumophila growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell. Microbiol.*
- Conover,G.M., Derre,I., Vogel,J.P., and Isberg,R.R. (2003). The Legionella pneumophila LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* *48*, 305-321.
- Conti,B.J., Davis,B.K., Zhang,J., O'connor,W., Jr., Williams,K.L., and Ting,J.P. (2005). CATERPILLER 16.2 (CLR16.2), a novel NBD/LRR family member that negatively regulates T cell function. *J. Biol. Chem.* *280*, 18375-18385.
- Damiano,J.S., Oliveira,V., Welsh,K., and Reed,J.C. (2004). Heterotypic interactions among NACHT domains: implications for regulation of innate immune responses. *Biochem. J.* *381*, 213-219.
- Davoodi,J., Lin,L., Kelly,J., Liston,P., and MacKenzie,A.E. (2004). Neuronal apoptosis-inhibitory protein does not interact with Smac and requires ATP to bind caspase-9. *J. Biol. Chem.* *279*, 40622-40628.
- Decker,T., and Lohmann-Matthes,M.L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J. Immunol. Methods* *115*, 61-69.

Referenzen

- Decker,T., Muller,M., and Stockinger,S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 675-687.
- Der,S.D., Zhou,A., Williams,B.R., and Silverman,R.H. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15623-15628.
- Derre,I., and Isberg,R.R. (2004). Macrophages from mice with the restrictive Lgn1 allele exhibit multifactorial resistance to Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* 72, 6221-6229.
- Di Virgilio,F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465-472.
- Diao,F., Li,S., Tian,Y., Zhang,M., Xu,L.G., Zhang,Y., Wang,R.P., Chen,D., Zhai,Z., Zhong,B., Tien,P., and Shu,H.B. (2007). Negative regulation of. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 11706-11711.
- Diefenbach,A., Schindler,H., Donhauser,N., Lorenz,E., Laskay,T., MacMicking,J., Rollinghoff,M., Gresser,I., and Bogdan,C. (1998). Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 8, 77-87.
- Dietrich,C., Heuner,K., Brand,B.C., Hacker,J., and Steinert,M. (2001). Flagellum of Legionella pneumophila positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. *Infect. Immun.* 69, 2116-2122.
- Diez,E., Lee,S.H., Gauthier,S., Yaraghi,Z., Tremblay,M., Vidal,S., and Gros,P. (2003). Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. *Nat. Genet.* 33, 55-60.
- Diez,E., Yaraghi,Z., MacKenzie,A., and Gros,P. (2000). The neuronal apoptosis inhibitory protein (Naip) is expressed in macrophages and is modulated after phagocytosis and during intracellular infection with Legionella pneumophila. *J. Immunol.* 164, 1470-1477.
- Dinarello,C.A. (1998a). Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856, 1-11.
- Dinarello,C.A. (1998b). Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* 16, 457-499.
- Doleans,A., Aurell,H., Reyrolle,M., Lina,G., Freney,J., Vandenesch,F., Etienne,J., and Jarraud,S. (2004). Clinical and environmental distributions of Legionella strains in France are different. *J. Clin. Microbiol.* 42, 458-460.
- Donini,M., Zenaro,E., Tamassia,N., and Dusi,S. (2007). NADPH oxidase of human dendritic cells: role in Candida albicans killing and regulation by interferons, dectin-1 and CD206. *Eur. J. Immunol.* 37, 1194-1203.
- Dorn,B.R., Dunn,W.A., Jr., and Progulske-Fox,A. (2001). Porphyromonas gingivalis traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect. Immun.* 69, 5698-5708.
- Edelstein,P.H. (1993). Legionnaires' disease. *Clin. Infect. Dis.* 16, 741-747.
- Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir,S.M., Martinez,J., Patkaniowska,A., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate. *EMBO J* 20, 6877-6888.
- Elliott,J.A., and Winn,W.C., Jr. (1986). Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* 51, 31-36.
- Eroshkin,A., and Mushegian,A. (1999). Conserved transactivation domain shared by interferon regulatory factors and Smad morphogens. *J. Mol. Med.* 77, 403-405.
- Falguera,M., Sacristan,O., Nogues,A., Ruiz-Gonzalez,A., Garcia,M., Manonelles,A., and Rubio-Caballero,M. (2001). Nonsevere community-acquired pneumonia: correlation between cause and severity or comorbidity. *Arch. Intern. Med.* 161, 1866-1872.
- Fang,F.C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.* 99, 2818-2825.

Referenzen

- Faustin,B., Lartigue,L., Bruey,J.M., Luciano,F., Sergienko,E., Bailly-Maitre,B., Volkmann,N., Hanein,D., Rouiller,I., and Reed,J.C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol. Cell.* 25, 713-724.
- Fields,B.S. (1996). The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* 4, 286-290.
- Fields,B.S., Benson,R.F., and Besser,R.E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 506-526.
- Finn,R.D., Mistry,J., Schuster-Bockler,B., Griffiths-Jones,S., Hollich,V., Lassmann,T., Moxon,S., Marshall,M., Khanna,A., Durbin,R., Eddy,S.R., Sonnhammer,E.L., and Bateman,A. (2006). Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34, D247-D251.
- Fitzgerald,K.A., McWhirter,S.M., Faia,K.L., Rowe,D.C., Latz,E., Golenbock,D.T., Coyle,A.J., Liao,S.M., and Maniatis,T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4, 491-496.
- Flieger,A., Neumeister,B., and Cianciotto,N.P. (2002). Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of Legionella pneumophila and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* 70, 6094-6106.
- Fortier,A., de Chastellier,C., Balor,S., and Gros,P. (2007). Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by Legionella pneumophila. *Cell. Microbiol.* 9, 910-923.
- Fortier,A., Diez,E., and Gros,P. (2005). Naip5/Birc1e and susceptibility to Legionella pneumophila. *Trends Microbiol.* 13, 328-335.
- Franchi,L., Amer,A., Body-Malapel,M., Kanneganti,T.D., Ozoren,N., Jagirdar,R., Inohara,N., Vandenabeele,P., Bertin,J., Coyle,A., Grant,E.P., and Nunez,G. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat. Immunol.* 7, 576-582.
- Fraser,D.W., Tsai,T.R., Orenstein,W., Parkin,W.E., Beecham,H.J., Sharrar,R.G., Harris,J., Mallison,G.F., Martin,S.M., McDade,J.E., Shepard,C.C., and Brachman,P.S. (1977). Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297, 1189-1197.
- Freudenberg,M.A., Merlin,T., Kalis,C., Chvatchko,Y., Stubig,H., and Galanos,C. (2002). Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN-gamma induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J. Immunol.* 169, 1665-1668.
- 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.
- Fu,Y., Comella,N., Tognazzi,K., Brown,L.F., Dvorak,H.F., and Kocher,O. (1999). Cloning of DLM-1, a novel gene that is up-regulated in activated macrophages, using RNA differential display. *Gene* 240, 157-163.
- Gao,J.J., Filla,M.B., Fultz,M.J., Vogel,S.N., Russell,S.W., and Murphy,W.J. (1998a). Autocrine/paracrine IFN-alpha mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1alpha in mouse macrophages: pivotal role of Stat1alpha in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J. Immunol.* 161, 4803-4810.
- Gao,L.Y., and Abu,K.Y. (1999). Apoptosis in macrophages and alveolar epithelial cells during early stages of infection by Legionella pneumophila and its role in cytopathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 862-870.
- Gao,L.Y., Stone,B.J., Brieland,J.K., and Abu,K.Y. (1998b). Different fates of Legionella pneumophila pmi and mil mutants within macrophages and alveolar epithelial cells. *Microb. Pathog.* 25, 291-306.
- Garduno,R.A., Garduno,E., and Hoffman,P.S. (1998). Surface-associated hsp60 chaperonin of Legionella pneumophila mediates invasion in a HeLa cell model. *Infect. Immun.* 66, 4602-4610.
- Garlanda,C., Bottazzi,B., Bastone,A., and Mantovani,A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 337-366.
- Gasque,P. (2004). Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol. Immunol.* 41, 1089-1098.

Referenzen

- Gay,N.J., and Keith,F.J. (1991). *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351, 355-356.
- Gebran,S.J., Yamamoto,Y., McHugh,S., Newton,C., Klein,T.W., and Friedman,H. (1994). Differences and similarities in permissive A/J versus non-permissive BALB/c murine macrophages infected with *Legionella pneumophila*: the role of iron. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 9, 7-14.
- Ghosh,S., and Karin,M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 *Suppl*, S81-S96.
- Ghosh,S., May,M.J., and Kopp,E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 225-260.
- Giard,D.J., Aaronson,S.A., Todaro,G.J., Amstein,P., Kersey,J.H., Dosik,H., and Parks,W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417-1423.
- Girard,R., Pedron,T., Uematsu,S., Balloy,V., Chignard,M., Akira,S., and Chaby,R. (2003). Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell. Sci.* 116, 293-302.
- Girardin,S.E., Boneca,I.G., Carneiro,L.A., Antignac,A., Jehanno,M., Viala,J., Tedin,K., Taha,M.K., Labigne,A., Zahringer,U., Coyle,A.J., DiStefano,P.S., Bertin,J., Sansonetti,P.J., and Philpott,D.J. (2003a). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300, 1584-1587.
- Girardin,S.E., Boneca,I.G., Viala,J., Chamaillard,M., Labigne,A., Thomas,G., Philpott,D.J., and Sansonetti,P.J. (2003b). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem* 278, 8869-8872.
- Girardin,S.E., Tournebise,R., Mavris,M., Page,A.L., Li,X., Stark,G.R., Bertin,J., DiStefano,P.S., Yaniv,M., Sansonetti,P.J., and Philpott,D.J. (2001). CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2, 736-742.
- Gitlin,L., Barchet,W., Gilfillan,S., Cella,M., Beutler,B., Flavell,R.A., Diamond,M.S., and Colonna,M. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 8459-8464.
- Glick,T.H., Gregg,M.B., Berman,B., Mallison,G., Rhodes,W.W., Jr., and Kassanoff,I. (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.* 107, 149-160.
- Gutierrez,M.G., Master,S.S., Singh,S.B., Taylor,G.A., Colombo,M.I., and Deretic,V. (2004). Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 119, 753-766.
- Gutierrez,M.G., Vazquez,C.L., Munafo,D.B., Zoppino,F.C., Beron,W., Rabinovitch,M., and Colombo,M.I. (2005). Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell. Microbiol.* 7, 981-993.
- Haas,A., and Goebel,W. (1992). Microbial strategies to prevent oxygen-dependent killing by phagocytes. *Free Radic. Res. Commun.* 16, 137-157.
- Hagele,S., Hacker,J., and Brand,B.C. (1998). *Legionella pneumophila* kills human phagocytes but not protozoan host cells by inducing apoptotic cell death. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 51-58.
- Hales,L.M., and Shuman,H.A. (1999). *Legionella pneumophila* contains a type II general secretion pathway required for growth in amoebae as well as for secretion of the Msp protease. *Infect. Immun.* 67, 3662-3666.
- Haller,O., and Kochs,G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic.* 3, 710-717.
- Hawn,T.R., Verbon,A., Janer,M., Zhao,L.P., Beutler,B., and Aderem,A. (2005). Toll-like receptor 4 polymorphisms are associated with resistance to Legionnaires' disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* 102, 2487-2489.
- Hawn,T.R., Verbon,A., Lettinga,K.D., Zhao,L.P., Li,S.S., Laws,R.J., Skerrett,S.J., Beutler,B., Schroeder,L., Nachman,A., Ozinsky,A., Smith,K.D., and Aderem,A. (2003). A common dominant TLR5 stop codon

Referenzen

- polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J. Exp. Med.* **198**, 1563-1572.
- Hayashi,F., Smith,K.D., Ozinsky,A., Hawn,T.R., Yi,E.C., Goodlett,D.R., Eng,J.K., Akira,S., Underhill,D.M., and Aderem,A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- Henry,T., Brotcke,A., Weiss,D.S., Thompson,L.J., and Monack,D.M. (2007). Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during Francisella infection. *J. Exp. Med.* **204**, 987-994.
- Heuner,K., Bender-Beck,L., Brand,B.C., Luck,P.C., Mann,K.H., Marre,R., Ott,M., and Hacker,J. (1995). Cloning and genetic characterization of the flagellum subunit gene (*flaA*) of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Infect. Immun.* **63**, 2499-2507.
- Hoffmann,J.A. (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**, 33-38.
- Hoffmann,J.A., Kafatos,F.C., Janeway,C.A., and Ezekowitz,R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.
- Honda,K., Takaoka,A., and Taniguchi,T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* **25**, 349-360.
- Honda,K., and Taniguchi,T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 644-658.
- Honda,K., Yanai,H., Negishi,H., Asagiri,M., Sato,M., Mizutani,T., Shimada,N., Ohba,Y., Takaoka,A., Yoshida,N., and Taniguchi,T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**, 772-777.
- Hornung,V., Ellegast,J., Kim,S., Brzozka,K., Jung,A., Kato,H., Poeck,H., Akira,S., Conzelmann,K.K., Schlee,M., Endres,S., and Hartmann,G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**, 994-997.
- Hornung,V., Guenther-Biller,M., Bourquin,C., Ablasser,A., Schlee,M., Uematsu,S., Noronha,A., Manoharan,M., Akira,S., de Fougerolles,A., Endres,S., and Hartmann,G. (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat. Med.* **11**, 263-270.
- Horwitz,M.A. (1983a). Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 1319-1331.
- Horwitz,M.A. (1983b). The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**, 2108-2126.
- Horwitz,M.A. (1984). Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**, 27-33.
- Horwitz,M.A., and Maxfield,F.R. (1984). *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell. Biol.* **99**, 1936-1943.
- Horwitz,M.A., and Silverstein,S.C. (1980). Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest.* **66**, 441-450.
- Hovanessian,A.G. (2007). On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 351-361.
- Hsu,Y.M., Zhang,Y., You,Y., Wang,D., Li,H., Duramad,O., Qin,X.F., Dong,C., and Lin,X. (2007). The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat. Immunol.* **8**, 198-205.
- Inohara, Chamailard, McDonald,C., and Nunez,G. (2005). NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 355-383.
- Inohara,N., Koseki,T., Lin,J., del Peso,L., Lucas,P.C., Chen,F.F., Ogura,Y., and Nunez,G. (2000). An induced proximity model for NF-kappa B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 27823-27831.

Referenzen

- Inohara,N., Ogura,Y., Fontalba,A., Gutierrez,O., Pons,F., Crespo,J., Fukase,K., Inamura,S., Kusumoto,S., Hashimoto,M., Foster,S.J., Moran,A.P., Fernandez-Luna,J.L., and Nunez,G. (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.* **278**, 5509-5512.
- Isaacs,A., Lindemann,J., and Valentine,R.C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **147**, 268-273.
- Ishii,K.J., Coban,C., Kato,H., Takahashi,K., Torii,Y., Takeshita,F., Ludwig,H., Sutter,G., Suzuki,K., Hemmi,H., Sato,S., Yamamoto,M., Uematsu,S., Kawai,T., Takeuchi,O., and Akira,S. (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 40-48.
- Jacob,T., Escallier,J.C., Sanguedolce,M.V., Chicheportiche,C., Bongrand,P., Capo,C., and Mege,J.L. (1994). *Legionella pneumophila* inhibits superoxide generation in human monocytes via the down-modulation of alpha and beta protein kinase C isotypes. *J. Leukoc. Biol.* **55**, 310-312.
- Janeway,C.A., Jr., and Medzhitov,R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216.
- Janssens,S., Tinel,A., Lippens,S., and Tschopp,J. (2005). PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell* **123**, 1079-1092.
- Kanneganti,T.D., Body-Malapel,M., Amer,A., Park,J.H., Whitfield,J., Franchi,L., Taraporewala,Z.F., Miller,D., Patton,J.T., Inohara,N., and Nunez,G. (2006a). Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J. Biol. Chem.* **281**, 36560-36568.
- Kanneganti,T.D., Lamkanfi,M., Kim,Y.G., Chen,G., Park,J.H., Franchi,L., Vandenabeele,P., and Nunez,G. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**, 433-443.
- Kanneganti,T.D., Ozoren,N., Body-Malapel,M., Amer,A., Park,J.H., Franchi,L., Whitfield,J., Barchet,W., Colonna,M., Vandenabeele,P., Bertin,J., Coyle,A., Grant,E.P., Akira,S., and Nunez,G. (2006b). Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**, 233-236.
- Karin,M., and Lin,A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221-227.
- Kato,H., Takeuchi,O., Sato,S., Yoneyama,M., Yamamoto,M., Matsui,K., Uematsu,S., Jung,A., Kawai,T., Ishii,K.J., Yamaguchi,O., Otsu,K., Tsujimura,T., Koh,C.S., Reis e Sousa, Matsuura,Y., Fujita,T., and Akira,S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**, 101-105.
- Katz,S.M., and Hammel,J.M. (1987). The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **17**, 150-156.
- Kawai,T., and Akira,S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 338-344.
- Kawai,T., Takahashi,K., Sato,S., Coban,C., Kumar,H., Kato,H., Ishii,K.J., Takeuchi,O., and Akira,S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat. Immunol.* **6**, 981-988.
- Kobayashi,K.S., Chamaillard,M., Ogura,Y., Henegariu,O., Inohara,N., Nunez,G., and Flavell,R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* **307**, 731-734.
- Korzeniewski,C., and Callewaert,D.M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **64**, 313-320.
- Kufer,T.A., Fritz,J.H., and Philpott,D.J. (2005). NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity. *Trends Microbiol.* **13**, 381-388.
- Kumar,H., Kawai,T., Kato,H., Sato,S., Takahashi,K., Coban,C., Yamamoto,M., Uematsu,S., Ishii,K.J., Takeuchi,O., and Akira,S. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J. Exp. Med.* **203**, 1795-1803.
- Kura,F., Suzuki,K., Watanabe,H., Akamatsu,Y., and Amano,F. (1994). Difference in *Legionella pneumophila* growth permissiveness between J774.1 murine macrophage-like JA-4 cells and lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant cells, LPS1916, after stimulation with LPS. *Infect. Immun.* **62**, 5419-5423.

Referenzen

- Laguna,R.K., Creasey,E.A., Li,Z., Valtz,N., and Isberg,R.R. (2006). A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* *103*, 18745-18750.
- Lamkanfi,M., Amer,A., Kanneganti,T.D., Munoz-Planillo,R., Chen,G., Vandenabeele,P., Fortier,A., Gros,P., and Nunez,G. (2007). The Nod-Like Receptor Family Member Naip5/Birc1e Restricts Legionella pneumophila Growth Independently of Caspase-1 Activation. *J. Immunol.* *178*, 8022-8027.
- Lee,M.S., and Kim,Y.J. (2007). Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annu. Rev. Biochem.*
- Lefebvre,S., Burglen,L., Reboullet,S., Clermont,O., Burlet,P., Viollet,L., Benichou,B., Cruaud,C., Millasseau,P., Zeviani,M., and . (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* *80*, 155-165.
- Lemaitre,B., Nicolas,E., Michaut,L., Reichhart,J.M., and Hoffmann,J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* *86*, 973-983.
- Levine,B., and Deretic,V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 767-777.
- Levy,D.E., Marie,I., and Prakash,A. (2003). Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 52-58.
- Lieber,M., Smith,B., Szakal,A., Nelson-Rees,W., and Todaro,G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* *17*, 62-70.
- Lin,R., Heylbroeck,C., Pitha,P.M., and Hiscott,J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 2986-2996.
- Lin,Y., Ma,W., and Benchimol,S. (2000). Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis. *Nat. Genet.* *26*, 122-127.
- Ling,Y.M., Shaw,M.H., Ayala,C., Coppens,I., Taylor,G.A., Ferguson,D.J., and Yap,G.S. (2006). Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of Toxoplasma gondii in primed effector macrophages. *J. Exp. Med.* *203*, 2063-2071.
- Lu,H., and Clarke,M. (2005). Dynamic properties of Legionella-containing phagosomes in Dictyostelium amoebae. *Cell. Microbiol.* *7*, 995-1007.
- Luneberg,E., Zahringer,U., Knirel,Y.A., Steinmann,D., Hartmann,M., Steinmetz,I., Rohde,M., Kohl,J., and Frosch,M. (1998). Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of legionella pneumophila. *J. Exp. Med.* *188*, 49-60.
- Luzio,J.P., Poupon,V., Lindsay,M.R., Mullock,B.M., Piper,R.C., and Pryor,P.R. (2003). Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol.* *20*, 141-154.
- Machner,M.P., and Isberg,R.R. (2006). Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila. *Dev. Cell* *11*, 47-56.
- MacMicking,J.D., Taylor,G.A., and McKinney,J.D. (2003). Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* *302*, 654-659.
- Maier,J.K., Lahoua,Z., Gendron,N.H., Fetni,R., Johnston,A., Davoodi,J., Rasper,D., Roy,S., Slack,R.S., Nicholson,D.W., and MacKenzie,A.E. (2002). The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7. *J. Neurosci.* *22*, 2035-2043.
- Mak,J. (2005). RNA interference: more than a research tool in the vertebrates' adaptive immunity. *Retrovirology.* *2*, 35.
- Manca,C., Tsenova,L., Bergtold,A., Freeman,S., Tovey,M., Musser,J.M., Barry,C.E., III, Freedman,V.H., and Kaplan,G. (2001). Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to

Referenzen

- induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 5752-5757.
- Mancuso,G., Midiri,A., Biondo,C., Beninati,C., Zummo,S., Galbo,R., Tomasello,F., Gambuzza,M., Macri,G., Ruggeri,A., Leanderson,T., and Teti,G. (2007). Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J. Immunol.* **178**, 3126-3133.
- Mariathasan,S., Newton,K., Monack,D.M., Vucic,D., French,D.M., Lee,W.P., Roose-Girma,M., Erickson,S., and Dixit,V.M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**, 213-218.
- Mariathasan,S., Weiss,D.S., Newton,K., McBride,J., O'Rourke,K., Roose-Girma,M., Lee,W.P., Weinrauch,Y., Monack,D.M., and Dixit,V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228-232.
- Marston,B.J., Lipman,H.B., and Breiman,R.F. (1994). Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* **154**, 2417-2422.
- Martens,S., Parvanova,I., Zerrahn,J., Griffiths,G., Schell,G., Reichmann,G., and Howard,J.C. (2005). Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog.* **1**, e24.
- 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.
- 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.
- 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.
- Martinon,F. and Tschopp,J. (2004). Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**, 561-574.
- Martinon,F. and Tschopp,J. (2005). NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol.* **26**, 447-454.
- McCaffrey,R.L., Fawcett,P., O'Riordan,M., Lee,K.D., Havell,E.A., Brown,P.O., and Portnoy,D.A. (2004). A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**, 11386-11391.
- Medzhitov,R., and Janeway,C., Jr. (2000). Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**, 338-344.
- Medzhitov,R., and Janeway,C.A., Jr. (1997). Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**, 4-9.
- Mellman,I., Fuchs,R., and Helenius,A. (1986). Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 663-700.
- Merriam,J.J., Mathur,R., Maxfield-Boumil,R., and Isberg,R.R. (1997). Analysis of the *Legionella pneumophila* flil gene: intracellular growth of a defined mutant defective for flagellum biosynthesis. *Infect. Immun.* **65**, 2497-2501.
- Mestas,J., and Hughes,C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J. Immunol.* **172**, 2731-2738.
- Meylan,E., Curran,J., Hofmann,K., Moradpour,D., Binder,M., Bartenschlager,R., and Tschopp,J. (2005). Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**, 1167-1172.
- Meylan,E., Tschopp,J., and Karin,M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**, 39-44.
- Miao,E.A., Alpuche-Aranda,C.M., Dors,M., Clark,A.E., Bader,M.W., Miller,S.I., and Aderem,A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**, 569-575.

Referenzen

- Miyamoto,M., Fujita,T., Kimura,Y., Maruyama,M., Harada,H., Sudo,Y., Miyata,T., and Taniguchi,T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements. *Cell* 54, 903-913.
- Mogensen,K.E., Lewerenz,M., Reboul,J., Lutfalla,G., and Uze,G. (1999). The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J. Interferon Cytokine Res.* 19, 1069-1098.
- Molmeret,M., Bitar,D.M., Han,L., and Kwaik,Y.A. (2004a). Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect.* 6, 129-139.
- Molmeret,M., Zink,S.D., Han,L., Abu-Zant,A., Asari,R., Bitar,D.M., and Abu,K.Y. (2004b). Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the *Legionella*-containing phagosome. *Cell. Microbiol.* 6, 33-48.
- Molofsky,A.B., Byrne,B.G., Whitfield,N.N., Madigan,C.A., Fuse,E.T., Tateda,K., and Swanson,M.S. (2006). Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.* 203, 1093-1104.
- Molofsky,A.B., and Swanson,M.S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Mol. Microbiol.* 53, 29-40.
- Mukaida,N., Mahe,Y., and Matsushima,K. (1990). Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 265, 21128-21133.
- Murata,T., Delprato,A., Ingmundson,A., Toomre,D.K., Lambright,D.G., and Roy,C.R. (2006). The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell. Biol.* 8, 971-977.
- Musson,R.A. (1983). Human monocyte maturation/differentiation during in vitro culture. *Surv. Immunol. Res.* 2, 246-251.
- Muzio,M., Ni,J., Feng,P., and Dixit,V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-1615.
- N'Guessan,P.D., Etouem,M.O., Schmeck,B., Hocke,A.C., Scharf,S., Vardarova,K., Opitz,B., Flieger,A., Suttorp,N., and Hippenstiel,S. (2007). *Legionella pneumophila*-induced PKCalpha-, MAPK-, and NF-kappaB-dependent COX-2 expression in human lung epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 292, L267-L277.
- Nagai,H., Kagan,J.C., Zhu,X., Kahn,R.A., and Roy,C.R. (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* 295, 679-682.
- Napoli,C., Lemieux,C., and Jorgensen,R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Neumeister,B., Bach,V., Faigle,M., and Northoff,H. (2001). Induction of iNOS in human monocytes infected with different *Legionella* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 31-38.
- Nie,Y., Ding,L., Kao,P.N., Braun,R., and Yang,J.H. (2005). ADAR1 interacts with NF90 through double-stranded RNA and regulates NF90-mediated gene expression independently of RNA editing. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6956-6963.
- Ninio,S., and Roy,C.R. (2007). Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol.* 15, 372-380.
- O'Connell,R.M., Saha,S.K., Vaidya,S.A., Bruhn,K.W., Miranda,G.A., Zarnegar,B., Perry,A.K., Nguyen,B.O., Lane,T.F., Taniguchi,T., Miller,J.F., and Cheng,G. (2004). Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Exp. Med.* 200, 437-445.
- O'Connell,R.M., Vaidya,S.A., Perry,A.K., Saha,S.K., Dempsey,P.W., and Cheng,G. (2005). Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J. Immunol.* 174, 1602-1607.
- O'Riordan,M., Yi,C.H., Gonzales,R., Lee,K.D., and Portnoy,D.A. (2002). Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 99, 13861-13866.

Referenzen

- Opitz,B., Puschel,A., Beermann,W., Hocke,A.C., Forster,S., Schmeck,B., van,L., V, Chakraborty,T., Suttorp,N., and Hippenstiel,S. (2006a). *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J. Immunol.* **176**, 484-490.
- Opitz,B., Vinzing,M., van,L., V, Schmeck,B., Heine,G., Gunther,S., Preissner,R., Slevogt,H., N'Guessan,P.D., Eitel,J., Goldmann,T., Flieger,A., Suttorp,N., and Hippenstiel,S. (2006b). *Legionella pneumophila* induces IFN β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J. Biol. Chem.* **281**, 36173-36179.
- Oppenheim,J.J. and Yang,D. (2005). Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 359-365.
- Payne,N.R., and Horwitz,M.A. (1987). Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J. Exp. Med.* **166**, 1377-1389.
- Peracino,B., Wagner,C., Balest,A., Balbo,A., Pergolizzi,B., Noegel,A.A., Steinert,M., and Bozzaro,S. (2006). Function and mechanism of action of Dictyostelium Nramp1 (Slc11a1) in bacterial infection. *Traffic.* **7**, 22-38.
- Philpott,D.J., Yamaoka,S., Israel,A., and Sansonetti,P.J. (2000). Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.* **165**, 903-914.
- Pichlmair,A., Schulz,O., Tan,C.P., Naslund,T.I., Liljestrom,P., Weber,F., and Reis e Sousa (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997-1001.
- Pizarro-Cerda,J., Moreno,E., Sanguedolce,V., Mege,J.L., and Gorvel,J.P. (1998). Virulent *Brucella abortus* prevents lysosome fusion and is distributed within autophagosome-like compartments. *Infect. Immun.* **66**, 2387-2392.
- Platanias,L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 375-386.
- Polesky,A.H., Ross,J.T., Falkow,S., and Tompkins,L.S. (2001). Identification of *Legionella pneumophila* genes important for infection of amoebas by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* **69**, 977-987.
- Pruckler,J.M., Benson,R.F., Moyenuddin,M., Martin,W.T., and Fields,B.S. (1995). Association of flagellum expression and intracellular growth of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **63**, 4928-4932.
- Radtke,A.L., and O'Riordan,M.X. (2006). Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell. Microbiol.* **8**, 1720-1729.
- Rechnitzer,C., and Blom,J. (1989). Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS* **97**, 105-114.
- Remoli,M.E., Giacomini,E., Lutfalla,G., Dondi,E., Orefici,G., Battistini,A., Uze,G., Pellegrini,S., and Coccia,E.M. (2002). Selective expression of type I IFN genes in human dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **169**, 366-374.
- Ren,T., Zamboni,D.S., Roy,C.R., Dietrich,W.F., and Vance,R.E. (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog.* **2**, e18.
- Rifkin,I.R., Leadbetter,E.A., Busconi,L., Viglianti,G., and Marshak-Rothstein,A. (2005). Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **204**, 27-42.
- Robinson,M.J., Sancho,D., Slack,E.C., LeibundGut-Landmann,S., and Reis e Sousa (2006). Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat. Immunol.* **7**, 1258-1265.
- Rossier,O., and Cianciotto,N.P. (2001). Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **69**, 2092-2098.
- Roy,C.R., and Isberg,R.R. (1997). Topology of *Legionella pneumophila* DotA: an inner membrane protein required for replication in macrophages. *Infect. Immun.* **65**, 571-578.

Referenzen

- Roy,N., Mahadevan,M.S., McLean,M., Shutler,G., Yaraghi,Z., Farahani,R., Baird,S., Besner-Johnston,A., Lefebvre,C., Kang,X., and . (1995). The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167-178.
- Sadosky,A.B., Wiater,L.A., and Shuman,H.A. (1993). Identification of Legionella pneumophila genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 5361-5373.
- Saha,A.K., Dowling,J.N., LaMarco,K.L., Das,S., Remaley,A.T., Olomu,N., Pope,M.T., and Glew,R.H. (1985). Properties of an acid phosphatase from Legionella micdadei which blocks superoxide anion production by human neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 150-160.
- Saha,S.K., Pietras,E.M., He,J.Q., Kang,J.R., Liu,S.Y., Oganessian,G., Shahangian,A., Zarnegar,B., Shiba,T.L., Wang,Y., and Cheng,G. (2006). Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* **25**, 3257-3263.
- Sakaguchi,S., Negishi,H., Asagiri,M., Nakajima,C., Mizutani,T., Takaoka,A., Honda,K., and Taniguchi,T. (2003). Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochem. Biophys. Res Commun.* **306**, 860-866.
- Sanna,M.G., da Silva,C.J., Ducrey,O., Lee,J., Nomoto,K., Schrantz,N., Deveraux,Q.L., and Ulevitch,R.J. (2002). IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1754-1766.
- Santic,M., Asare,R., Doric,M., and Abu,K.Y. (2007). Host-dependent trigger of caspases and apoptosis by Legionella pneumophila. *Infect. Immun.* **75**, 2903-2913.
- Sato,M., Suemori,H., Hata,N., Asagiri,M., Ogasawara,K., Nakao,K., Nakaya,T., Katsuki,M., Noguchi,S., Tanaka,N., and Taniguchi,T. (2000). Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539-548.
- Sato,M., Tanaka,N., Hata,N., Oda,E., and Taniguchi,T. (1998). Involvement of the IRF family transcription factor IRF-3 in virus-induced activation of the IFN-beta gene. *FEBS Lett.* **425**, 112-116.
- Sato,M., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (2001). The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors -- studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **12**, 133-142.
- Schaible,U.E., Schlesinger,P.H., Steinberg,T.H., Mangel,W.F., Kobayashi,T., and Russell,D.G. (1999). Parasitophorous vacuoles of Leishmania mexicana acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J. Cell. Sci.* **112 (Pt 5)**, 681-693.
- Schiavoni,G., Mauri,C., Carlei,D., Belardelli,F., Pastoris,M.C., and Proietti,E. (2004). Type I IFN protects permissive macrophages from Legionella pneumophila infection through an IFN-gamma-independent pathway. *J. Immunol.* **173**, 1266-1275.
- Schroder,K., Hertzog,P.J., Ravasi,T., and Hume,D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 163-189.
- Segal,G., Purcell,M., and Shuman,H.A. (1998). Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the Legionella pneumophila genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 1669-1674.
- Segal,G., Russo,J.J., and Shuman,H.A. (1999). Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of Legionella pneumophila. *Mol. Microbiol.* **34**, 799-809.
- Sen,R., and Baltimore,D. (1986). Inducibility of Kappa-Immunoglobulin Enhancer-Binding Protein Nf-Kappa-B by A Posttranslational Mechanism. *Cell* **47**, 921-928.
- Seth,R.B., Sun,L., Ea,C.K., and Chen,Z.J. (2005). Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**, 669-682.
- Sharma,S., Tenoever,B.R., Grandvaux,N., Zhou,G.P., Lin,R., and Hiscott,J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**, 1148-1151.

Referenzen

- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., and Nathan, C. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10, 29-38.
- Shohdy, N., Efe, J.A., Emr, S.D., and Shuman, H.A. (2005). Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 4866-4871.
- Sims, J.E., March, C.J., Cosman, D., Widmer, M.B., MacDonald, H.R., McMahan, C.J., Grubin, C.E., Wignall, J.M., Jackson, J.L., Call, S.M., and . (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241, 585-589.
- Singh, S.B., Davis, A.S., Taylor, G.A., and Deretic, V. (2006). Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science* 313, 1438-1441.
- Soulat, D., Bauch, A., Stockinger, S., Superti-Furga, G., and Decker, T. (2006). Cytoplasmic *Listeria monocytogenes* stimulates IFN-beta synthesis without requiring the adapter protein MAVS. *FEBS Lett.* 580, 2341-2346.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
- Stetson, D.B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.
- Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., Unger, H., Chakraborty, T., Levy, D.E., Muller, M., and Decker, T. (2002). Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 169, 6522-6529.
- Stockinger, S., Reutterer, B., Schaljo, B., Schellack, C., Brunner, S., Materna, T., Yamamoto, M., Akira, S., Taniguchi, T., Murray, P.J., Muller, M., and Decker, T. (2004). IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J. Immunol.* 173, 7416-7425.
- Stone, B.J., and Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: Identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity* 66, 1768-1775.
- Suhara, W., Yoneyama, M., Iwamura, T., Yoshimura, S., Tamura, K., Namiki, H., Aimoto, S., and Fujita, T. (2000). Analyses of virus-induced homomeric and heteromeric protein associations between IRF-3 and coactivator CBP/p300. *J. Biochem. (Tokyo)* 128, 301-307.
- Sun, Q., Sun, L., Liu, H.H., Chen, X., Seth, R.B., Forman, J., and Chen, Z.J. (2006). The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* 24, 633-642.
- Sutterwala, F.S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G.S., Grant, E.P., Bertin, J., Coyle, A.J., Galan, J.E., Askenase, P.W., and Flavell, R.A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24, 317-327.
- Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nunez, G. (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in *Shigella*-infected macrophages. *PLoS Pathog.* 3, e111.
- Swanson, M.S. (2006). Autophagy: eating for good health. *J. Immunol.* 177, 4945-4951.
- Swanson, M.S., and Isberg, R.R. (1995). Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* 63, 3609-3620.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., and Taniguchi, T. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.*
- Taylor, G.A. (2007). IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell. Microbiol.* 9, 1099-1107.

Referenzen

- Taylor,G.A., Feng,C.G., and Sher,A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 100-109.
- Taylor,P.R., Martinez-Pomares,L., Stacey,M., Lin,H.H., Brown,G.D., and Gordon,S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901-944.
- Telliez,J.B., Bean,K.M., and Lin,L.L. (2000). LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1478, 280-288.
- Theofilopoulos,A.N., Baccala,R., Beutler,B., and Kono,D.H. (2005). Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 307-336.
- Tinel,A., and Tschopp,J. (2004). The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843-846.
- Tosi,M.F. (2005). Innate immune responses to infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 241-249.
- Tsai,T.F., Finn,D.R., Plikaytis,B.D., McCauley,W., Martin,S.M., and Fraser,D.W. (1979). Legionnaires' disease: clinical features of the epidemic in Philadelphia. *Ann. Intern. Med.* 90, 509-517.
- Tsuchiya,S., Yamabe,M., Yamaguchi,Y., Kobayashi,Y., Konno,T., and Tada,K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26, 171-176.
- Vogel,J.P., Andrews,H.L., Wong,S.K., and Isberg,R.R. (1998). Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279, 873-876.
- Vogel,J.P., and Isberg,R.R. (1999). Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 30-34.
- Vogl,T., Tenbrock,K., Ludwig,S., Leukert,N., Ehrhardt,C., van Zoelen,M.A., Nacken,W., Foell,D., van der,P.T., Sorg,C., and Roth,J. (2007). Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 13, 1042-1049.
- Wagner,C., Khan,A.S., Kamphausen,T., Schmausser,B., Unal,C., Lorenz,U., Fischer,G., Hacker,J., and Steinert,M. (2007). Collagen binding protein Mip enables *Legionella pneumophila* to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cell. Microbiol.* 9, 450-462.
- Walz,J.M., Gerhardt,H., Faigle,M., Wolburg,H., and Neumeister,B. (2000). *Legionella* species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. *APMIS* 108, 398-408.
- Weaver,B.K., Kumar,K.P., and Reich,N.C. (1998). Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1359-1368.
- Weiss,S.J. (1986). Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548, 9-37.
- Welsh,C.T., Summersgill,J.T., and Miller,R.D. (2004). Increases in c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase and p38 activity in monocyte-derived macrophages following the uptake of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* 72, 1512-1518.
- Willingham,S.B., Bergstralh,D.T., O'Connor,W., Morrison,A.C., Taxman,D.J., Duncan,J.A., Barnoy,S., Venkatesan,M.M., Flavell,R.A., Deshmukh,M., Hoffman,H.M., and Ting,J.P. (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe* 2, 147-159.
- Wright,E.K., Goodart,S.A., Gowney,J.D., Hadinoto,V., Endrizzi,M.G., Long,E.M., Sadigh,K., Abney,A.L., Bernstein-Hanley,I., and Dietrich,W.F. (2003). Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr. Biol.* 13, 27-36.
- Xu,L.G., Wang,Y.Y., Han,K.J., Li,L.Y., Zhai,Z., and Shu,H.B. (2005). VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol. Cell.* 19, 727-740.
- Yamamoto,Y., Klein,T.W., and Friedman,H. (1994). *Legionella* and macrophages. *Immunol. Ser.* 60, 329-348.
- Yang,D., Biragyn,A., Hoover,D.M., Lubkowski,J., and Oppenheim,J.J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 181-215.

Referenzen

Yoneyama,M., Kikuchi,M., Natsukawa,T., Shinobu,N., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Akira,S., and Fujita,T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5, 730-737.

Yoneyama,M., Suhara,W., Fukuhara,Y., Fukuda,M., Nishida,E., and Fujita,T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 17, 1087-1095.

Zamboni,D.S., Kobayashi,K.S., Kohlsdorf,T., Ogura,Y., Long,E.M., Vance,R.E., Kuida,K., Mariathasan,S., Dixit,V.M., Flavell,R.A., Dietrich,W.F., and Roy,C.R. (2006). The Birc1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of *Legionella pneumophila* infection. *Nat. Immunol.* 7, 318-325.

Zamboni,D.S. and Rabinovitch,M. (2003). Nitric oxide partially controls *Coxiella burnetii* phase II infection in mouse primary macrophages. *Infect. Immun.* 71, 1225-1233.

9 Anhang

9.1 Publikationen und Kongressbeiträge

9.1.1 Originalarbeiten

Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke A, Zahlten J, Slevogt H, N Guessan PD, Gunther S, Schmeck B, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N, Opitz B. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6808-15

Opitz B, Rejaibi A, Eckhard J, **Vinzing M**, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Wolff T. IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol*. 2007 Apr;9(4):930-8.

Opitz B*, **Vinzing M***, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Gunther S, Preissner R, Slevogt H, N Guessan PD, Eitel J, Goldmann T, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S. *Legionella pneumophila* induced IFNbeta in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3 which also control bacterial replication. *J Biol Chem*. 2006 Nov 24;281(47):36173-9

* contributed equally

9.1.2 Kongressbeiträge

Vinzing M, Eitel J, Lippmann J, Hocke A, Zahlten J, Slevogt H, N Guessan PD, Gunther S, Schmeck B, Hippenstiel S, Flieger A, Suttorp N, Opitz B. NAIP and Ipaf control *Legionella pneumophila* replication in human cells. Workshop in the Experimental Sciences on: „Signal Transduction in Host-Bacterial Interactions“, Jerusalem 06. – 11. Oktober 2007

M. Vinzing, S. Hippenstiel, V. van Laak, B. Schmeck, G. Heine, S. Gunther, R. Preissner, S. Slevogt, P. N'Guessan, J. Eitel, T. Goldmann, A. Flieger, N. Suttorp and B. Opitz. *Legionella pneumophila* induced IFN β in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3 which also control bacterial replication. 7th World Congress on Trauma, Shock, Sepsis and Inflammation (TSIS 2007), München 13. – 17. März 2007, *Inflamm. Res.* 2007 Mar;56 (S2):291

B Opitz, **M Vinzing**, V van Laak, B Schmeck, H Slevogt, A Flieger, N Suttorp, S Hippenstiel. *L. pneumophila* activated different IFN-regulated factors and induced IFN β expression. Internationales CAPNETZ-Symposium „Community Acquired Pneumonia“, Berlin 20./21. Januar 2006, *Pneumologie* 2006 (02)

9.2 Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertationsarbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité Berlin realisieren und meine Ergebnisse auf Fachkonferenzen präsentieren zu können, möchte ich Prof. Dr. N. Suttrop danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Bastian Opitz für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas sowie für die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung. Die stete Bereitschaft zur Diskussion meiner Ergebnisse, die wertvollen Ratschläge und Anregungen trugen im Laufe meiner Arbeit wesentlich zum Gelingen meiner Dissertation bei. Ihm und vielen anderen Mitarbeitern des Labors verdanke ich das in mir geweckte Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten.

Ein großes Dankeschön gebührt Prof. Dr. L. Wieler für die Übernahme des Erstgutachtens und die Bereitschaft diese Arbeit als externe Arbeit zu betreuen und am Fachbereich Veterinärmedizin zu vertreten. Bei PD Dr. S. Hippenstiel und Prof. Dr. A. Gruber bedanke ich mich für die Übernahme des Zweit- bzw. Drittgutachtens.

Der gesamten Arbeitsgruppe, besonders Claudia, Janina, Janine, Julia, Juliane, Karolin, Kremena, Solveig, Steffi und Vincent, danke ich für die nette Atmosphäre und den fachlichen Austausch, die Unterstützung im Labor und vor allem für den Spaß, den wir zusammen hatten.

Desweiteren danke ich der AG Flieger, Nachwuchsgruppe 5, Robert Koch Institut, für die nette Zusammenarbeit und Hilfe in „Legionellen-Fragen“.

Ich danke Daniel für die jahrelange Unterstützung und Holger für den jetzigen Rückhalt sowie allen meinen Freunden, besonders Nadine, die meine Freizeit so bereichert haben, dass ich immer wieder neue Energie tanken konnte.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich immer vorbehaltlos in jeder Hinsicht unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen herzlichen Dank!

9.3 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Maya Vinzing, an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertationsarbeit von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Maya Vinzing