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

DISSERTATION

Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung durch Listeria monocytogenes

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Karolin Meixenberger aus Nürnberg

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. B. Opitz

- 2. Prof. Dr. med. P. Rosenstiel
- 3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. L. Hamann

Datum der Promotion: 16.04.2010

1 Inhaltsverzeichnis

1	In	halts	sverzeichnis	1
	1.1	Abb	ildungsverzeichnis	4
	1.2	Tab	ellenverzeichnis	6
	1.3	Abk	ürzungsverzeichnis	7
2	E	inleit	ung	10
	2.1	Liste	eria monocytogenes	10
	2.2	Liste	eriolysin O	12
	2.3	Ang	eborene und erworbene Immunantwort	13
	2.4	Rez	eptoren der angeborenen Immunantwort	14
	2.	4.1	Toll-like Rezeptoren	15
	2.	4.2	Nod-like Rezeptoren	16
		2.4.2	2.1 NOD1 und NOD2	17
		2.4.2	2.2 NLR-Inflammasome	18
		2.4.2	2.3 Andere NLRs	19
	2.	4.3	DNA-Rezeptoren	19
		2.4.3	3.1 DAI	20
		2.4.3	3.2 AIM2	20
	2.5	Zyto	kine2	20
	2.	5.1	Interleukin-1β2	21
	2.	5.2	Interleukin-8	22
	2.6	Die	angeborene Immunantwort in der Listerieninfektion	22
3	Α	ufgal	benstellung	24
4	Μ	ateri	al und Methoden 2	26
	4.1	Mate	erial2	26
	4.	1.1	Zellkultur	26
	4.	1.2	Stimulantien	27
	4.	1.3	Chemische Inhibitoren	<u>2</u> 7
	4.	1.4	RNA-Interferenz (RNAi)	<u>2</u> 7
	4.	1.5	Konfokalmikroskopie	<u>28</u>
	4.	1.6	Bakterienkultur	<u>29</u>
	4.	1.7	Reverse Transkription	30
	4.	1.8	Semi-quantitative PCR	30
	4.	1.9	Quantitative PCR	32

	4.	1.10 Enz	yme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	. 32	
	4.1.11 Western Blot				
	4.1.12 Geräte				
	4.2	Methode	n	. 36	
	4.	2.1 Zelll	biologische Methoden	. 36	
		4.2.1.1	Kultivierung von THP-1 Zellen	. 36	
		4.2.1.2	Isolierung und Kultivierung von PBMCs	. 36	
		4.2.1.3	Isolierung und Kultivierung von BMMs	. 37	
		4.2.1.4	RNA-Interferenz (RNAi)	. 37	
		4.2.1.5	Konfokalmikroskopie	. 37	
	4.	2.2 Mikı	obiologische Methoden	. 38	
		4.2.2.1	Bakterienkultur	. 38	
		4.2.2.2	Anzucht von Listerien	. 38	
		4.2.2.3	Infektion von ausdifferenzierten THP-1 mit Listerien	. 38	
		4.2.2.4	Infektion von PBMCs mit Listerien	. 39	
		4.2.2.5	Infektion von BMMs mit Listerien	. 39	
	4.	2.3 Mol	ekularbiologische Methoden	. 39	
		4.2.3.1	RNA-Isolierung	. 39	
		4.2.3.2	Reverse Transkription	. 40	
		4.2.3.3	Semi-quantitative PCR	. 40	
		4.2.3.4	Quantitative PCR	. 41	
	4.	2.4 Bioc	chemische Methoden	. 41	
		4.2.4.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	. 41	
		4.2.4.2	Western Blot	. 41	
	4.	.2.5 Stat	istik	. 42	
5	E	rgebnisso	9	43	
	5.1	Die L. m	onocytogenes-induzierte Produktion von IL-1 β in humanen		
		Monozyt	en ist abhängig von LLO	. 43	
	5.2	Expressi	on von Inflammasom-Komponenten in humanen Monozyten	. 49	
	5.3	5.3 Caspase-1 reguliert die <i>L. monocytogenes</i> -induzierte IL-1 β -Produktion in			
		humaner	n Monozyten	. 50	
	5.4	ASC ist a	an der <i>L. monocytogenes</i> -induzierten IL-1 β -Produktion in		
		humaner	n Monozyten beteiligt	. 53	

	5.5	NLRP3 vermittelt die <i>L. monocytogenes</i> -induzierte IL-1 β -Produktion in	
		humanen Monozyten	55
	5.6	Bedeutung des K ⁺ -Efflux für die Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion in	
		humanen PBMCs	64
	5.7	Bedeutung der Cathepsin B-Freisetzung für die Listerien-induzierte IL-1 β -	
		Produktion in humanen PBMCs	65
	5.8	Die Listerien-induzierte mIL-1 β -Produktion in murinen BMMs ist abhängig	
		von LLO, NIrp3 und Cathepsin B	67
	5.9	Aufgereinigtes LLO induziert die Produktion von IL-1 β in humanen PBMCs	
		und murinen BMMs in Abhängigkeit von NLRP3	70
	5.10) Bedeutung des K ⁺ -Efflux für die LLO-induzierte IL-1 β -Produktion in	
		humanen PBMCs und murinen BMMs	72
	5.11	Bedeutung der Cathepsin B-Freisetzung für die LLO-induzierte IL-1 β -	
		Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs	74
6	D	iskussion	76
	6.1	Rolle der listeriellen Virulenzfaktoren in der Listerien-induzierten IL-1 β	
		Produktion	76
	6.2	Charakterisierung des Inflammasoms, welches die L. monocytogenes-	
		induzierte IL-1β-Produktion vermittelt	78
	6.3	Untersuchung der NLRP3-Aktivierung durch L. monocytogenes	84
	6.4	Modell der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion	90
7	Z	usammenfassung	92
8	Li	iteraturverzeichnis	93
9	Α	nhang 1	04
	9.1	Publikationsliste	04
	9.2	Kongressbeiträge 1	04
	9.3	Danksagung 1	05
	9.4	Tabellarischer Lebenslauf	06
	9.5	Eigenständigkeitserklärung 1	07

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i>	12
Abbildung 2-2:	Aktivatoren und Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren	16
Abbildung 2-3:	Struktur der Nod-like Rezeptoren	17
Abbildung 5-1:	Vergleich der L. monocytogenes EGD- und L. monocytogenes	
	EGD Δhly -induzierten IL-1 β -Produktion in humanen Monozyten	44
Abbildung 5-2:	Vergleich der L. monocytogenes EGD- und L. monocytogenes	
	EGD <i>hly</i> W492A-induzierten IL-1 β -Produktion in humanen	
	PBMCs	45
Abbildung 5-3:	Vergleich der L. monocytogenes- und L. innocua-induzierten	
	IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	46
Abbildung 5-4:	Vergleich der L. monocytogenes EGD und L. monocytogenes	
	$EGD\ {\it \Delta plcAplcB}\text{-}induzierten\ IL-1\beta\text{-}Produktion\ in\ humanen\ PBMCs$	47
Abbildung 5-5:	Proteinexpression und mRNA-Expression von IL-1 β in Listerien-	
	infizierten humanen PBMCs	48
Abbildung 5-6:	mRNA-Expression möglicher Inflammasom-Komponenten in	
	humanen PBMCs	49
Abbildung 5-7:	IL-1 β -Produktion in Listerien-infizierten humanen PBMCs unter	
	Inhibierung von Caspase-1	50
Abbildung 5-8:	Expression von pro-IL-1 β und IL-1 β in Listerien-infizierten	
	humanen PBMCs unter Inhibierung von Caspase-1	51
Abbildung 5-9:	Einfluss der Expressionshemmung von Caspase-1 auf die	
	Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen THP-1	52
Abbildung 5-10	D: Einfluss der Expressionshemmung von ASC auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen THP-1	54
Abbildung 5-1	1: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP3 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	56
Abbildung 5-12	2: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP3 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen THP-1	57
Abbildung 5-13	3: Einfluss der Expressionshemmung von NLRC4 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	58
Abbildung 5-14	4: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP1 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	59

Abbildung 5-15:	Einfluss der Expressionshemmung von NOD2 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	60
Abbildung 5-16:	Einfluss der Expressionshemmung von AIM2 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	61
Abbildung 5-17:	Einfluss der Expressionshemmung von NLRP6 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	62
Abbildung 5-18:	Einfluss der Expressionshemmung von NLRP12 auf die Listerien-	
	induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	63
Abbildung 5-19:	Bedeutung des K ⁺ -Efflux für die Listerien-induzierte IL-1 β -	
	Produktion in humanen PBMCs	65
Abbildung 5-20:	Bedeutung von Cathepsin B und lysosomaler Ansäuerung für die	
	Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs	66
Abbildung 5-21:	Abhängigkeit der mIL-1 β -Produktion in Listerien-infizierten	
	murinen BMMs von LLO, NIrp3 und Cathepsin B	68
Abbildung 5-22:	Konfokalmikroskopie von Cathepsin B in Listerien-infizierten	
	murinen BMMs	69
Abbildung 5-23:	Dosis-abhängige Produktion von IL-1 eta nach Stimulation von	
	humanen PBMCs oder murinen BMMs mit LLO	71
Abbildung 5-24:	Bedeutung von NLRP3 für die IL-1 β -Produktion in LLO-	
	stimulierten humanen PBMCs und murinen BMMs	72
Abbildung 5-25:	Bedeutung des K ⁺ -Efflux für die LLO-induzierte IL-1 β -Produktion	
	in humanen PBMCs und murinen BMMs	73
Abbildung 5-26:	Bedeutung von Cathepsin B für die LLO-induzierte IL-1 β -	
	Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs	74
Abbildung 6-1: N	Nögliche Mechanismen der NLRP3-Aktivierung	85
Abbildung 6-2: M	Modell der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion	91

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Zellen	. 26
Tabelle 4-2: Medien für die Zellkultur	. 26
Tabelle 4-3: Materialien für die Zellkultur	. 27
Tabelle 4-4: Chemische Inhibitoren	. 27
Tabelle 4-5: Materialien für RNAi	. 27
Tabelle 4-6: siRNA-Sequenzen	. 28
Tabelle 4-7: Primäre Antikörper für Konfokalmikroskopie	. 28
Tabelle 4-8: Sekundäre Antikörper für Konfokalmikroskopie	. 28
Tabelle 4-9: Reagenzien für Konfokalmikroskopie	. 29
Tabelle 4-10: Bakterienstämme	. 29
Tabelle 4-11: Medien für die Bakterienkultur	. 30
Tabelle 4-12: Materialien für Reverse Transkription	. 30
Tabelle 4-13: Materialien für semi-quantitative PCR	. 30
Tabelle 4-14: Primer für semi-quantitative PCR	. 31
Tabelle 4-15: Materialien für DNA-Gelelektrophorese	. 32
Tabelle 4-16: Materialien für Quantitative PCR	. 32
Tabelle 4-17: Materialien für ELISA	. 32
Tabelle 4-18: Materialien für Western Blot	. 32
Tabelle 4-19: Reagenzien für Western Blot	. 33
Tabelle 4-20: Primäre Antikörper für Western Blot	. 34
Tabelle 4-21: Sekundäre Antikörper für Western Blot	. 34
Tabelle 4-22: Speziell verwendete Geräte	. 35

1.3 Abkürzungsverzeichnis

Das Abkürzungsverzeichnis enthält keine gängigen Abkürzungen (z. B., u. a., bzw.) sowie SI-Einheiten und deren Präfixe.

AD	acidic transactivation domain
AF	Alexa Fluor
AIM2	absent in melanoma 2
Aqua bidest.	doppelt destilliertes Wasser
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	brain heart infusion
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain
BMMs	bone marrow macrophages
CARD	caspase recruitment domain
CDC	cholesterol dependent cytolysin
CIITA	class II major histocompatibility complex transactivator
CLSM	confocal laser sanning microscopy
DAI	DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC	dentritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleinacid
dNTP	desoxyribonucleotide triphosphate
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
ds	double-stranded, doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	fetal calve serum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCI	Salzsäure
HIN	hematopoietic interferon-inducible nuclear protein
IFN	Interferon

lgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IRF	interferon regulatory factor
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
КО	Knock-Out
LLO	Listeriolysin O
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine rich repeat
LTA	Lipoteichonsäure
Mal	MyD88 adaptor-like
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDP	Muramyl Dipeptid
mlL-1β	murines IL-1β
M-MLV	moloney murine leukaemia virus
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NAIP	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor-κB
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	Nod-like Rezeptor
NLRA	Nod-like receptor containing AD
NLRB	Nod-like receptor containing BIR
NLRC	Nod-like receptor containing CARD
NLRP	Nod-like receptor containing PYD
NLRX	Nod-like receptor X
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
OD	optische Dichte
P2X7R	P2X7-Rezeptor
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphat buffered saline

PC-PLC	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PGN	Peptidoglykan
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	pattern recognition receptor
PYD	pyrin domain
RIG-I	retinoic-acid-inducible gene-I
RIP2	receptor interacting protein 2
RNA	ribonucleinacid
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RPMI 1640	Zellmedium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
SS	single-stranded, einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBK1	TANK-binding kinase 1
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TIR	Toll-/IL-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	tumor necrosis factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	domain-containing adaptor-inducing IFN- β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp

2 Einleitung

2.1 Listeria monocytogenes

Die Gattung *Listeria* besteht aus gegenwärtig sechs identifizierten Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* und *L. grayi*. Humanpathogen ist nur *L. monocytogenes*, tierpathogen sind *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*. Alle anderen Spezies sind apathogen (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Listeria monocytogenes verursacht die Listeriose, eine Infektionskrankheit mit den klinischen Formen der Gastroenteritis, Meningitis, Enzephalitis oder Sepsis. Die durchschnittliche Mortalitätsrate beträgt 30%. Betroffen sind vorwiegend durch Alter oder Krankheit immungeschwächte Menschen. Besonders gefährlich ist eine Listerieninfektion in der Schwangerschaft, da die Infektion zu Fehl-/Frühgeburt oder zu schwerwiegender Neugeborenenlisteriose führt. L. monocytogenes ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke, die Darmepithelschranke und die Plazentaschranke zu überwinden. Die Aufnahme von L. monocytogenes erfolgt durch kontaminierte Nahrung in Form von rohen tierischen Lebensmittel oder ungewaschenem Obst und Gemüse. L. monocytogenes ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes und fakultativ intrazelluläres Stäbchenbakterium. Es ist bei 10°C bis 25°C peritrich begeißelt und kann in einem breiten Temperatur- und pH-Bereich überleben und sich vermehren. L. monocytogenes besitzt zahlreiche Virulenzfaktoren, von denen sechs auf der "Listeria Pathogenity Island 1" (LIPI-1) kodiert sind. Zu diesen zählen das durch hly kodierte Listeriolysin O (LLO), die durch plcA kodierte Phosphatidylinositolspezifische Phospholipase C (PI-PLC) und die durch plcB kodierte Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC). Das apathogene besitzt keine LIPI-1. Dahingegen Bakterium L. innocua besitzen sowohl L. monocytogenes als auch L. innocua die Gene inlA und inlB, welche für Internalin A und Internalin B kodieren (Hamon et al., 2006; Vazquez-Boland et al., 2001).

L. monocytogenes kann phagozytierende Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, sowie nicht-phagozytierende Zellen, wie Endothelzellen und Epithelzellen, invadieren. Die Invasion von phagozytierenden Zellen durch *L. monocytogenes* verläuft passiv durch Phagozytose. Die Internalisierung der Bakterien in nicht-phagozytierende Zellen erfolgt durch eine Internalin A- oder Internalin B-induzierte Rezeptorvermittelte Endozytose nach dem Zipper-Mechanismus (Cossart and Sansonetti, 2004). Das Rezeptormolekül für Internalin A ist E-Cadherin, ein Zelladhäsionsprotein,

10

welches ausschließlich auf Epithelzellen exprimiert wird. Internalin B hingegen kann mit mindestens drei Liganden interagieren, wobei bislang nur für die Bindung an den auf vielen Zelltypen exprimierten "Hepatocyte Growth Factor Receptor" (HGF-R, c-Met) eine Rolle in der Zellinvasion definiert wurde (Hamon et al., 2006;Cossart and Sansonetti, 2004). Nach Aufnahme in die Wirtszelle befreit sich L. monocytogenes mit Hilfe des Virulenzfaktors LLO unter Mitwirkung von PI-PLC und PC-PLC aus der Vakuole. Etwa zwei Stunden nach Infektion liegen die Bakterien frei im Zellzytosol vor. Dort vermehren sie sich mit einer Verdopplungszeit von etwa einer Stunde. Der listerielle Virulenzfaktor ActA induziert die Polymerisation von Wirtszell-Aktin und ermöglicht L. monocytogenes sich intrazellulär zu bewegen sowie in benachbarte Zellen überzutreten. Bei dieser Zell-zu-Zell-Wanderung verlässt L. monocytogenes in einer Membranausstülpung die infizierte Wirtszelle und wird von einer Nachbarzelle aufgenommen ohne mit der extrazellulären Umgebung in Kontakt zu kommen. In der neu infizierten Zelle befindet sich L. monocytogenes in einer Doppelmembran-Vakuole, welche das Bakterium wiederum durch LLO in Kooperation mit den Phospholipasen C zerstört, um sich nachfolgend im Zellzytosol zu vermehren (Alberti-Segui et al., 2007; Tilney and Portnoy, 1989). Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist in Abbildung 2-1 bildlich dargestellt.



Abbildung 2-1: Infektionszyklus von Listeria monocytogenes

L. monocytogenes invadiert eine Wirtszelle (1), befindet in der Vakuole (2), lysiert die Vakuole (3), liegt frei im Zytosol vor (4), vermehrt sich (5), polymerisiert Wirtszellaktin (6), bewegt sich durch Aktinbildung intrazellulär (7-9), invadiert eine uninfizierte Nachbarzelle (10), befindet sich in einer Doppelmembran-Vakuole (11), lysiert die Doppelmembran-Vakuole (12), liegt frei im Zytosol der neu infizierten Zelle vor (13).

Aus Schubert und Heinz. ChemBioChem. 2003. 4(12):1285-91.

2.2 Listeriolysin O

Listeriolysin O (LLO) ist der Hauptvirulenzfaktor von Listeria monocytogenes und essentiell für das Entkommen des Bakteriums aus der Vakuole. LLO gehört zu der Familie der porenbildenden Cholesterol-bindenden Zytolysine (cholesterol-dependent cytolysins, CDCs), welche etwa 20 Toxine umfasst und von verschiedenen Grampositiven Bakterien sekretiert werden. Das LLO-Toxin-Monomer besteht aus vier Domänen. Die C-terminale Domäne 4 bindet an cholesterolreiche Regionen von Membranen. Nachfolgende Konformationsänderungen führen zur Oligomerisation mehrerer LLO-Moleküle und zur Porenbildung. Die Domäne 4 enthält das für die zytolytische Aktivität verantwortliche Undecapeptid, eine zwischen den verschiedenen CDCs stark konservierte Struktur. Das Undecapeptid von LLO besteht aus 11 Aminosäuren von Position 483 bis 493 mit der Aminosäureseguenz ECTGLAWEWWR (Schnupf and Portnoy, 2007). Durch Mutation von Tryptophan (W) an Position 492 zu Alanin (A) verliert LLO seine zytolytische Aktivität, wobei die Fähigkeit zur Membranbindung erhalten bleibt (Michel *et al.*, 1990). Die Aktivität von

LLO ist von bakterieller Seite aus auf mehreren Ebenen reguliert. So wird die Transkription von LLO während der intrazellulären Infektion gesteigert (Shen and Higgins, 2005) und die Aktivität von LLO wird post-translational durch ein pH- und Temperaturoptimum kontrolliert (Schuerch *et al.*, 2005).

2.3 Angeborene und erworbene Immunantwort

Das angeborene Immunsystem dient der sofortigen Abwehr eindringender Mirkoorganismen sowie der Aktivierung der erworbenen Immunantwort. Die Epithelbarriere bietet einen physikalischen und chemischen Schutz gegen Mikroorganismen. Überwindet ein Krankheitserreger diese Barriere, trifft er im Gewebe auf Phagozyten (vornehmlich Makrophagen), welche die angeborene Immunantwort maßgeblich regulieren. Eindringende Pathogene werden phagozytiert und es werden Zytokine, Chemokine und antimikrobiellen Peptide gebildet. Durch die freigesetzten Zytokine und Chemokine werden weitere Phagozyten (Granulozyten, Dentritische Zellen, NK-Zellen) aus dem Blut angelockt (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Die Effektormechanismen der angeborenen Immunantwort werden aktiviert durch die Erkennung von konservierten mikrobiellen Molekülstrukturen (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; auch: MAMPs, microbe-associated molecular patterns) über keimbahnkodierte signalgebende Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, pattern recognition receptors). Darüber hinaus können die PRRs auch DAMPs (danger-associated molecular patterns) erkennen. DAMPs sind endogene Moleküle, welche bei Zellstress oder Zellschädigung gebildet werden (Kawai and Akira, 2009; Matzinger, 2002). Intrazelluläre Mikroorganismen, welche vielen Effektormechanismen der angeborenen Immunantwort entgehen, werden durch angeborene intrazelluläre Resistenzmechanismen, wie Autophagie und Bildung von Stickstoffmonoxid, bekämpft (Radtke and O'Riordan, 2006). Die nachfolgende Steuerung der erworbenen Immunantwort durch die angeborene Immunantwort erfolgt über Antigen-präsentierende Zellen. Überwiegend die Dentritischen Zellen, aber auch Makrophagen, präsentieren Antigene von phagozytierten Mikroorganismen über MHC-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Zugleich wird durch die Erkennung von PAMPs über PRRs die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche der Antigenpräsentierenden Zelle induziert. Naive T-Lymphozyten erkennen die MHCpräsentierten Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor und parallel die kostimulatorischen

13

Einleitung

Moleküle über CD28. Diese beiden Signale gemeinsam vermitteln die Aktivierung der T-Lymphozyten. Es erfolgt eine klonale Expansion der T-Lymphozyten mit passendem T-Zell-Rezeptor. Im Gegensatz zu den keimbahnkodierten PRRs der angeborenen Immunantwort entstehen die Antigen-bindenden Rezeptoren der Tund B-Lymphozyten durch somatische Genumlagerung. Aus aktivierten T-Lymphozyten entstehen entweder zytotoxische T-Zellen, welche Zellen töten die mit intrazellulären Erregern infiziert sind, oder T-Helferzellen, welche Makrophagen und B-Zellen aktivieren. B-Lymphozyten werden aktiviert, wenn sie über ihren B-Zell-Rezeptor ein Antigen binden und kostimulierende Signale von einer T-Helferzelle erhalten. Aktivierte **B-Zellen** differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen, welche extrazelluläre Pathogene bekämpfen. Aufgrund dieser Selektions- und Differenzierungsvorgänge findet die erworbene Immunantwort zeitlich verzögert zu der angeborenen Immunantwort statt (Palm and Medzhitov, 2009; Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002).

2.4 Rezeptoren der angeborenen Immunantwort

Die keimbahnkodierten Rezeptoren der angeborenen Immunantwort haben die Aufgabe eindringende Pathogene oder deren Toxine zu erkennen. PRRs werden von einer Vielzahl von Zellen exprimiert und detektieren konservierte mikrobielle Molekülstrukturen. Es gibt lösliche, membrangebundene und zytosolische PRRs. Die PRRs induzieren Phagozytose, aktivieren Signalwege oder das Komplementsystem. Zu den löslichen Rezeptoren der angeborenen Immunantwort zählen das Mannosebindende Lektin (MBL), das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum Amyloid Protein (SAP), welche als Opsonine wirken und das Komplementsystem aktivieren. Auf der Zelloberfläche von Makrophagen sind der Mannose Rezeptor (MMR) und der Makrophagen Scavenger Rezeptor (MSR) exprimiert, welche bei Ligandenbindung die Phagozytose des Mikroorganismus induzieren (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002). Die membrangebundenen oder löslichen C-type lectin Rezeptoren (CLRs) können Phagozytose und zum Teil die Genexpression inflammatorischer Mediatoren aktivieren (Geijtenbeek and Gringhuis, 2009). Die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind signalgebende PRRs, welche transkriptionell die Produktion von inflammatorischen Mediatoren steuern (Kawai and Akira, 2009). Zu den zytosolischen signalgebenden PRRs zählen die Nod-like Rezeptoren (NLRs) (Martinon et al., 2009; Le Bourhis et al., 2007), RIG-I-like Rezeptoren (RLRs) (Yoneyama and Fujita, 2009) sowie zytosolische DNA-erkennende Rezeptoren (Hornung *et al.*, 2009;Takaoka *et al.*, 2007). Auf einige signalgebende PRRs wird im Folgenden genauer eingegangen.

2.4.1 Toll-like Rezeptoren

Die Familie der humanen Toll-like Rezeptoren (TLRs) umfasst 10 Proteine. TLRs sind transmembranäre Proteine, welche eine LRR-Domäne zur Ligandenbindung und eine TIR-Domäne für die Signaltransduktion besitzen. Die TLRs bilden Homooder Heterodimere zur Erkennung verschiedener mikrobieller Komponenten von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und wahrscheinlich TLR10 werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in endosomalen Membranen exprimiert werden. TLR2 oder TLR6 z.B. erkennt zusammen mit TLR1 bakterielle Lipoproteine, Lipoteichonsäure (LTA) und Peptidoglykan (PGN). Lipopolysaccharid (LPS) wird von TLR4 erkannt und Flagellin von TLR5. TLR3 detektiert doppelsträngige RNA (dsRNA), TLR7/8 einzelsträngige RNA (ssRNA) und TLR9 unmethylierte CpG-DNA. Die Signalübertragung der TLRs ist abhängig von der differentiellen Rekrutierung der Adapterproteine MyD88, Mal, TRAM und TRIF. Die aktivierte Signalkaskade mündet in einer NF-κB-abhängigen Expression von inflammatorischen Zytokinen. Einige TLRs aktivieren darüber hinaus eine IRF-abhängige Expression von Typ I Interferonen (Kawai and Akira, 2009). Die Aktivatoren der TLRs und ihre Signaltransduktion sind in Abbildung 2-2 schematisch dargestellt.



Abbildung 2-2: Aktivatoren und Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren Verändert nach Opitz *et. al. Thrombosis and Haemostasis*. 2009. 102(6):1103-9.

2.4.2 Nod-like Rezeptoren

Die Familie der humanen Nod-like Rezeptoren (NLRs) umfasst 22 intrazelluläre Proteine. **NLRs** besitzen eine C-terminale LRR-Domäne, welche das Aktivierungssignal welche erkennt, eine zentrale Nod-Domäne, für die Oligomerisierung zuständig ist, und eine N-terminale Effektordomäne für die Signaltransduktion. Nach ihren unterschiedlichen N-Termini werden die NLRs in fünf Untergruppen eingeteilt (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP, NLRX). Für NLRA, NLRB und NLRX gibt es je nur einen Vertreter, nämlich CIITA, NAIP und NLRX1, deren Nterminale Domänen eine AD (acidic transactivation domain), eine BIR (baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain) und eine noch nicht charakterisierte Domäne sind. NLRCs besitzen eine CARD (caspase recruitment domain) und NLRPs eine PYD (pyrin domain) als N-terminale Effektordomäne (Martinon et al., 2009). Die Struktur der NLRs ist in Abbildung 2-3 veranschaulicht.



Abbildung 2-3: Struktur der Nod-like Rezeptoren

Verändert nach Martinon et. al. Annu. Rev. Immunol. 2009. 27:229-65.

2.4.2.1 NOD1 und NOD2

Die NLRs NOD1 (NLRC1) und NOD2 (NLRC2) sind bisher am besten untersucht. Die Proteine liegen in inaktiver Form im Zellzytosol vor und unterlaufen nach Konformationsänderungen, Aktivierung welche Oligomerisation und Signaltransduktion erlauben. NOD1 erkennt Meso-Diaminopimelinsäure, ein Peptidoglykanbestandteil von Gram-negativen und einigen Gram-positiven Bakterien, z. B. wie Listeria. NOD2 erkennt Muramy Dipeptid (MDP), ein Peptidoglykanfragment von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien. Diese Peptidoglykanbestandteile entstehen beim bakteriellen Wachstum und können durch bakterielle porenbildende Toxine, Membrantransporterproteine oder Endozytose in das Zellinnere gelangen bzw. werden von intrazellulären Bakterien freigesetzt. Die Signaltransduktion von NOD1 und NOD2 ist abhängig von dem Adaptermolekül RIP2 und führt zu der Aktivierung von MAP-Kinasen sowie zu einer NF-κB-abhängigen Gentranskription pro-inflammatorischer Zytokine. Polymorphismen von NLRC1 werden mit erhöhter Allergieanfälligkeit und Mutationen von NLRC2 mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (Morbus Crohn) in Verbindung gebracht (Le Bourhis et al., 2007).

2.4.2.2 NLR-Inflammasome

Einige NLRs, wie NLRP1, NLRP3 und NLRC4, können einen Caspase-1aktivierenden Multiproteinkomplex bilden, welcher als Inflammasom bezeichnet wird (Martinon *et al.*, 2002). Die meisten Inflammasome enthalten neben dem NLR und Caspase-1 auch das Adaptermolekül ASC, welches aus CARD und PYD besteht. ASC verbindet die PYD des NLRs mit der CARD von Caspase-1. Aktivierte Caspase-1 prozessiert die inaktiven Proteinproformen pro-IL-1 β und pro-IL-18 in die biologisch aktiven Zytokine IL-1 β und IL-18 (Martinon *et al.*, 2009).

Das humane NLRP1 und das murine Homolog Nlrp1b reagieren auf MDP (Hsu *et al.*, 2008;Bruey *et al.*, 2007;Faustin *et al.*, 2007). Des Weiteren wird das murine Nlrp1b-Inflammasom durch Anthrax Lethal Toxin von *Bacillus anthracis* aktiviert (Boyden and Dietrich, 2006). Neben der Freisetzung von IL-1β und IL-18 kommt es hierbei auch zu einem Caspase-1-abhängigen programmierten Zelltod, welcher Pyroptose genannt wird (Newman *et al.*, 2009;Wickliffe *et al.*, 2008;Fink *et al.*, 2008). Das Adaptermolekül ASC ist für die Bildung des humanen NLRP1-Inflammasoms strukturell nicht erforderlich, da NLRP1 direkt über CARD-CARD Interaktion Caspase-1 rekrutieren kann, jedoch steigert ASC die Aktivität des Inflammasoms (Faustin *et al.*, 2007;Martinon *et al.*, 2002). Aufgrund einer fehlenden PYD in Nlrp1b ist ASC kein Bestandteil des murinen Nlrp1b-Inflammasoms (Nour *et al.*, 2009).

Das humane NLRP3- und das murine NIrp3-Inflammasom werden durch eine Vielzahl von mikrobiellen, nicht-mikrobiellen und endogenen Stimuli aktiviert. Beispiele hierfür sind Tetanolysin (Chu et al., 2009), Hemozoin (Tiemi et al., 2009), ATP (Mariathasan et al., 2006), Siliziumkristalle (Hornung et al., 2008;Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008), Neisseria gonorrhoeae (Duncan et al., 2009) und Amyloidβ (Halle et al., 2008). Für die Bildung des NLRP3/Nlrp3-Inflammasoms ist das Adaptermolekül ASC essentiell (Agostini et al., 2004). NLRP3/Nlrp3 induziert zudem einen Caspase-1-unabhängigen Zelltod durch sogenannte Pyronekrose in Shigella flexneri-, Neisseria gonorrhoeae- oder Klebsiella pneumoniae-infizierten THP-1 und Mausmakrophagen (Duncan et al., 2009; Willingham et al., 2009; Willingham et al., 2007). Mutationen in NLRP3 verursachen die autoinflammatorischen Erkrankungen FCAS (Familiäre Kälteurtikaria), CINCA-Syndrom (neonatal beginnende Systemerkrankung) und Muckle-Wells-Syndrom (Martinon et al., 2009).

Das murine NIrc4 wird aktiviert durch zytosolisches Flagellin oder durch flagellierte Salmonella typhimurium (Mariathasan et al., 2006;Miao et al., 2006;Franchi et al.,

2006), Legionella pneumophila (Case et al., 2009), Pseudomonas aeruginosa (Miao et al., 2008;Sutterwala et al., 2007;Franchi et al., 2007b) und Listeria monocytogenes (Warren et al., 2008). Aber auch nicht-flagellierte Shigella flexneri werden von NIrc4 erkannt (Suzuki et al., 2007). NIrc4 kann Caspase-1 direkt über CARD-CARD Interaktion rekrutieren, dennoch scheint ASC an der NIrc4-vermittelten, Caspase-1-abhängigen Zytokinsekretion beteiligt zu sein. Des Weiteren vermittelt NIrc4 einen Pathogen-induzierten ASC-unabhängigen, Caspase-1-abhängigen Zelltod (Case et al., 2009;Sutterwala et al., 2007;Suzuki et al., 2007;Franchi et al., 2007b). Bei der Erkennung von Flagellin aus *L. pneumophila*, nicht aber aus *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* oder *L. monocytogenes*, spielt neben NIrc4 auch Naip5 (murines Homolog des humanen NAIP) eine Rolle (Miao et al., 2008;Lightfield et al., 2008). NLRC4/NIrc4 kontrolliert in Kooperation mit NAIP/Naip5 die Vermehrung von Legionella pneumophila über einen noch nicht genau verstandenen Mechanismus (Vinzing et al., 2008;Zamboni et al., 2006).

2.4.2.3 Andere NLRs

Über die anderen 17 NLRs ist relativ wenig bekannt. Potentiell bilden NLRP2, NRLP6 und NLRP12 ebenfalls Caspase-1-aktivierende Inflammasome (Bruey *et al.*, 2004;Agostini *et al.*, 2004;Grenier *et al.*, 2002;Wang *et al.*, 2002). Dahingegen scheinen NLRP7 und NLRP10 möglicherweise die Aktivierung von Caspase-1 zu inhibieren (Kinoshita *et al.*, 2005;Wang *et al.*, 2004). Verschiedene in vitro-Studien zeigen zudem, dass NLRP2, NLRP4, NLRP12 und NLRC3 möglicherweise negativ regulierend auf die TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B wirken können (Williams *et al.*, 2005;Conti *et al.*, 2005;Bruey *et al.*, 2004;Fiorentino *et al.*, 2002).

2.4.3 DNA-Rezeptoren

Zu den signalvermittelnden PRRs zählen auch DNA-erkennende Rezeptoren, welche zum Teil noch nicht genau charakterisiert sind (Kawai and Akira, 2009). Kürzlich wurden die zytosolischen DNA-Rezeptoren DAI (ZBP-1, DLM-1) und AIM2 entdeckt.

19

2.4.3.1 DAI

DAI erkennt doppelsträngige DNA (dsDNA) über seine Amino-terminale Region und induziert über seine Carboxy-terminale Region einen IRF3-TBK1-vermittelten Signalweg zur Bildung von IFN- β in L929 Mausfibroblasten (Takaoka *et al.*, 2007). Allerdings scheint diese Signaltransduktion Zell- und Speziesspezifisch zu sein, da DAI nicht essentiell ist für die Interferon- β -Antwort auf zytosolische dsDNA in murinen embryonischen Fibroblasten, Makrophagen und Dentritischen Zellen sowie in humanen A549 und THP-1 (Wang *et al.*, 2008;Ishii *et al.*, 2008;Lippmann *et al.*, 2008).

2.4.3.2 AIM2

AIM2 gehört zur Familie der HIN200-Proteine und besitzt eine C-terminale HIN-Domäne sowie eine N-terminale PYD. Die Expression von AIM2 ist durch Typ I Interferone induzierbar. Für AIM2 wurde in humanen und murinen Zellen die Bildung eines Caspase-1-aktivierenden Inflammasoms beschrieben. AIM2 interagiert über PYD mit ASC und erkennt über seine HIN-Domäne zytosolische dsDNA. Das AIM2-Inflammasom ist das bisher einzige beschriebene Inflammasom, welches seinen Liganden vermutlich direkt bindet. Die Aktivierung von Caspase-1 durch das AIM2-Inflammasoms induziert die Produktion von IL-1 β sowie einen Zelltod durch Pyroptose (Burckstummer *et al.*, 2009;Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009;Hornung *et al.*, 2009).

2.5 Zytokine

Die Erkennung von PAMPs durch signalgebende PRRs aktiviert u. a. die Produktion von Zytokinen. Zytokine binden autokrin, parakrin oder endokrin an entsprechende Zytokinrezeptoren auf Zelloberflächen und bewirken Proliferation, Migration, Differenzierung, Aktivierung oder Apoptose von Zellen und wirken damit antiinflammatorisch oder pro-inflammatorisch auf den Inflammationsprozess. Darüber hinaus sind Zytokine an der Steuerung der erworbenen Immunantwort beteiligt. Zytokine, welche andere Zellen mit passendem Zytokinrezeptor anlocken, werden auch als chemotaktische Zytokine oder Chemokine bezeichnet. Nach ihrer Struktur oder Wirkung unterscheidet man Zytokine zudem in Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Typ I und Typ II Interferone (IFN), Transformierende Wachstumsfaktoren (TGF) und Koloniestimulierende Faktoren (CSF). In der initialen Phase der angeborenen Immunantwort auf eindringende Pathogene sind die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β besonders wichtig. Nachfolgend spielen zudem Zytokine wie IL-6, IFN- γ und IL-8 eine bedeutende Rolle (Janeway, Jr. and Medzhitov, 2002).

2.5.1 Interleukin-1β

Das pro-inflammatorische Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) wird von Monozyten, Makrophagen, Dentritischen Zellen, NK-Zellen und B-Lymphozyten gebildet. Die Produktion von IL-1β wird dreistufig kontrolliert: Zuerst erfolgt eine NF-κB-abhängige Gentranskription und nachfolgende Translation der inaktiven Proteinproform pro-IL-1 β im Zellzytosol. Als nächstes prozessiert aktive Caspase-1 das pro-IL-1 β in seine biologisch aktive Form IL-1^β. Dieser Schritt ist abhängig von der Aktivierung der Caspase-1 durch ein Inflammasom. Zuletzt erfolgt die Ausschleusung von IL-1ß aus der Zelle über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus (Dinarello, 2009). Mögliche Wege umfassen die Exozytose von sekretorischen Lysosomen, das Absondern von Plasmamembran-Mikrovesikeln oder einen direkten Austritt über die Plasmamembran. Alle Mechanismen erfordern einen Ca²⁺-Influx in das Zellzytosol, z. B. über die Plasmamembran oder durch Freisetzung von Ca²⁺ aus Lysosomen und dem Endoplasmatischen Retikulum (Qu et al., 2007;Andrei et al., 2004). Nach Sekretion bindet IL-1^β an den IL-1 Rezeptor (IL-1R) und aktiviert autokrin und parakrin Signalkaskaden zur Produktion von Effektormolekülen. Der IL-1R besitzt eine Immunglobulin-ähnliche-Domäne zur Ligandenbindung und eine intrazelluläre TIR-Domäne, über welche er das Adaptermolekül MyD88 rekrutiert und eine NF-κBabhängige Gentranskription induziert (Dinarello, 2009). Ein weiteres Mitglied der IL-1-Zytokinfamilie, welches ebenfalls durch Caspase-1 prozessiert wird, ist Interleukin-18 (IL-18). Post-translationale Prozessierung, Sekretion, Bindung an den IL-18-Rezeptor und induzierte Signaltransduktion verlaufen für IL-18 ähnlich wie für IL-1 β , allerdings ist pro-IL-18 in manchen Zellen, wie humanen PBMCs und DCs, konstitutiv exprimiert. IL-18 induziert in Synergie mit IL-12 die Bildung des Typ II Interferons IFN- γ durch T-Zellen und NK-Zellen. IFN- γ aktiviert wiederum Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und NK-Zellen (Dinarello, 2009).

2.5.2 Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein chemotaktisches Zytokin, welches Leukozyten und T-Lymphozyten anlockt (Strieter, 2002). Es wird von einer Vielzahl von Zellen nach Infektion mit Mikroorganismen oder Exposition mit PAMPS gebildet, wie z. B. von Makrophagen und Endothelzellen nach Infektion mit *L. monocytogenes (Opitz et al., 2006)*. Die Gentranskription von IL-8 erfolgt NF- κ B- oder MAPK-abhängig und die Proteintranslation und -sekretion erfolgt über die klassische Endoplasmatisches Retikulum-Golgi-Route (Strieter, 2002). Im Gegensatz zu IL-1 β oder IL-18 ist IL-8 nicht post-translational Caspase-1-abhängig reguliert.

2.6 Die angeborene Immunantwort in der Listerieninfektion

Listeria monocytogenes exprimiert zahlreiche Moleküle (PAMPs), welche von Rezeptoren der angeborenen Immunantwort erkannt werden können. Hierzu zählen Peptidoglykan, Lipoprotein, Lipoteichonsäure, Flagellin, LLO sowie listerielle DNA und RNA. Einige potentielle PRRs hierfür wurden bereits in *in vitro*- oder *in vivo*-Studien auf ihre Bedeutung in der Listerieninfektion untersucht.

Die pathogenen *L. monocytogenes* und die apathogenen *L. innocua* werden über das listerielle Lipoprotein von TLR2 erkannt (Machata *et al.*, 2008). TLR2 Knock-Out und MyD88 Knock-Out Mäuse sind anfälliger gegen eine Listerieninfektion als Wildtyp Mäuse (Torres *et al.*, 2004;Seki *et al.*, 2002;Edelson and Unanue, 2002). TLR2 Knock-Out Mäuse zeigen eine eingeschränkte Fähigkeit zur Bildung von IL-12, IFN- γ und TNF- α bei Infektion mit *L. monocytogenes* (Torres *et al.*, 2004;Seki *et al.*, 2002). Dahingegen können MyD88 Knock-Out Mäuse überhaupt kein IFN- γ und TNF- α bilden (Torres *et al.*, 2004;Seki *et al.*, 2002;Edelson and Unanue, 2002). Demnach scheinen neben TLR2 noch andere PRRs, welche ebenfalls das Adapterprotein MyD88 zur Signaltransduktion nutzen, an der Bildung dieser Zytokine in der Listerieninfektion beteiligt zu sein (Torres *et al.*, 2004;Seki *et al.*, 2002). So zeigten weitere *in vivo*-Studien, dass eine TLR2-Defizienz durch andere Signalwege, wie die MyD88-abhängige Signaltransduktion des IL-1- und IL-18-Rezeptors, kompensiert werden kann (Gekara *et al.*, 2009;Edelson and Unanue, 2002).

Auch die intrazellulären Rezeptoren NOD1 und NOD2 tragen zur angeborenen Immunantwort in der Listerieninfektion bei. Aufgrund einer reduzierten Expression von antimikrobiellen Peptiden in den intestinalen Paneth Zellen sind Nod2 Knock-Out Mäuse anfälliger für eine intragastrale *L. monocytogenes*-Infektion als Wildtyp Mäuse (Kobayashi *et al.*, 2005). NOD1 vermittelt die Produktion der inflammatorischen Mediatoren IL-6 in Mausmakrophagen, CXCL1 in murinen Mesothelzellen und IL-8 in HUVEC nach Infektion mit *L. monocytogenes* (Mosa *et al.*, 2009;Opitz *et al.*, 2006). Des Weiteren sind Nod1 Knock-Out oder RIP2 Knock-Out Mäuse anfälliger gegen eine Listerieninfektion als Wildtyp Mäuse (Mosa *et al.*, 2009;Park *et al.*, 2007;Chin *et al.*, 2002). Makrophagen von RIP2 Knock-Out Mäusen zeigen eine reduzierte TNF- α -Sekretion und NF- κ B-Aktivierung nach Infektion mit *L. monocytogenes* im Vergleich zu Wildtyp Makrophagen (Park *et al.*, 2007;Chin *et al.*, 2002).

Insgesamt scheint es sich bei der TLR- und NOD1/NOD2-vermittelten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen um zum Teil redundante und synergistische Mechanismen zu handeln, die möglicherweise zeitlich differentiell wichtige Funktionen übernehmen. Diese Hypothese unterstützend wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung von NF- κ B und MAPK, die Produktion von IL-6 und TNF- α sowie die Bakterienlast in der murinen Listerieninfektion nach Toleranzentwicklung durch TLR-Liganden abhängig ist von NOD1/NOD2 und RIP2 (Kim *et al.*, 2008).

Darüber hinaus spielt Caspase-1 eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort auf *L. monocytogenes*. Die Infektion von murinen Makrophagen mit L. monocytogenes führt in Abhängigkeit von Caspase-1 zu einem nekrotischen Zelltod, welcher einen Mechanismus zur Bakterieneliminerung darstellt. Zudem ist Caspase-1 für die Sekretion von IL-1 β und IL-18 notwendig, welche durch Bindung an ihre Rezeptoren weitere Signalwege aktivieren und Effektorzellen an den Infektionsort rekrutieren (Cervantes et al., 2008). Demgemäß sind IL-1R Knock-Out Mäuse verstärkt empfänglich für eine Listerieninfektion (Labow et al., 1997). Die Bildung von IFN- γ ist abhängig von IL-18 und damit indirekt von Caspase-1. Dies erklärt zumindest teilweise die verstärkte Anfälligkeit von Caspase-1 Knock-Out Mäusen gegen eine Listerieninfektion (Tsuji et al., 2004). Bisher wurden Nlrp3 und NIrc4 als signalgebend für die Aktivierung von Caspase-1 durch L. monocytogenes in Mausmakrophagen beschrieben (Warren et al., 2008; Mariathasan et al., 2006), wohingegen eine andere Arbeitsgruppe diese Ergebnisse nicht bestätigen konnte (Kanneganti et al., 2007; Franchi et al., 2007a). Zusammenfassend ergeben sich eindeutige Hinweise auf eine wichtige Bedeutung der Caspase-1-Inflammasome für die angeborene Immunantwort in der *L. monocytogenes*-Infektion.

3 Aufgabenstellung

Listeria monocytogenes ist ein Gram-positives, intrazelluläres Bakterium, welches Sepsis und Meningitis bei Neugeborenen und immungeschwächten Menschen auslösen kann. L. monocytogenes invadiert phagozytierende sowie nichtphagozytierende Wirtszellen und stellt einen hervorragend etablierten Modellorganismus zur Untersuchung der Immunantwort auf intrazelluläre Erreger dar. Die Verfügbarkeit definierter listerieller Deletionsmutanten und gereinigter Pathogenitätsfaktoren ist hierbei äußerst hilfreich.

Das angeborene Immunsystem erkennt eindringende Pathogene, dient der initialen Infektionsabwehr und steuert die erworbene Immunantwort. Die Pathogenerkennung erfolgt hierbei durch keimbahnkodierte Rezeptoren, wie z. B. die transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die zytosolischen Nod-like-Rezeptoren (NLRs). Diese induzieren nach Detektion von konservierten mikrobiellen Molekülstrukturen Signalwege zur Produktion inflammatorischer Mediatoren. Einige NLRs bilden Caspase-1-aktivierende Multiproteinkomplexe, welche als Inflammasome bezeichnet werden. Die meisten Studien zur Charakterisierung der NLRs fanden in Mauszellen oder Mausmodellen statt. Im Gegensatz zu den 22 NLR-Proteinen im Menschen besitzt die Maus allerdings mindestens 34 NLR-kodierende Gene. So entscheiden verschiedene Allele von Naip5 bzw. Nalp1b über die Anfällligkeit von Mäusen gegenüber einer L. pneumophila-Infektion bzw. dem Bacillus anthracis Lethal Toxin. Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin, dessen Produktion dreistufig reguliert wird: (I) Eine Rezeptor-induzierte Signalkaskade führt zur Aktivierung von NF- κ B und zur Expression der inaktiven Proteinproform pro-IL-1 β . (II) Die Prozessierung in das reife Zytokin IL-1β erfolgt durch Caspase-1 und wird durch ein Inflammasom vermittelt. (III) Das reife Zytokin wird aus der Zelle geschleust.

Es ist bisher beschrieben, dass die Infektion von Mausmakrophagen mit *L. monocytogenes* zur Aktivierung von Caspase-1 durch mindestens ein Inflammasom und damit zur Produktion von IL-1β führt. Die Ergebnisse zur Charakterisierung der beteiligten Inflammasome sind jedoch widersprüchlich und die zu Grunde liegenden Mechanismen sind unzureichend erforscht. Untersuchungen zur Inflammasom-Aktivierung durch *L. monocytogenes* in humanen Zellen wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Das Promotionsprojekt hatte zum Ziel, vornehmlich

24

in humanen Monozyten die Bedeutung von ausgewählten NLRs für die Regulation der IL-1β-Produktion nach Infektion mit *L. monocytogenes* zu untersuchen.

Basierend auf diesen Daten wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Aufgabenstellungen bearbeitet:

- 1. Aufklärung der Bedeutung listerieller Virulenzfaktoren für die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen Monozyten
- 2. Charakterisierung des Inflammasoms, welches die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen Monozyten vermittelt
- 3. Nähere Untersuchung des vorliegenden Signalwegs zur Produktion von IL-1 β in Listerien-infizierten humanen Monozyten

4 Material und Methoden

4.1 Material

In Laboratorien standardmäßig verwendete Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, usw. werden hier nicht extra aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen analytischem Reinheitsgrad.

4.1.1 Zellkultur

Für den Einsatz in der Zellkultur wurde das FCS für 30 min bei 56°C zur Inaktivierung von Komplementfaktoren erhitzt.

Tabelle 4-1: Zellen

Zellen	Merkmale	Bezugsquelle	
THP-1	humane Monozytenzelllinie	DSMZ	
PBMCs	humane primäre periphere Blutmonozyten		
	isoliert aus Buffy Coats	DRK	
BMMs	murine Knochenmarksmakrophagen	Charles River, J. Tschopp	

Tabelle 4-2: Medien für die Zellkultur

Medien für Zellkultur	Zusammensetzung	Hersteller
Kultivierungsmedium (THP-1, PBMCs)	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
	10% FCS	Gibco [®]
Kultivierungsmedium (BMMs)	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
	10% FCS	Gibco [®]
	15% L929 Zellüberstand	
Infektionsmedium	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
Wachstumsmedium (BMMs)	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
	20% FCS	Gibco [®]
	30% L929 Zellüberstand	
	1% Penicillin-Streptomycin	Gibco [®]
Einfriermedium (THP-1)	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
	10% FCS	Gibco [®]
	10% DMSO	Sigma [®]
EDTA-Waschpuffer (PBMCs)	500 ml RPMI 1640	Gibco [®]
	5% FCS	Gibco [®]
	0,2 mM EDTA	Roth

Materialien für Zellkultur	Hersteller
Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA
Pancoll human	PAN™ Biotech GmbH
Gentamicin	Gibco [®]
Zellkulturflaschen, Zellkulturplatten	BD Falcon™

Tabelle 4-3: Materialien für die Zellkultur

4.1.2 Stimulantien

Aufgereinigtes Listeriolysin O (LLO) aus LLO-überexprimierenden *Listeria innocua* (Darji *et al.*, 1995) wurde von Prof. T. Chakraborty zur Verfügung gestellt und in Aliquots bei -80°C gelagert. Hochreines LPS von *Salmonella minnesota* R595 wurde von Alexis Biochemicals bezogen.

4.1.3 Chemische Inhibitoren

Tabelle 4-4: Chemische Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Bafilomycin A1	Calbiochem®
CA-074 Me	Calbiochem [®]
KCI, NaCI	Merck
Z-YVAD-FMK	Alexis [®] Biochemicals

4.1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Die verwendeten small interfering RNAs (siRNAs) wurden von Ambion[®] bezogen oder von MWG Biotech synthetisiert.

Tabelle 4-5: Materialien für RNAi

Materialien für RNAi	Hersteller
Cell Line Nucleofector [™] Kit V	Amaxa
Human Monocyte Nucleofector [™] Kit	Amaxa

SIRNA		Sequenz
ASC	sense	5'-GAUGCGGAAGCUCUUCAGUtt
	antisense	5'-ACUGAAGAGCUUCCGCAUCtt
Caspase-1	sense	5'-GGUUCGAUUUUCAUUUGAGtt
	antisense	5'-CUCAAAUGAAAAUCGAACCtt
control	sense	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt
	antisense	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAtt
NOD2	sense	5'-GGAAUUACCAGUCCCAUUGtt
	antisense	5'-CAAUGGGACUGGUAAUUCCtg
NLRC4	sense	5'-GGUUCAAGCCAAAGUAUAAtt
	antisense	5'-UUAUACUUUGGCUUGAACCtt
NLRP1	sense	5'-CGGUGACCGUUGAGAUUGAtt
	antisense	5'-UCAAUCUCAACGGUCACCGct
NLRP3	sense	5'-GGUGUUGGAAUUAGACAACtt
	antisense	5'-GUUGUCUAAUUCCAACACCtg
NLRP6	sense	5'-CGUCAGUGUACCUGCUUUUtt
	antisense	5'-AAAAGCAGGUACACUGACGtg
NLRP12a	sense	5'-GGAAAUGCACUGGAGGAUUtt
	antisense	5'-AAUCCUCCAGUGCAUUUCCtg
NLRP12b	sense	5'-GCAUAAUGAUCAGCCUCCUtt
	antisense	5'-AGGAGGCUGAUCAUUAUGCtg
AIM2a	sense	5'-GCAACGUGCUGCACCAAAAtt
	antisense	5'-UUUUGGUGCAGCACGUUGCtt
AIM2b	sense	5'-GGAGAUAAGGUUCGACUUAtt
	antisense	5'-UAAGUCGAACCUUAUCUCCtt

Tabelle 4-6: siRNA-Sequenzen

4.1.5 Konfokalmikroskopie

Tabelle 4-7: Primäre Antikörper für Konfokalmikroskopie

Primäre Antikörper	Spezies	Hersteller
Cathepsin B	Maus	abcam®

Tabelle 4-8: Sekundäre Antikörper für Konfokalmikroskopie

Sekundäre Antikörper	Spezies	Hersteller
anti-Maus-IgG	Ziege, gekoppelt an AF 546	Invitrogen™

Konfokalmikroskopie	Zusammensetzung	Hersteller
Verdünnungsmedium	20 ml Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA
	0.2 g BSA	Sigma [®]
	1 Tropfen Tween 20	Sigma [®]
3% PFA (pH 7.0)	3 g PFA	Sigma [®]
	100 ml Aqua bidest.	
1% Triton	4 ml Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	PAA
	40 μl Triton X-100	Sigma [®]
5% Ziegenserum	4 ml Verdünnungsmedium	
	200 µl Ziegenserum	Invitrogen™
Phalloidin AF 488		Invitrogen™
Fluoromount-G™		Beckman Coulter

Tabelle 4-9: Reagenzien für Konfokalmikroskopie

4.1.6 Bakterienkultur

Die Bakterienstämme wurden in Kryostocks bei -80°C gelagert. Medien und Agar wurden für 15 min bei 121°C autoklaviert.

Tabelle 4-10: Bakterienstämme

Bakterienstamm	Merkmale	Bezugsquelle
EGD	L. monocytogenes Wildtyp	
	Serotyp 1/2a EGD	ATCC, #BAA-679
EGD ∆hly	L. monocytogenes LLO ⁻	T. Chakraborty
EGD ∆ <i>plcAplcB</i>	L. monocytogenes PIcA/B ⁻	T. Chakraborty
EGD hly W492A	L. monocytogenes hly W492A	T. Chakraborty
INN	<i>L. innocua</i> Wildtyp	
	Serotyp 6b	ATCC, #33091

Medien für Bakterienkultur	Zusammensetzung	Hersteller
BHI Medium	37 g Brain Heart Infusion	BD Becton Dickinson
	ad 1 l Aqua bidest.	
BHI Agar	37 g Brain Heart Infusion	BD Becton Dickinson
	20 g Agar	BD Becton Dickinson
	ad 1 I Aqua bidest.	
Einfriermedium	50% BHI Medium	BD Becton Dickinson
	50% Glycerol	Sigma [®]

Tabelle 4-11: Medien für die Bakterienkultur

4.1.7 Reverse Transkription

Tabelle 4-12: Materialien für Reverse Transkription

Reverse Transkription	Hersteller
QIAshredder TM	QIAGEN
RNeasy [®] Mini Kit	QIAGEN
dNTPs	Promega
Random Primers	Promega
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen™
Recombinant RNasin [®] Ribonuclease Inhibitor	Promega
High Capacity Reverse Transcriptase Kit	Applied Biosystems

4.1.8 Semi-quantitative PCR

Tabelle 4-13: Materialien für semi-quantitative PCR

semi-quantitative PCR	Hersteller
dNTPs	Promega
REDTaq [®] DNA Polymerase Kit	Sigma [®]
Primer (vorwärts, rückwärts)	TIB MOLBIOL
PCR Tubes 0.5 ml thin walled	Eppendorf

	Tabelle 4-	-14: Prim	er für sem	i-quantitative	PCR
--	------------	-----------	------------	----------------	-----

Primer		Sequenz Hybridisier	ungstemperatur
AIM2	vorwärts	5'-gCAgTgATgAAgACCATTCgTA	54°C
	rückwärts	5'-gCTgAgTTTgAAgCgTgTTgAT	
ASC	vorwärts	5'-ATgCgCTggAgAACCTgA	62°C
	rückwärts	5'-AggTAggACTgggACTCCCTTA	
Caspase-1	vorwärts	5'-TggggTACAgCgTAgATgTgA	58°C
	rückwärts	5'- CgAACCTTgCggAAAATTTC	
GAPDH	vorwärts	5'-CCACCCATggCAAATTCC ATggCA	60°C
	rückwärts	5'-TCTAgACggCAggCAggTCAggTCCACC	
IL-1β	vorwärts	5'- TCCGACCACCACTACAGCAA	60°C
	rückwärts	5'- ATCTTTCAACACGCAGGACA	
IL-8	vorwärts	5'-CTAggACAAgAgCCAggAAgA	60°C
	rückwärts	5'-AACCCTCTCTgCACCCAg TTTTC	
NAIP	vorwärts	5'-AgCCTAATCCTCTTTggTgCC	62°C
	rückwärts	5'-TgCACCTCCCACAgCTgATT	
NOD2	vorwärts	5'- AGCCATTGTCAGGAGGCTC	63°C
	rückwärts	5'- CGTCTCTGCTCCATCATAGG	
NLRC3	vorwärts	5'-TCACCTgCAgTggAACTTCAT	56°C
	rückwärts	5'-TCACATTTCAACAgTgCACg	
NLRC4	vorwärts	5'-TCTgACTgACAgCTTgggTAA	62°C
	rückwärts	5'-TgggACCTCCTCCAAATgTT	
NLRC5	vorwärts	5'-TgggAAgACACTCAggCTAA	63°C
	rückwärts	5'-ATCATCgTCCTCACAgAggTT	
NLRP1	vorwärts	5'-CgAgAACAgCTggTCTTCTCCAgggCTTCg	65°C
	rückwärts	5'-TCCCCCTTgggAgTCCTCCTgAAAATgATC	
NLRP2	vorwärts	5'-CAgCTCAgCCAggATgAgTT	65°C
	rückwärts	5'-AgCACCACCgTgTATgAgAA	
NLRP3	vorwärts	5'-AgCCACgCTAATgATCgACT	60°C
	rückwärts	5'-CAggCTCAgAATgCTCATCA	
NLRP6	vorwärts	5'-TgCTgTACTgCCTgTACgAgA	65°C
	rückwärts	5'-TgTACCCTgACCgTCTgCA	
NLRP8	vorwärts	5'-AgCATgTggCACAggAAAT	62°C
	rückwärts	5'-ATATTgACACCgCTTCAggCAA	
NLRP12	vorwärts	5'-CATgATgCTgCTTTgCgA	62°C
	rückwärts	5'-TCCATCCCAAATAACCAgAgg	

DNA-Gelelektrophorese	Zusammensetzung	Hersteller
TAE Puffer (pH 8.0)	4.84 g Tris Base	Sigma®
	1.14 ml Essigsäure (100%ig)	Merck
	2 ml EDTA (0,5 M)	Roth
	ad 1 I Aqua bidest.	
Gel 2%ig	TAE Puffer	
	2% Agarose	Promega
	0.04 µl/ml Ethidiumbromid	Invitrogen™
100 bp DNA Step Ladder		Promega

Tabelle 4-15: Materialien für DNA-Gelelektrophorese

4.1.9 Quantitative PCR

Tabelle 4-16: Materialien für Quantitative PCR

Quantitative PCR	Hersteller
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan [®] Gene Expression Assay-on-Demand	Applied Biosystems
MicroAmp [™] Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
MicroAmp [™] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems

4.1.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tabelle 4-17: Materialien für ELISA

ELISA	Hersteller
BD OptEIA™ Human IL-1β ELISA Set II	BD Biosciences
BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set	BD Biosciences
BD OptEIA™ TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences
Nunc-Immuno™ Plates F96 MaxiSorp	Nunc™
Mouse IL-1 β ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience™

4.1.11 Western Blot

Tabelle 4-18: Materialien für Western Blot

Western Blot	Hersteller
Kaleidoscope™ Protein Standard	Bio-Rad
Nitrocellulose Hybond-ECL Membran	Amersham
Whatman [®] Filter Papier	Whatman International Ltd.
Microcon Ultracel YM-3 Centrifugal Filter Devices	Millipore
00	

Western Blot	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphoprotein-	5 ml Natriumorthovanadat (200 mM)	Sigma [®]
waschpuffer	50 ml Natriumpyrophosphat (150 mM)	Sigma [®]
	50 ml Natriumfluorid (1 M)	Sigma [®]
	ad 500 ml Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
Lyse-Puffer	100 μl Tris-HCl (50 mM, pH 7,4)	Sigma [®]
	1 μl EDTA (250 mM)	Roth
	50 µl Nonidet™ P-40	Sigma [®]
	10 µl PMSF (1 mM)	Sigma [®]
	je 5 μl Antipain, Leupeptin, Pepstatin (10 μg/ml)	Sigma [®]
	833 µl Phosphoproteinwaschpuffer	
Bradford Reagenz	20% Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
	80% Aqua bidest.	
Laemmli-Puffer (4x)	1 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 6.8)	Sigma [®]
	800 μl Glycerol	Sigma [®]
	16 ml SDS (10% w/v)	Serva
	400 μl Bromphenolblau (1% w/v)	Sigma [®]
	400 μl β-Mercaptoethanol	Sigma [®]
	ad 5 ml Aqua bidest.	
Laufpuffer	3 g Tris-Base	Sigma [®]
	14,4 g Glycin	Merck
	1 g SDS	Serva
	ad 1 I Aqua bidest.	
Blotpuffer	3 g Tris-Base	Sigma [®]
	14,4 g Glycin	Merck
	200 ml Methanol	Merck
	ad 1 I Aqua bidest.	
Blockpuffer	50% Odyssey Blocking Buffer	LI-COR [®]
	50% Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
Ponceau S	1 g Ponceau S	Sigma [®]
	50 ml Essigsäure (100%ig)	Merck
	ad 1 I Aqua bidest.	
Waschpuffer	5 I Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
	5 ml Tween 20	Sigma [®]

Tabelle 4-19: Reagenzien für Western Blot

Western Blot	Zusammensetzung	Hersteller
Sammelgel	2.5 ml Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)	Sigma [®]
	100 μl SDS (10% w/v)	Serva
	1.33 ml Bis-Acrylamid (40% w/v)	Serva
	10 μl TEMED	R&D Systems [®]
	40 μl Ammoniumpersulfat (10% w/ν)	Serva
	ad 10 ml Aqua bidest.	
Trenngel 16%ig	2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	Sigma®
	100 μI SDS (10% w/ν)	Serva
	4 ml Bis-Acrylamid (40% w/v)	Serva
	5 μl TEMED	R&D Systems [®]
	50 μl Ammoniumpersulfat (10% w/v)	Serva
	ad 10 ml Aqua bidest.	
Trenngel 13%ig	2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)	Sigma [®]
	100 μI SDS (10% w/ν)	Serva
	3,25 ml Bis-Acrylamid (40% w/v)	Serva
	5 µl TEMED	R&D Systems [®]
	50 μl Ammoniumpersulfat (10% w/ν)	Serva
	ad 10 ml Aqua bidest.	

Tabelle 4-20: Primäre Antikörper für Western Blot

Primäre Antikörper	kDa	Spezies	Hersteller
Aktin	60	Ziege	Santa Cruz
IL-1β	31, 17	Kaninchen	Cell Signaling
Caspase-1	50, 30-45, 20	Kaninchen	Cell Signaling

Tabelle 4-21: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Sekundäre Antikörper	Spezies	Hersteller
anti-Kaninchen-IgG	Ziege, gekoppelt an Cy5.5	LI-COR [®]
anti-Ziege-IgG	Esel, gekoppelt an IRDye800	LI-COR [®]
4.1.12 Geräte

In Laboratorien standardmäßig eingesetzte Geräte wie Reinraumwerkbänke, Inkubatoren, Zentrifugen, usw. werden hier nicht extra aufgeführt.

Produkt	Verwendungszweck	Hersteller
Mini-PROTEAN		
Tetra Electrophoresis System	SDS-Page	Bio-Rad
Mini Trans-Blot Cell	Western Blot	Bio-Rad
Odyssey [®] Infrared		
Imaging System	Western Blot	LI-COR [®]
Sub-Cell System	DNA-Gelelektrophorese	Bio-Rad
CAMEDIA C-4040 200M		
Digitalkamera	DNA-Gelelektrophorese	Olympus
FFX-20M GIBCO BRL		
UV-Transluminator mit UV-Filter	DNA-Gelelektrophorese	Life Technologies [™]
MR5000 Plattenlesegerät	ELISA	Dynatech
Nucleofector™	siRNA Transfektion	Amaxa
Mastercycler [®] gradient	semi-quantitative PCR	eppendorf
7300 Real Time PCR System	quantitative PCR	Applied Biosystems
BioPhotometer	Spektralphotometer	eppendorf
LSM5 Pascal	Konfokalmikroskop	Zeiss

4.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Arbeiten bei Raumtemperatur in Laborräumen der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

4.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter einer Reinraumwerkbank mit sterilen Materialien und Geräten. 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 von THP-1 Zellen

Die monozytären THP-1 wurden in Suspension bis zu einer Dichte von etwa 2 x 10⁶ Zellen/ml in T125 Zellkulturflaschen mit 30 ml Zellkulturmedium kultiviert. Danach wurde im Verhältnis 1:4 passagiert. Die Zellen wurden maximal bis zu Passage 30 für Experimente eingesetzt und hierzu in einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml ausgesät. Die Adhäsion der THP-1 erfolgte durch Zugabe von 100 ng/ml PMA für 16 h. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Kultivierungsmedium für zwei weitere Tage kultiviert.

4.2.1.2 Isolierung und Kultivierung von PBMCs

Die Isolierung der PBMCs erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats. Hierzu wurden 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Pancoll befüllt und mit 25 ml Blut/EDTA-Waschpuffer (1:1) überschichtet. Nach Zentrifugation (800 g, 25 min, 20°C, ohne Beschleunigung und Bremse) wurde der Zellring der PBMCs mit einer Pasteurpipette geerntet und in 50 ml EDTA-Waschpuffer gewaschen (300 g, 10 min, 20°C). Es folgte ein weiterer Waschschritt in 25 ml EDTA-Waschpuffer (200 g, 5 min, 20°C). Anschließend wurden die Zellen in 10 ml EDTA-Waschpuffer aufgenommen und damit 10 ml Pancoll verdünnt mit 1.4 ml PBS überschichtet. Nach Zentrifugation (800 g, 25 min, 20°C, ohne Beschleunigung und Bremse) wurde der Zellring der PBMCs mit einer Pasteurpipette geerntet und in 25 ml EDTA-Waschpuffer gewaschen (200 g, 10 min, 20°C). Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für Experimente wurden die isolierten PBMCs in einer Zellzahl von 5 x 10⁶ Zellen/ml ausgesät.

4.2.1.3 Isolierung und Kultivierung von BMMs

Murine BMMs wurden von Frau Florence Pache aus dem Knochenmark von Wildtyp oder NIrp3-Knock-Out Mäusen isoliert und in Kryoröhrchen zu 1 x 10^7 Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. 5 x 10^6 murine BMMs wurden nach dem Auftauen in 10 ml Wachstumsmedium in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Nach 4 Tagen wurden 10 ml Kultivierungsmedium zugefüttert. Für Experimente wurden die BMMs nach insgesamt 7-8 Tagen Anzucht in einer Zellzahl von 4 x 10^5 Zellen/ml ausgesät.

4.2.1.4 RNA-Interferenz (RNAi)

Die transiente Transfektion von THP-1 und PBMCs mit siRNA erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung des NucleofectorTM. Hierbei wurde nach Herstelleranleitung verfahren. Für die Transfektion von THP-1 wurde das Programm T-08 verwendet und der Cell Line NucleofectorTM Kit V mit 2 μ g siRNA pro 1 x 10⁶ Zellen eingesetzt. Für die Transfektion von PBMCs wurde das Programm Y-01 verwendet und der Human Monocyte NucleofectorTM Kit mit 5 μ g siRNA pro 1 x 10⁷ Zellen eingesetzt. Die Verwendung der Zellen erfolgte 72 h nach Transfektion.

4.2.1.5 Konfokalmikroskopie

Murine BMMs wurden auf Glasplättchen in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag mit *L. monocytogenes* infiziert. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 3%igem PFA für 20 min fixiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS für je 5 min. Anschließend wurden die Zellen mit 1%igem Triton für 15 min permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, 30 min mit 5%igem Ziegenserum geblockt und mit einem spezifischen primären Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei 5-minütige Waschschritte mit PBS und die Zellen wurden mit einem sekundären AF546-markierten Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit Phalloidin AF488 für 30 min angefärbt. Es folgten drei abschließende Waschschritte mit PBS für je 5 min. Die Präparate wurden auf Objektträger mit dem Eindeckelmedium Fluoromount-G[™] überführt, 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".

4.2.2 Mikrobiologische Methoden

4.2.2.1 Bakterienkultur

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter einer Reinraumwerkbank mit sterilen Materialien und Geräten. Mit Bakterien in Kontakt getretene Geräte und Materialien wurden anschließend desinfiziert bzw. autoklaviert. Infizierte Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% inkubiert.

4.2.2.2 Anzucht von Listerien

In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml BHI mit Listerien aus dem Kryostock angeimpft und über Nacht bei 150 rpm und 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 20 ml BHI in einem Erlenmeyerkolben mit 1 ml Übernachtkultur angeimpft und die Kultur 3-4 h bis zu einer OD_{600} zwischen 0.8 und 1.0 (exponentielle Wachstumsphase) bei 200 rmp und 37°C geschüttelt. Eine OD_{600} von 0.8 entspricht etwa 8 x 10⁸ Listerien/ml und eine OD_{600} von 1.0 entspricht etwa 1 x 10⁹ Listerien/ml. Die Bakterienkultur wurde für 5 min bei 4000 rpm und 37°C abzentrifugiert, das Bakterienpellet mit PBS gewaschen (5 min, 4000 rpm, 37°C) und in Infektionsmedium aufgenommen.

4.2.2.3 Infektion von ausdifferenzierten THP-1 mit Listerien

Adhärierte THP-1 wurden in einer MOI von 1 mit Listerien infiziert. Die Bakterien wurden in Infektionsmedium auf die entsprechende Bakterienzahl verdünnt und das Zellmedium durch die Bakteriensuspension ersetzt. Nach 1 h Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Wechsel auf Infektionsmedium mit 50 µg/ml Gentamicin für die Dauer von 1 h. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Infektionsmedium bis Versuchsende im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.4 Infektion von PBMCs mit Listerien

PBMCs wurden in einer MOI von 0.001 oder 0.01 mit Listerien infiziert. Für einige Experimente wurden die PBMCs für 1 h mit einem Inhibitor vorinkubiert und dieser für die gesamte Infektionsdauer auf den Zellen belassen. Da PBMCs Suspensionzellen sind, wurden die Bakterien in Infektionsmedium auf eine Konzentration von 1 x 10⁵ Listerien/mI eingestellt und eine entsprechende Menge der Bakteriensuspension zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen bis Versuchsende im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.5 Infektion von BMMs mit Listerien

BMMs wurden in einer MOI von 0.001 mit Listerien infiziert. Für einige Experimente wurden die BMMs für 1 h mit einem Inhibitor vorinkubiert und dieser für die gesamte Infektionsdauer auf den Zellen belassen. Die Bakterien wurden in Infektionsmedium auf die entsprechende Bakterienzahl verdünnt und das Zellmedium durch die Bakteriensuspension ersetzt. Anschließend wurden die Zellen bis Versuchsende im Brutschrank inkubiert.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 RNA-Isolierung

Gesamt-RNA aus Zellen wurde nach Protokoll des Herstellers mit QIAshredder und RNeasy Mini Kit isoliert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte mit einer Quarzküvette in dem BioPhotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und wurde bei einer 1:100 Verdünnung nach folgender Formel berechnet: $OD_{260} \times 4 = RNA$ [µg/µl]. Die Verunreinigung der RNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD_{260} (Absorptionsmaximum RNA) zu OD_{280} (Absorptionsmaximum Proteine) bestimmt werde, wobei der Quotient bei reiner RNA zwischen 1,7 und 1,9 liegt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.2.3.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription von RNA zu cDNA erfolgte bei späterer Verwendung der cDNA für semi-quantitative PCR mit M-MLV RT nach Herstellerprotokoll. Bei Einsatz der cDNA für quantitative PCR wurde der High Capacity Reverse Transcription Kit nach Anleitung des Herstellers verwendet. Am Ende der Reversen Transkription wurde das Ansatzvolumen mit Nuklease-freiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.3.3 Semi-quantitative PCR

Für die semi-quantitative PCR im Eppendorf Mastercycler[®] gradient setzte sich jede Probe wie folgt zusammen:

Reagenz	Menge
cDNA	5 µl
REDTaq [®] Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
vorwärts-Primer (0,5 µg/µl)	0,25 µl
rückwärts-Primer (0,5 µg/µl)	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	15,5 µl
REDTaq [®] DNA Polymerase	1 µl

Die PCR verlief 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. Zur Kontrolle der cDNA Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen wurde eine PCR mit den Primern für Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Dieses Gen wird in eukaryonten Zellen konstant exprimiert.

Die DNA-Gelelektrophorese wurde mit einem 2%igen Gel durchgeführt und die DNA bei 120 V für 30 min aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit der CAMEDIA C-4040 200M Digitalkamera mit vorgeschaltetem UV-Filter unter UV-Licht auf dem FFX-20M GIBCO BRL UV-Transluminator.

4.2.3.4 Quantitative PCR

Für die quantitative PCR wurde das 7300 Real Time PCR System genutzt. TaqMan[®] Gene Expression Assays für NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NOD2, NLRC4, AIM2 und GAPDH wurden verwendet um die cDNA zu amplifizieren. Die mRNA-Expression jedes Gens wurde an die mRNA-Expression von GAPDH angeglichen. Jede Probe setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reagenz	Menge
cDNA	5 µl
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix (2x)	10 µl
TaqMan [®] Gene Expression Assays-on-Demand (20 μM)	0,5 µl
Nuklease-freies Wasser	4 µl

Die quantitative PCR verlief unter den folgenden Bedingungen: 50° C 2 min, 95° C 10 min, 40 x (95° C 15 s, 60° C 1 min). Zur Auswertung wurde die 7300 System Sequence Detection Software Version 1.4 verwendet.

4.2.4 Biochemische Methoden

4.2.4.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Konzentrationen von IL-1β, IL-8 oder mIL-1β in Zellüberständen wurden das BD OptEIA[™] Human IL-1β ELISA Set II, das BD OptEIA[™] Human IL-8 ELISA Set bzw. der Mouse IL-1β ELISA Ready-SET-Go! verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Zellüberstände wurden vor Verwendung für 10 min bei 1000 rpm abzentrifugiert und zum Teil in Assay Diluent für die Messung verdünnt. Die Auswertung erfolgte an dem MR5000 Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

4.2.4.2 Western Blot

Adhärente THP-1 Zellen wurden mit Phosphoproteinwaschpuffer gewaschen und mit Lysepuffer lysiert. PBMCs wurden für den Waschschritt und die Lyse jeweils für 10 min bei 1000 rpm pelletiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Konzentration des im Überstand enthaltenen Gesamtproteins wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay durch Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm in dem BioPhotometer nach Bradford quantifiziert. Zur Detektion von IL-1 β in

Zellüberständen wurden 100 µl Zellüberstand in einem Microcon Ultracel YM-3 Centrifugal Device für 30 min bei 12000 rpm auf etwa 20 µl aufkonzentriert. Eine definierte Menge Gesamtprotein oder 20 µl aufkonzentrierter Zellüberstand wurde für 5 min bei 95°C mit dem entsprechenden Anteil Laemmli-Puffer inkubiert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte mit einem 16% igem Gel in einem mit Laufpuffer befüllten Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System für etwa 1 h bei einer Spannung von 100 V. Nachfolgend wurde das Gel auf eine Hybond-Nitrozellulosemembran überführt und die Proteine gemäß Herstellerangaben in einer mit Blotpuffer befüllten Mini Trans-Blot Cell für 1 h bei 4°C und einer Spannung von 100 V geblottet. Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau S gefärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 2 h mit Blockpuffer inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit Waschpuffer von jeweils 10 min. Nachfolgend wurde die Membran für 1 h mit einem gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper inkubiert. Es folgten zwei Waschschritte mit Waschpuffer und ein abschließender Waschschritt mit PBS. Die am primären Antikörper gebundenen mit IRDye800 oder Cy5.5 markierten sekundären Antikörper wurden mit dem Odyssey[®] Infrared Imaging System detektiert. Zur Auswertung wurde die Odyssey[®] 3.0 Software verwendet.

4.2.5 Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Student's t-Tests oder der einfaktoriellen Varianzanalyse mit Newmann Keuls post-Test. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% (p < 0.05) als signifikant betrachtet und mit einem Stern markiert. Signifikanzen mit p < 0.01 wurden mit zwei Sternen markiert und Signifikanzen mit p < 0.001 mit drei Sternen. Zur Erstellung der Diagramme und für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism[®] verwendet.

Die Abbildungen von Western Blot, semi-quantitativer PCR und quantitativer PCR Analysen zeigen jeweils repräsentative Versuche von wenigstens drei unabhängig voneinander durchgeführten Wiederholungen mit gleichem Ergebnis.

42

Aus bereits publizierten Studien ist bekannt, dass die Infektion von murinen Knochenmarksmakrophagen mit *Listeria monocytogenes* zur Aktivierung von Caspase-1 durch mindestens ein Inflammasom und damit zur Produktion von IL-1 β führt. Die Ergebnisse zur Identifizierung der beteiligten Inflammasome in Mauszellen sind jedoch kontrovers und die zu Grunde liegenden Mechanismen sind ungeklärt (Warren *et al.*, 2008;Kanneganti *et al.*, 2007;Franchi *et al.*, 2007a;Mariathasan *et al.*, 2006;Ozoren *et al.*, 2006). Untersuchungen zur Inflammasom-Aktivierung durch *L. monocytogenes* in humanen Zellen wurden bislang noch nicht veröffentlicht. Aus diesem Grund wurde die Signaltransduktion zur Produktion von IL-1 β nach Infektion mit *L. monocytogenes* vornehmlich in humanen Monozyten näher charakterisiert.

5.1 Die *L. monocytogenes*-induzierte Produktion von IL-1 β in humanen Monozyten ist abhängig von LLO

Als erstes wurde geprüft, ob die Genexpression und Proteinsekretion von IL-1 β nach Infektion von humanen Monozyten mit *Listeria monocytogenes* von listeriellen Virulenzfaktoren abhängig war.

Hierzu wurden humane PBMCs mit Wildtyp *L. monocytogenes* EGD, verschiedenen *L. monocytogenes* EGD Mutanten oder *Listeria innocua* INN infiziert und die Produktion der Zytokine IL-1 β und IL-8 mit ELISA untersucht. Es wurden homolog rekombinante Mutanten von EGD mit entweder einer Phospholipasen-Deletion (EGD $\Delta plcAplcB$) oder einer Listeriolysin O-Deletion (EGD Δhly) verwendet. Außerdem wurde eine chromosomal kodierte Listeriolysin O-Punktmutante eingesetzt, deren LLO nicht porenbildend ist (EGD *hly* W492A).

Nach Infektion von humanen PBMCs (Abb. 5-1, A) oder THP-1 (Abb. 5-1, C) mit *L. monocytogenes* EGD Δhly zeigte sich eine statistisch signifikant (p < 0.001) geringere Produktion von IL-1 β als nach Infektion mit EGD. Die induzierte IL-8-Sekretion war für Wildtyp und Mutante vergleichbar (Abb. 5-1, B).



Abbildung 5-1: Vergleich der *L. monocytogenes* EGD- und *L. monocytogenes* EGD Δhly -induzierten IL-1 β -Produktion in humanen Monozyten

Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels spezifischer ELISA untersucht. Adhärierte THP-1 wurden mit EGD [MOI 1] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 1] infiziert. Nach 16 h wurden die zellfreien Überstände mit einem spezifischen ELISA auf die Produktion von IL-1 β untersucht (C). Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert. Die Infektion von humanen PBMCs mit *L. monocytogenes* EGD *hly* W492A resultierte in einer statistisch signifikant (p < 0.001) geringeren Ausschüttung von IL-1 β im Vergleich zu einer Infektion mit EGD (Abb. 5-2, A). Dahingegen war die Sekretion von IL-8 zwischen Wildtyp und Mutante äquivalent (Abb. 5-2, B).



Abbildung 5-2: Vergleich der *L. monocytogenes* EGD- und *L. monocytogenes* EGD *hly* W492A-induzierten IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD *hly* W492A (W492A) [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die avirulente *L. innocua* INN bewirkte in humanen PBMCs eine statistisch signifikant (p < 0.001) geringere IL-1 β -Produktion als *L. monocytogenes* EGD (Abb. 5-3, A). Im Gegensatz dazu gab es keinen Unterschied in der IL-8-Sekretion (Abb. 5-3, B).



Abbildung 5-3: Vergleich der *L. monocytogenes*- und *L. innocua*-induzierten IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder *L. innocua* INN [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

L. monocytogenes EGD und EGD $\Delta plcAplcB$ induzierten in humanen PBMCs die Freisetzung von IL-1 β (Abb. 5-4, A) und IL-8 (Abb. 5-4, B) in vergleichbaren Mengen.



Abbildung 5-4: Vergleich der *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* EGD $\Delta p / cA p /$

Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD $\Delta plcAplcB$ ($\Delta plcAplcB$) [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die Produktion von IL-1 β , nicht aber von IL-8, nach Infektion von humanen Monozyten mit *L. monocytogenes* scheint demnach abhängig vom Virulenzfaktor LLO zu sein. Zur näheren Untersuchung dieser Hypothese wurde die Proteinexpression von pro-IL-1 β sowie die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-8 nach Infektion von humanen PBMCs mit *L. monocytogenes* Wildtyp EGD oder der LLO-negativen Mutante EGD Δhly betrachtet.

Die Bildung von pro-IL-1 β (p31) und reifem IL-1 β (p17) in Zellextrakt und Zellüberstand wurde mittels Western Blot visualisiert. Im Zellextrakt fanden sich äquivalente Mengen pro-IL-1 β nach Infektion mit EGD oder EGD Δhly , jedoch wurde nach Infektion mit EGD Δhly nur eine sehr geringe Menge pro-IL-1 β prozessiert und als reifes IL-1 β in den Zellüberstand befördert. Das unreife pro-IL-1 β war weder nach Infektion mit EGD noch nach Infektion mit EGD Δhly im Zellüberstand detektierbar (Abb. 5-5, A). Auch die Untersuchung der mRNA-Expression in humanen PBMCs mittels semi-quantitativer PCR zeigte nach Infektion mit EGD oder EGD Δhly eine gleichwertige Induktion von IL-1 β sowie von IL-8 (Abb. 5-5, B).



Abbildung 5-5: Proteinexpression und mRNA-Expression von IL-1 β in Listerieninfizierten humanen PBMCs

(A) Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.01] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.01] für 16 h infiziert. Mittels eines spezifischen Antikörpers wurden mit Western Blot pro-IL-1 β (p31) und IL-1 β (p17) im Zellextrakt (CX) und in aufkonzentrierten Überständen (SN) detektiert. Als Beladungskontrolle für das aufgetragene Zellextrakt wurde ein spezifischer Antikörper gegen das konstant exprimierte Protein Aktin verwendet. (B) Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.01] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.01] für 8 h infiziert. Die mRNA-Expression von IL-1 β und IL-8 wurde durch semi-quantitative PCR mit spezifischen Primern untersucht. Als Kontrolle für den gleichmäßigen mRNA-Einsatz wurde das konstant exprimierte Gen GAPDH detektiert.

Zusammengefasst lässt sich aus diesen Ergebnissen schlussfolgern, dass in humanen Monozyten die Transkription und Translation von pro-IL-1 β unabhängig von listeriellen Virulenzfaktoren erfolgt, wohingegen die post-translationale Prozessierung von pro-IL-1 β zu IL-1 β von porenbildendem LLO abhängig ist.

5.2 Expression von Inflammasom-Komponenten in humanen Monozyten

Der Befund einer LLO-abhängigen IL-1β-Produktion in Listerien-infizierten humanen Monozyten deutete auf die Aktivierung eines Inflammasoms hin. Daher wurde als nächstes die Expression potentieller Inflammasom-Komponenten in humanen PBMCs und THP-1 untersucht.

Mit Hilfe von spezifischen Primern konnte durch semi-quantitative PCR die Expression von Caspase-1, ASC, NLRP1-3, NLRP6, NLRP8, NLRP12, NOD2, NLRC3-5, NAIP und AIM2 in humanen PBMCs nachgewiesen werden (Abb. 5-6). Durch die parallele Detektion der GAPDH wurde ein gleichmäßiger mRNA-Einsatz sichergestellt. Eine leichte Hochregulation der Genexpression nach Listerieninfektion konnte bei NLRP3 und AIM2 beobachtet werden, wohingegen eine leichte Herunterregulation bei ASC, NLRP6, NLRP12, NLRC4 und NAIP zu sehen war (Abb. 5-6). In THP-1 zeigte sich ein vergleichbares Expressionsprofil (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5-6: mRNA-Expression möglicher Inflammasom-Komponenten in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.01] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.01] für 8 h infiziert. Die mRNA-Expression von Caspase-1 (Casp1), ASC, verschiedenen NLRs und AIM2 wurde durch semi-quantitative PCR mit spezifischen Primern untersucht. Als Kontrolle für den gleichmässigen mRNA-Einsatz wurde das konstant exprimierte Gen GAPDH detektiert.

5.3 Caspase-1 reguliert die *L. monocytogenes*-induzierte IL-1β-Produktion in humanen Monozyten

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen Monozyten tatsächlich von Caspase-1 abhängig ist.

Humane PBMCs wurden zum Teil unter Einsatz des Caspase-1-Inhibitors Z-YVAD-FMK mit *L. monocytogenes* EGD oder EGD Δhly infiziert. Nachfolgend wurde die Freisetzung von IL-1 β und IL-8 mittels ELISA untersucht. Der Inhibitor hatte in der eingesetzten Konzentration von 10 μ M keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt). Durch den Caspase-1-Inhibitor wurde die Produktion von IL-1 β nach Infektion von humanen PBMCs mit EGD oder EGD Δhly jeweils statistisch signifikant (p < 0.001 bzw. p < 0.01) gehemmt (Abb. 5-7, A). Dahingegen hatte Z-YVAD-FMK keinen Einfluss auf die IL-8-Sekretion (Abb. 5-7, B).



Abbildung 5-7: IL-1 β -Produktion in Listerien-infizierten humanen PBMCs unter Inhibierung von Caspase-1

Humane PBMCs wurden zum Teil mit 10 μ M Caspase-1-Inhibitor Z-YVAD-FMK (ZYVAD) behandelt und mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.001] infiziert. Nach 16 h wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit zwei Sternen (p < 0.01) bzw. drei Sternen (p < 0.001) gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die Proteinexpression von pro-IL-1 β und IL-1 β in Zellextrakt und Zellüberstand wurde zusätzlich mittels Western Blot visualisiert. Hierbei zeigte sich, dass Z-YVAD-FMK keinen Einfluss auf die Listerien-induzierte Expression von pro-IL-1 β im Zellextrakt hatte, jedoch effizient die Prozessierung von pro-IL-1 β und die Sekretion von reifem IL-1 β hemmte (Abb. 5-8).



Abbildung 5-8: Expression von pro-IL-1 β und IL-1 β in Listerien-infizierten humanen PBMCs unter Inhibierung von Caspase-1

Humane PBMCs wurden zum Teil mit 10 μ M Caspase-1 Inhibitor Z-YVAD-FMK (ZYVAD) behandelt und mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.001] infiziert. Nach 16 h wurde durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers im Western Blot die Proteinexpression von pro-IL-1 β (p31) und IL-1 β (p17) im Zellextrakt (CX) und in aufkonzentrierten Überständen (SN) detektiert. Als Beladungskontrolle für das aufgetragene Zellextrakt wurde das konstant exprimierte Protein Aktin verwendet.

Des Weiteren wurden THP-1 mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder spezifischer Caspase-1-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurde der Knock-Down von Caspase-1 mit Western Blot überprüft oder die Zellen mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Die Produktion von IL-1 β und IL-8 wurde mit ELISA untersucht.

Im Vergleich zu der Kontroll-siRNA hemmte die Caspase-1-siRNA die Produktion von IL-1 β nach Infektion von THP-1 mit EGD statistisch signifikant (p < 0.001) (Abb. 5-9, A), wohingegen kein Einfluss auf die Produktion von IL-8 bestand (Abb. 5-9, B). Der Knock-Down von Caspase-1 durch die spezifische siRNA wurde mittels Western Blot kontrolliert (Abb. 5-9, C).



Abbildung 5-9: Einfluss der Expressionshemmung von Caspase-1 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen THP-1

THP-1 wurden mit unspezifischer Kontrolll-siRNA (ctrl) oder spezifischer Caspase-1-siRNA (Casp1) transfiziert. 72 h später wurden die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 1] infiziert. Die zellfreien Überstände wurden mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) untersucht. Der Knock-Down von Caspase-1 wurde 72 h nach Transfektion mit einem spezifischen Antikörper durch Western Blot überprüft, wobei eine gleichmäßige Proteinbeladung durch Detektion des konstant exprimierten Proteins Aktin sichergestellt wurde (C). Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse die essentielle Bedeutung von Caspase-1 in der *L. monocytogenes*-induzierten IL-1 β -Produktion in humanen

Monozyten. Interessanterweise wurde durch den Caspase-1-Inhibitor auch die geringe IL-1 β -Produktion durch *L. monocytogenes* EGD Δhly in humanen PBMCs gehemmt. Dieser Befund deutet an, dass in humanen PBMCs neben dem LLO-abhängigen, Caspase-1-abhängigen Mechanismus der pro-IL-1 β -Prozessierung möglicherweise noch ein LLO-unabhängiger, Caspase-1-abhängiger Mechanismus besteht.

5.4 ASC ist an der *L. monocytogenes*-induzierten IL-1β-Produktion in humanen Monozyten beteiligt

Um das oder die Caspase-1-aktivierenden Inflammasome in der *L. monocytogenes*induzierten IL-1β-Produktion in humanen Monozyten zu charakterisieren, wurde zunächst das häufig beteiligte Adaptermolekül ASC untersucht.

Hierzu wurden THP-1 mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder siRNA spezifisch gegen ASC transfiziert. Nach 72 h wurde der Knock-Down von ASC mit semiquantitativer PCR überprüft oder die Zellen mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Die Produktion von IL-1 β und IL-8 wurde mit ELISA untersucht.

Im Vergleich zu der Kontroll-siRNA wurde durch die ASC-siRNA die Produktion von IL-1 β nach Infektion von THP-1 mit EGD statistisch signifikant (p < 0.01) gehemmt (Abb. 5-10, A), wohingegen kein Einfluss auf die Produktion von IL-8 bestand (Abb. 5-10, B). Der Knock-Down von ASC durch die spezifische siRNA wurde mit semiquantitativer PCR kontrolliert (Abb. 5-10, C).



Abbildung 5-10: Einfluss der Expressionshemmung von ASC auf die Listerieninduzierte IL-1 β -Produktion in humanen THP-1

THP-1 wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer ASC-siRNA (ASC) transfiziert. 72 h später wurden die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 1] infiziert. Die zellfreien Überstände wurden mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) untersucht. Der Knock-Down von ASC wurde nach 72 h mit spezifischen Primern durch semi-quantitative PCR überprüft, wobei der gleichmäßige mRNA-Einsatz durch die Detektion des konstant exprimierten Gens GAPDH sichergestellt wurde (C). Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.01) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Dieses Ergebnis weist auf die Bildung von mindestens einem ASC-abhängigen Inflammasom nach Infektion von humanen Monozyten mit *L. monocytogenes* hin.

5.5 NLRP3 vermittelt die *L. monocytogenes*-induzierte IL-1β-Produktion in humanen Monozyten

Beschriebene oder potentielle Kandidaten für die Bildung eines Inflammasoms sind NLRP1 (Martinon *et al.*, 2002), NLRP3 (Agostini *et al.*, 2004), NLRP6 (Grenier *et al.*, 2002), NLRP12 (Wang *et al.*, 2002), NLRC4 (Mariathasan *et al.*, 2006;Miao *et al.*, 2006), AIM2 (Burckstummer *et al.*, 2009;Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009;Hornung *et al.*, 2009) und NOD2 (Hsu *et al.*, 2008;Ferwerda *et al.*, 2008). Zusätzlich wurde mehrfach eine positive Regulation der pro-IL-1 β Expression durch NOD2 gezeigt (Marina-Garcia *et al.*, 2008;Ferwerda *et al.*, 2008;Pan *et al.*, 2007;Mariathasan *et al.*, 2006). Da alle genannten Gene in humanen PBMCs und THP-1 nachweisbar exprimiert waren (Abb. 5-6, Daten nicht gezeigt), wurden nachfolgend RNAi-Experimente durchgeführt, um den Einfluss dieser Gene auf die IL-1 β -Produktion in humanen Monozyten nach Infektion mit *L. monocytogenes* zu untersuchen.

Humane PBMCs oder THP-1 wurden transfiziert mit unspezifischer Kontrolll-siRNA oder mit siRNA, welche spezifisch gegen eines der genannten Gene war. Nach 72 h wurde mittels quantitativer oder semi-quantitativer PCR der Knock-Down des Zielgens überprüft oder die Zellen mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Anschließend wurde die Freisetzung von IL-1 β und IL-8 mit ELISA untersucht.

Der Knock-Down von NLRP3 mit RNAi (Abb. 5-11, A) hemmte im Vergleich zur Kontrolle die IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs (Abb. 5-11, B) nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD statistisch signifikant (p < 0.001). Hierbei war keine Veränderung der IL-8 Sekretion zu beobachten (Abb. 5-11, C).



Abbildung 5-11: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP3 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRP3-siRNA (NLRP3). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NLRP3 mittels quantitativer PCR überprüft (A) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B) und IL-8 (C) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

In THP-1 Zellen zeigte sich ebenfalls eine statistisch signifikante Hemmung (p < 0.001) der Listerien-induzierten IL-1 β Produktion (Abb. 5-12, A) durch die spezifische NLRP3-siRNA, wohingegen diese keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-8 hatte (Abb. 5-12, B).



Abbildung 5-12: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP3 auf die Listerieninduzierte IL-1 β -Produktion in humanen THP-1

THP-1 wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRP3-siRNA (NLRP3) transfiziert. 72 h später wurden die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 1] infiziert. Die zellfreien Überstände wurden mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (A) und IL-8 (B) untersucht. Der Knock-Down von NLRP3 wurde nach 72 h mit spezifischen Primern durch semi-quantitative PCR überprüft, wobei der gleichmäßige mRNA-Einsatz durch die Detektion des konstant exprimierten Gens GAPDH sichergestellt wurde (C). Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Der Knock-Down von NLRC4 mit spezifischer siRNA (Abb. 5-13, A) hatte keinen Einfluss auf die Produktion von IL-1 β (Abb. 5-13, B) oder IL-8 (Abb. 5-13, C) nach Infektion von humanen PBMCs oder THP-1 (Daten nicht gezeigt) mit *L. monocytogenes* EGD.



Abbildung 5-13: Einfluss der Expressionshemmung von NLRC4 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRC4-siRNA (NLRC4). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NLRC4 mittels quantitativer PCR überprüft (A) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B) und IL-8 (C) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die Hemmung von NLRP1 mit RNAi (Abb. 5-14, A) zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Listerien-induzierte Produktion von IL-1 β (Abb. 5-14, B) oder IL-8 (Abb. 5-14, C) in humanen PBMCs und THP-1 (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5-14: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP1 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRP1-siRNA (NLRP1). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NLRP1 mittels quantitativer PCR überprüft (A) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B) und IL-8 (C) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Der Knock-Down von NOD2 durch spezifische siRNA (Abb. 5-15, A) zeigte im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Listerien-induzierte Freisetzung von IL-1 β (Abb. 5-15, B) oder IL-8 (Abb. 5-15, C) in humanen PBMCs und THP-1 (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5-15: Einfluss der Expressionshemmung von NOD2 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NOD2-siRNA (NOD2). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NOD2 mittels quantitativer PCR überprüft (A) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B) und IL-8 (C) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von vier unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Der Einfluss von AIM2 wurde mit zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte die Hemmung von AIM2 durch RNAi (Abb. 5-16, A, D) keine Veränderung der Listerien-induzierten Sekretion von IL-1 β (Abb. 5-16, B, E) und IL-8 (Abb. 5-16, C, F) in humanen PBMCs.



Abbildung 5-16: Einfluss der Expressionshemmung von AIM2 auf die Listerieninduzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder einer von zwei spezifischen AIM2-siRNA Sequenzen (AIM2a, AIM2b). Nach 72 h wurde der Knock-Down von AIM2 mittels quantitativer PCR überprüft (A, D) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C, E, F). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B, E) und IL-8 (C, F) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die Hemmung von NLRP6 durch spezifische siRNA (Abb. 5-17, A) hatte keinen Einfluss auf die Ausschüttung von IL-1 β (Abb. 5-17, B) und IL-8 (Abb. 5-17, C) in humanen PBMCs und THP-1 (Daten nicht gezeigt) nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD.



Abbildung 5-17: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP6 auf die Listerieninduzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRP6-siRNA (NLRP6). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NLRP6 mittels quantitativer PCR überprüft (A) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B) und IL-8 (C) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Der Einfluss von NLRP12 wurde mit zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle bewirkte der Knock-Down von NLRP12 mit RNAi (Abb. 5-18, A, D) keine Veränderung der Listerien-induzierten Produktion von IL-1 β (Abb. 5-18, B, E) und IL-8 (Abb. 5-18, C, F) in humanen PBMCs und THP-1 (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 5-18: Einfluss der Expressionshemmung von NLRP12 auf die Listerieninduzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden transfiziert mit Kontroll-siRNA (ctrl) oder einer von zwei spezifischen siRNA-Sequenzen gegen NLRP12 (NLRP12a, NLRP12b). Nach 72 h wurde der Knock-Down von NLRP12 mittels quantitativer PCR überprüft (A, D) oder die Zellen für 16 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C, E, F). Anschließend wurden die zellfreien Überstände mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1 β (B, E) und IL-8 (C, F) untersucht. Die dargestellten ELISA Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass das NLRP3-Inflammasom die *L. monocytogenes*-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen Monozyten vermittelt, wohingegen NLRP1, NLRP6, NLRP12, NOD2, NLRC4 und AIM2 keine essentielle Rolle zu spielen scheinen.

Um auszuschließen, dass die verminderte IL-1β-Produktion nach Infektion von NLRP3-siRNA-transfizierten humanen Monozyten mit *L. monocytogenes* auf einem verstärkten Zelltod gegenüber den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen beruht, wurde die Menge an freigesetzter Laktat-Dehydrogenase (LDH) als Indikator für Zelltod mit einem Zytotoxizitäts-Detektions-Assay gemessen. Die freigesetzte LDH-Menge war vor und nach Infektion mit *L. monocytogenes* zwischen den Kontroll-siRNA- und NLRP3-siRNA-behandelten Zellen gleichwertig (Daten nicht gezeigt).

5.6 Bedeutung des K⁺-Efflux für die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Das NLRP3-Inflammasom kann durch sehr viele verschiedenartige Stimuli aktiviert werden. Aus diesem Grund werden in der Literatur, neben der Möglichkeit einer direkten NLRP3-Aktivierung, Mechanismen zur indirekten Aktivierung von NLRP3 diskutiert. Hierzu zählt die Herabsetzung des intrazellulären Kaliumspiegels durch die Entstehung eines K⁺-Efflux (Petrilli *et al.*, 2007;Mariathasan *et al.*, 2006). Im Folgenden wurde untersucht, ob in humanen PBMCs der K⁺-Efflux eine Bedeutung für die Freisetzung von IL-1 β nach Infektion mit *L. monocytogenes* hat.

Ein K⁺-Efflux kann durch Zugabe eines Überschusses an Kaliumchlorid in das Zellmedium verhindert werden. Daher wurden humane PBMCs zum Teil unter Zugabe von KCl mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Als Negativkontrolle wurde dem Zellmedium ein Überschuss an NaCl zugesetzt. Die Produktion von IL-1 β wurde mit ELISA untersucht. NaCl und KCl hatten in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt). Nach Infektion von humanen PBMCs mit EGD (Abb. 5-19) konnte eine statistisch signifikante (p < 0.001) Hemmung der IL-1 β -Produktion durch KCl im Vergleich zu NaCl beobachtet werden.

64



Abbildung 5-19: Bedeutung des K⁺-Efflux für die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden mit 130 mM NaCl oder KCl behandelt und nachfolgend mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert. Die zellfreien Überstände wurden nach 16 h mit einem spezifischen ELISA auf die Produktion von IL-1 β untersucht. Das dargestellte Ergebnis repräsentiert den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Der statistisch signifikante Unterschied (p < 0.001) ist mit drei Sternen gekennzeichnet.

Dieser Befund deutet auf die Entstehung eines K⁺-Efflux in *L. monocytogenes*infizierten humanen PBMCs hin, welcher für die Ausschüttung von IL-1 β notwendig ist.

5.7 Bedeutung der Cathepsin B-Freisetzung für die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Als ein weiterer möglicher Mechanismus zur indirekten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wurde die Freisetzung der lysosomalen Protease Cathepsin B durch Lysosomenschädigung beschrieben (Hornung *et al.*, 2008;Halle *et al.*, 2008). Da es während des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* zu einer LLO-vermittelten Zerstörung des Phagolysosoms kommt, wurde nachfolgend untersucht, ob Cathepsin B einen Einfluss auf die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs hat.

Hierzu wurden humane PBMCs zum Teil unter Verwendung des Cathepsin B-Inhibitors CA-074 Me mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und die Freisetzung von IL-1 β mit ELISA gemessen. Der Inhibitor hatte in der eingesetzten Konzentration von 10 μ M keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung von Cathepsin B in humanen PBMCs führte nach Infektion mit EGD zu einer statistisch signifikanten (p < 0.01) Reduktion der IL-1 β -Produktion (Abb. 5-20, A). Zusätzlich wurde der Inhibitor Bafilomycin A1 eingesetzt, welcher das vakuoläre

H⁺-ATPase System hemmt. Dieses ist notwendig für die Lysosomenansäuerung, die Phagolysosomenverschmelzung und die Aktivierung von lysosomalen Proteasen einschließlich Cathepsin B (Sharp *et al.*, 2009;Hornung *et al.*, 2008). Humane PBMCs wurden zum Teil mit Bafilomycin A1 behandelt und nachfolgend mit *L. monocytogenes* EGD infiziert. Die Produktion von IL-1β wurde mit ELISA untersucht. Der Inhibitor hatte in der eingesetzten Konzentration von 100 nM keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung der lysosomalen Ansäuerung führte zu einer statistisch signifikanten (p < 0.001) Reduktion der IL-1β-Produktion in humanen PBMCs nach Infektion mit EGD (Abb. 5-20, B).



Abbildung 5-20: Bedeutung von Cathepsin B und lysosomaler Ansäuerung für die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs

Humane PBMCs wurden zum Teil mit 10 μ M Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me (CA074Me) (A) oder 100 nM Bafilomycin A1 (Bafilomycin) (B) behandelt und mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von IL-1 β in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mit einem spezifischen ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit zwei Sternen (p < 0.01) bzw. drei Sternen (p < 0.001) gekennzeichnet.

Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die lysosomale Ansäuerung und Cathepsin B eine Rolle in der Produktion von IL-1 β nach Infektion von humanen PBMCs mit *L. monocytogenes* spielen.

5.8 Die Listerien-induzierte mIL-1β-Produktion in murinen BMMs ist abhängig von LLO, NIrp3 und Cathepsin B

Die Bedeutung von LLO, NLRP3 und Cathepsin B in der Listerien-induzierten IL-1β Produktion wurde anschließend in murinen Knochenmarksmakrophagen (BMMs) untersucht, um die Ergebnisse mit humanen PBMCs zu bestätigen.

Murine Wildtyp (WT) oder NIrp3 Knock-Out (NIrp3 KO) BMMs wurden zum Teil mit dem Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me behandelt und anschließend mit *L. monocytogenes* EGD oder EGD Δhly infiziert. Die Produktion von mIL-1 β wurde mit ELISA untersucht.

Die mIL-1 β -Freisetzung nach Infektion von WT BMMs mit EGD Δhly war statistisch signifikant (p < 0.001) geringer als nach Infektion mit EGD. Des Weiteren war die mIL-1β-Produktion nach Infektion mit EGD in NIrp3 KO BMMs statistisch signifikant (p < 0.001) geringer als in WT BMMs. Hierbei zeigte die mIL-1 β -Sekretion nach Infektion von NIrp3 KO BMMs mit EGD keinen statistisch signifikanten Unterschied zu einer Infektion von WT BMMs mit EGD Δhly (Abb. 5-21). Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die Listerien-induzierte mIL-1ß-Produktion in murinen BMMs abhängig ist von LLO und NIrp3. Zudem hemmte der Cathepsin B-Inhibitor die EGD-induzierte mIL-1 β -Sekretion in WT BMMs statistisch signifikant (p < 0.001) (Abb. 5-21). Zusammengenommen deuten diese Befunde darauf hin, dass LLO, Cathepsin B und NIrp3 Teil des gleichen Wirkmechanismus sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es während der Listerieninfektion zu einer LLO-vermittelten Freisetzung von Cathepsin B kommt, welches direkt oder indirekt das NIrp3-Inflammasom aktiviert. Anders als bei der LLO- oder NIrp3-Defizienz zeigte sich jedoch nach Hemmung von Cathepsin B eine geringe Restaktivität der Listerien-induzierten mIL-1β-Produktion (Abb. 5-21). Dieses Ergebnis deutet an, dass es möglicherweise neben dem LLOund Cathepsin B-abhängigen Mechanismus zur NLRP3-Aktivierung noch einen LLOabhängigen, Cathepsin B-unabhängigen Signalweg zur NLRP3-Aktivierung gibt.



Abbildung 5-21: Abhängigkeit der mIL-1β-Produktion in Listerien-infizierten murinen BMMs von LLO, NIrp3 und Cathepsin B

Murine Wildtyp (WT) oder NIrp3 Knock-Out (NIrp3 KO) BMMs wurden zum Teil mit 10 μ M Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me (CA074Me) behandelt und mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] oder EGD Δhly (Δhly) [MOI 0.001] infiziert. Die Produktion von mIL-1 β in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mit einem spezifischen ELISA untersucht. Das dargestellte Ergebnis repräsentiert den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.001) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. Nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Die oben dargestellten Ergebnisse und die Ergebnisse aus 5.7. führen zu der Vermutung, dass es während der Listerieninfektion zu einer Freisetzung von Cathepsin B in das Zellzytosol kommt. Diese Hypothese wurde mittels Konfokalmikroskopie näher untersucht. Hierzu wurden murine Wildtyp BMMs zum Teil mit *L. monocytogenes* EGD infiziert und Cathepsin B wurde mit einem spezifischen Antikörper visualisiert. Wirtszellaktin und Listerien wurden mit Phalloidin gefärbt. In nicht infizierten BMMs zeigte sich Cathepsin B in punktförmigen Ansammlungen, welche mit einer endolysosomalen Lokalisation erklärbar sind (Abb. 5-22, A). In Listerien-infizierten BMMs konnten reproduzierbar deutlich weniger dieser punktförmigen Cathepsin B-Ansammlungen detektiert werden (Abb. 5-22, B, C). Dieses Ergebnis deutet auf eine Freisetzung von Cathepsin B in das Zellzytosol hin.

68



Abbildung 5-22: Konfokalmikroskopie von Cathepsin B in Listerien-infizierten murinen BMMs

Murine BMMs wurden uninfiziert belassen (A) oder für 2 h mit *L. monocytogenes* EGD [MOI 0.001] infiziert (B, C). Anschließend wurde Cathepsin B mit einem spezifischen primären Antikörper und einem AF 546-markierten sekundären Antikörper detektiert (rot). Zellaktin und Aktin-ummantelte *L. monocytogenes* (markiert durch weiße Pfeile) wurden mit Phalloidin AF488 visualisiert (grün).

5.9 Aufgereinigtes LLO induziert die Produktion von IL-1 β in humanen PBMCs und murinen BMMs in Abhängigkeit von NLRP3

Die bisher erarbeiteten Ergebnisse in humanen Monozyten und murinen Makrophagen zeigen eine zentrale Rolle von LLO in der IL-1 β -Produktion durch *L. monocytogenes* auf. Mögliche LLO-induzierte Mechanismen sollten nachfolgend mit Hilfe von aufgereinigtem LLO näher untersucht werden.

Humane PBMCs und murine BMMs wurden mit aufgereinigtem LLO in sublytischen Konzentrationen stimuliert. Im Gegensatz zu humanen Monozyten bedarf es in Mausmakrophagen für ein substanziell detektierbares mIL-1 β Signal bei vielen Stimulantien einer Vorstimulation mit LPS (Chu *et al.*, 2009;Martinon *et al.*, 2006). Daher wurden murine BMMs zum Teil mit LPS vorbehandelt. Die Ausschüttung von IL-1 β oder mIL-1 β wurde mit ELISA untersucht. Listeriolysin O aktivierte Dosisabhängig die Produktion von IL-1 β in humanen PBMCs (Abb. 5-23, A) sowie nach LPS-Vorstimulation die Produktion von mIL-1 β in murinen BMMs (Abb. 5-23, B).


Abbildung 5-23: Dosis-abhängige Produktion von IL-1 β nach Stimulation von humanen PBMCs oder murinen BMMs mit LLO

(A) Humane PBMCs wurden mit LLO in einer Konzentration von 500 ng/ml oder 1 µg/ml stimuliert. (B) Murine BMMs wurden zum Teil für 4 h mit LPS [3 ng/ml] vorbehandelt und anschließend mit LLO in einer Konzentration von 500 ng/ml oder 1 µg/ml stimuliert. Nach 16 h wurde die Produktion von IL-1 β (A) oder mIL-1 β (B) in den zellfreien Überständen mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten.

Diese Daten zeigen, dass aufgereinigtes LLO die Produktion von IL-1 β in humanen PBMCs und LPS-vorbehandelten murinen BMMs induziert.

Als nächstes wurde untersucht, ob die IL-1 β -Produktion durch LLO von NLRP3 abhängig ist. Hierzu wurden humane PBMCs mit unspezifischer Kontroll-siRNA oder spezifischer NLRP3-siRNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit aufgereinigtem LLO stimuliert. Parallel wurden murine WT BMMs und Nlrp3 KO BMMs mit LPS vorbehandelt und anschließend mit LLO stimuliert. Die Produktion von IL-1 β oder mIL-1 β wurde mit ELISA untersucht. Durch den Einsatz der spezifischen NLRP3-siRNA wurde die IL-1 β -Produktion durch LLO in humanen PBMCs im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant (p < 0.01) gehemmt (Abb. 5-24, A). Die LLO-induzierte mIL-1 β -Produktion nach LPS-Vorstimulation war in murinen Nlrp3 KO BMMs statistisch signifikant (p < 0.01) geringer als in WT BMMs (Abb. 5-24, B).



Abbildung 5-24: Bedeutung von NLRP3 für die IL-1β-Produktion in LLO-stimulierten humanen PBMCs und murinen BMMs

(A) Humane PBMCs wurden mit unspezifischer Kontroll-siRNA (ctrl) oder spezifischer NLRP3-siRNA (NLRP3) transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit LLO [500 ng/ml] stimuliert. (B) Murine WT BMMs oder Nlrp3 KO BMMs wurden zum Teil für 4 h mit LPS [3 ng/ml] vorbehandelt und anschließend mit LLO [1 µg/ml] stimuliert. Die Produktion von IL-1 β (A) oder mIL-1 β (B) wurde 16 h später in den zellfreien Überständen mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von fünf (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede (p < 0.01) sind mit zwei Sternen gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die IL-1β-Freisetzung in LLO-stimulierten humanen PBMCs und murinen BMMs durch das NLRP3-Inflammasom vermittelt wird.

5.10 Bedeutung des K⁺-Efflux für die LLO-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs

In der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass die Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs abhängig ist von einem K⁺-Efflux. Im Folgenden wurde die Bedeutung des K⁺-Efflux für die IL-1 β -Produktion durch aufgereinigtes LLO untersucht.

Ergebnisse

Humane PBMCs oder murine LPS-vorbehandelte BMMs wurden mit LLO stimuliert unter Zugabe von einem Überschuss an KCI oder NaCI in das Zellmedium. Die Produktion von IL-1 β oder mIL-1 β wurde anschließend mit ELISA untersucht. Nach Stimulation von humanen PBMCs (Abb. 5-25, A) oder LPS-vorbehandelten murinen BMMs (Abb. 5-25, B) mit LLO konnte jeweils eine statistisch signifikante Hemmung (p < 0.001 bzw. p < 0.01) der IL-1 β -Produktion durch den extrazelluläre Überschuss an KCI im Vergleich zu einem Überschuss an NaCI beobachtet werden.



Abbildung 5-25: Bedeutung des K⁺-Efflux für die LLO-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs

(A) Humane PBMCs wurden mit 130 mM NaCl oder KCl behandelt und mit LLO [500 ng/ml] stimuliert. (B) Murine Wildtyp BMMs wurden für 4 h mit LPS [3 ng/ml] vorinkubiert, mit 130 mM NaCl oder KCl behandelt und mit LLO [1 µg/ml] stimuliert. Die Produktion von IL-1 β (A) oder mIL-1 β (B) wurde 16 h später in den zellfreien Überständen mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit zwei Sternen (p < 0.01) bzw. drei Sternen (p < 0.001) gekennzeichnet.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass ein K⁺-Efflux für die IL-1β-Produktion durch aufgereinigtes LLO in humanen PBMCs und LPS-vorbehandelten murinen BMMs wichtig ist.

5.11 Bedeutung der Cathepsin B-Freisetzung für die LLO-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs

Die Ergebnisse aus 5.8 deuten auf eine überwiegend Cathepsin-B-abhängige sowie möglicherweise eine geringe Cathepsin-B-unabhänge Aktivierung von NLRP3 durch *L. monocytogenes* hin. Nachfolgend wurde untersucht, ob Cathepsin B in die IL-1 β -Produktion durch aufgereinigtes LLO involviert ist.

Humane PBMCs oder LPS-vorstimulierte BMMs wurden zum Teil mit dem Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me behandelt und mit LLO stimuliert. Die Produktion von IL-1 β oder mIL-1 β wurde mit ELISA untersucht. Die Hemmung von Cathepsin B in humanen PBMCs hatte keinen Einfluss auf die LLO-induzierte IL-1 β -Produktion (Abb. 5-26, A). Auch in murinen LPS-vorstimulierten BMMs führte der Einsatz von CA-074 Me zu keiner Veränderung der LLO-induzierten mIL-1 β -Freisetzung (Abb. 5-26, B).



Abbildung 5-26: Bedeutung von Cathepsin B für die LLO-induzierte IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs

(A) Humane PBMCs wurden zum Teil mit 10 μ M Cathepsin B Inhibitor CA-074 Me (CA074Me) behandelt und mit LLO [500 ng/ml] stimuliert. (B) Murine Wildtyp BMMs wurden für 4 h mit LPS [3 ng/ml] vorinkubiert, zum Teil mit 10 μ M Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me (CA074Me) behandelt und mit LLO [1 μ g/ml] stimuliert. Die Produktion von IL-1 β (A) oder mIL-1 β (B) in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels spezifischer ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (± SEM) von drei unabhängigen Experimenten. Statistisch nicht signifikante Unterschiede (p > 0.05) sind mit n.s. markiert.

Diese Daten zeigen, dass aufgereinigtes LLO unabhängig von Cathepsin B die IL-1β-Produktion in humanen PBMCs und LPS-vorstimulierten murinen BMMs induziert.

Im Gegensatz dazu war die IL-1β-Freisetzung in Listerien-infizierten humanen PBMCs größtenteils und murinen BMMs abhängig von Cathepsin Β. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass es während der Listerieninfektion zu einer LLO-abhängigen Cathepsin B-Freisetzung ins Zellzytosol kommt, welche das NLRP3-Inflammasom aktiviert. Zusätzlich besteht möglicherweise ein LLO-abhängiger, aber Cathepsin B-unabhängiger Signalweg, bei dem eine direkte Aktivierung von NLRP3 durch LLO erfolgt oder das NLRP3-Inflammasom durch eine LLO-abhängige Porenbildung in der Zellmembran (K⁺-Efflux) aktiviert wird.

6 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig, dass die Produktion von IL-1β in humanen Monozyten nach Infektion mit *L. monocytogenes* EGD abhängig ist vom listeriellen Virulenzfaktor LLO und den wirtszellseitigen Inflammasom-Komponenten Caspase-1, ASC und NLRP3. Die erarbeiteten Ergebnisse charakterisieren im Weiteren die Mechanismen der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in Listerien-infizierten humanen Monozyten und murinen Makrophagen näher. Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse sowie offene Fragen diskutiert.

6.1 Rolle der listeriellen Virulenzfaktoren in der Listerien-induzierten IL-1β Produktion

Bei der Infektion von phagozytierenden Wirtszellen spielen die listeriellen Phospholipasen C und das Zytolysin Listeriolysin O eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zuerst untersucht, ob die Produktion von IL-1 β in humanen PBMCs und THP-1 bei Infektion mit *L. monocytogenes* von diesen bakteriellen Faktoren abhängig ist.

Listeriolysin O ist der Hauptvirulenzfaktor von L. monocytogenes und essentiell für die zytosolische Freisetzung der Bakterien in Makrophagen (Alberti-Segui et al., 2007). Eine Infektion von humanen Monozyten oder Mausmakrophagen mit der isogenen LLO-defizienten L. monocytogenes EGD Δhly führte zu einer deutlich geringeren IL-1 β -Produktion als eine Infektion mit Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Ebenso wenig waren die chromosomale Punktmutante L. monocytogenes EGD hly W492A, deren LLO nicht porenbildend ist, oder die avirulente L. innocua INN in der Lage eine starke Freisetzung von IL-1 β in humanen PBMCs zu bewirken. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, in welchen nur Wildtyp L. monocytogenes die Aktivierung von Caspase-1 und Sekretion von reifem IL-1ß in Mausmakrophagen induzierten (Warren et al., 2008;Ozoren et al., 2006). L. monocytogenes EGD Ahly, EGD hly W492A und L. innocua INN können nicht aus dem Phagosom von Monozyten und Makrophagen entkommen (Alberti-Segui et al., 2007), wodurch sie der lysosomalen Degradation unterliegen (Shaughnessy et al., 2006;O'Riordan et al., 2002). Die geringe IL-1^β-Produktion in humanen Monozyten nach Infektion mit diesen Bakterien ist aber wahrscheinlich nicht auf eine verminderte

Bakterienvermehrung zurück zu führen, da auch die Infektion mit einer drastisch höheren MOI von *L. monocytogenes* EGD ∆hly, EGD hly W492A oder *L. innocua* INN keine Steigerung der IL-1β-Ausschüttung zur Folge hatte (Daten nicht gezeigt). Zudem induzierten alle untersuchten Bakterien in gleichem Maße die NF-kBregulierte Expression von pro-IL-1ß und IL-8. Die listeriellen Phospholipasen C, PC-PLC und PI-PLC, unterstützen LLO bei der Lyse der phagosomalen Membran, insbesondere bei der Lyse der Doppelmembran nach Zell-zu-Zell-Wanderung (Alberti-Segui et al., 2007). Die Freisetzung von IL-1ß sowie die Sekretion von IL-8 nach Infektion von humanen PBMCs mit der isogenen L. monocytogenes EGD $\Delta plcA \Delta plcB$ war gleichwertig zu einer Infektion mit Wildtyp L. monocytogenes EGD. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Aktivierung von NF-kB und Caspase-1 in Listerien-infizierten humanen Monozyten unabhängig von den listeriellen Virulenzfaktoren PC-PLC und PI-PLC verläuft. LLO scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivierung von NF-kB sowie die Transkription und Translation von pro-IL-1ß auszuüben. Die post-translationale Prozessierung und Freisetzung von IL-1ß in Listerien-infizierten humanen Monozyten ist dahingegen abhängig von porenbildendem LLO.

Im späteren Verlauf der Arbeit zeigte sich, dass auch aufgereinigtes LLO die Produktion von IL-1β in humanen PBMCs bewirkt, wobei die Menge des freigesetzen IL-1ß gering war im Vergleich zu einer Infektion mit L. monocytogenes. Es ist anzunehmen, dass LLO in der eingesetzten sublytischen Konzentration nicht über die gesamte Inkubationszeit stabil bleibt, wohingegen lebende Bakterien fortlaufend neues LLO produzieren (Schnupf and Portnoy, 2007). Zudem scheint LLO in der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion vornehmlich für die Aktivierung von Caspase-1 und weniger für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich zu sein, da *L. monocytogenes* EGD und EGD Δhly äquivalente pro-IL-1 β Proteinmengen induzierten. Dementsprechend induziert eine Stimulation mit aufgereinigtem LLO vermutlich eine deutlich geringere pro-IL-1ß Proteinsynthese als eine Infektion mit *L. monocytogenes.* Welcher Rezeptor die NF- κ B-Aktivierung und pro-IL-1 β -Expression nach Stimulation von humanen PBMCs mit LLO vermitteln könnte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Es existieren widersprüchliche Studien zu einer möglichen Erkennung von LLO durch TLR4 (Bou Ghanem et al., 2009;Gekara et al., 2009;Hara et al., 2008;Park et al., 2004), aber es wurde bereits vielfach gezeigt,

dass extrazellulär appliziertes aufgereinigtes oder rekombinantes LLO in verschiedenen humanen und murinen Zellen die Aktivierung von NF- κ B und die Expression von Zytokinen induziert (Kayal *et al.*, 2002;Rose *et al.*, 2001;Kayal *et al.*, 1999;Nishibori *et al.*, 1996). Die IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs durch aufgereinigtes LLO ist nicht auf eine Kontaminierung mit LPS zurück zu führen, da das LLO nicht rekombinant in *E. coli* produziert wurde, sondern aus dem Überstand einer LLO-überexprimierenden *L. innocua* aufgereinigt wurde (Darji *et al.*, 1995).

6.2 Charakterisierung des Inflammasoms, welches die *L. monocytogenes*induzierte IL-1β-Produktion vermittelt

Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuteten auf eine LLO-abhängige Inflammasom-Aktivierung nach Infektion von humanen Monozyten mit *L. monocytogenes* hin. Durch die Analyse der mRNA-Expression erwiesen sich Caspase-1, ASC, die NLR-Proteine NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRP6, NLRP8, NLRP12, NOD2, NLRC3, NLRC4, NLRC5 und NAIP sowie das HIN-200-Protein AIM2 als denkbare Inflammasom-Komponenten in humanen Monozyten.

Zunächst wurde überprüft, ob die post-translationale Prozessierung von pro-IL-1ß tatsächlich durch Caspase-1 erfolgt (Martinon et al., 2002). Durch RNAi-Experimente in THP-1 und Inhibitor-Experimente in humanen PBMCs konnte bestätigt werden, dass Caspase-1 die Produktion von reifem IL-1ß in humanen Monozyten reguliert. Dieses Ergebnis deckt sich mit bereits publizierten Resultaten in Mausmakrophagen (Warren et al., 2008;Ozoren et al., 2006). Interessanterweise wurde auch die geringe IL-18-Freisetzung in humanen PBMCs nach Infektion mit LLO-negativen L. monocytogenes durch den Caspase-1-Inhibitor Z-YVAD-FMK gehemmt. Dieses Ergebnis deutet an, dass neben dem LLO-abhängigen, Caspase-1-abhängigen Mechanismus der pro-IL-1β-Prozessierung möglicherweise noch ein LLOunabhängiger, Caspase-1-abhängiger Signalweg besteht. Bei diesem könnte es sich um eine kürzlich in humanen PBMCs beschriebene konstitutive Caspase-1-Aktivität handeln. Demzufolge würden humane PBMCs für die Produktion von IL-1 β nur das Signal zur NF- κ B-abhängigen Expression von pro-IL-1 β benötigen (van de Veerdonk et al., 2009;Netea et al., 2009;Kleinnijenhuis et al., 2009). Dieses Phänomen könnte für die basale Produktion von IL-1 β nach Infektion von humanen PBMCs mit *L. monocytogenes* EGD Δhly verantwortlich sein. Andererseits entsteht eine deutlich

höhere, LLO-abhängige IL-1 β -Produktion nach Infektion von humanen PBMCs mit Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Diese Ergebnisse zeigen somit, dass auch in humanen PBMCs eine zusätzlich induzierbare Inflammasom-Aktivität besteht und dass eine starke IL-1 β -Produktion sowohl von einer NF- κ B-Aktivierung als auch von einer Inflammasom-Aktivierung durch Pathogene oder DAMPs abhängt. Des Weiteren lag die IL-1 β -Ausschüttung in humanen THP-1 und murinen BMMs, welche keine konstitutiv aktive Caspase-1 aufweisen, nach Infektion mit EGD Δ *hly* nicht über dem Niveau von uninfizierten Zellen.

Als nächstes wurde die Bedeutung des Inflammasom-Adaptermolekül ASC untersucht. ASC wurde bereits als notwendiges oder optionales Adaptermolekül für das NLRP1- (Faustin *et al.*, 2007;Martinon *et al.*, 2002), NLRP2- (Bruey *et al.*, 2004;Agostini *et al.*, 2004), NLRP3- (Agostini *et al.*, 2004), NLRC4- (Case *et al.*, 2009) und AIM2-Inflammasom (Burckstummer *et al.*, 2009;Fernandes-Alnemri *et al.*, 2009;Hornung *et al.*, 2009) identifiziert und bildet potentiell auch mit NLRP6 (Grenier *et al.*, 2002) und NLRP12 (Wang *et al.*, 2002) ein Inflammasom. Mittels RNAi-Experimenten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung von ASC an der Sekretion von IL-1 β in Listerien-infizierten humanen Monozyten gezeigt werden. Die nicht gänzliche Hemmung der IL-1 β -Produktion in ASC-siRNA-transfizierten Zellen könnte an der nicht vollständigen Herunterregulation von ASC durch RNAi liegen, aber auch die Beteiligung von einem weiteren, ASC-unabhängigen Inflammasom andeuten.

Nachdem Caspase-1 und ASC als beteiligte Inflammasom-Komponenten identifiziert waren, wurden die NLRs NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NOD2, NLRC4 sowie das HIN-200 Protein AIM2 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Entscheidung basierte auf dem erstellten Expressionsprofil möglicher Inflammasom-Komponenten in humanen Monozyten und den listeriellen Virulenzfaktoren bzw. PAMPs, welche Inflammasom-Aktivatoren darstellen könnten. Die Ergebnisse zu den einzelnen NLRs und AIM2 werden im Folgenden diskutiert.

Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kann durch eine Vielzahl verschiedenartiger PAMPs und DAMPs erfolgen und die zu Grunde liegenden Mechanismen sind unvollständig geklärt. Abgesehen von der Möglichkeit einer direkten NLRP3-Aktivierung werden Modelle einer indirekten NLRP3-Aktivierung diskutiert. Diese umfassen die Porenbildung, die Enstehung eines K⁺-Efflux, die Freisetzung von Cathepsin B und die Bildung von ROS (reactive oxygen species).

Für die Bildung des NLRP3/Nlrp3-Inflammasoms ist ASC essentiell (Agostini et al., 2004). Zu den beschriebenen Aktivatoren des NLRP3-/Nlrp3-Inflammasoms gehören u. a. MDP (Marina-Garcia et al., 2008; Pan et al., 2007; Martinon et al., 2004) und porenformende Toxine wie Nigericin, Tetanolysin und Aerolysin (Chu et al., 2009; Mariathasan et al., 2006; Gurcel et al., 2006). Aufgrund dieser Befunde wäre eine NLRP3-Aktivierung durch MDP und LLO in der Listerieninfektion denkbar. Zudem demonstrierten bereits zwei Arbeitsgruppen die Beteiligung von Nlrp3 an der Caspase-1-Aktivierung IL-1β-Produktion in und Listerien-infizierten Mausmakrophagen (Warren et al., 2008; Mariathasan et al., 2006). Dahingegen konnte eine andere Arbeitsgruppe diese Ergebnisse nicht bestätigen (Kanneganti et al., 2007; Franchi et al., 2007a). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels RNAi-Experimenten eine klare NLRP3-Abhängigkeit der IL-1β-Produktion in L. monocytogenes-infizierten humanen PBMCs und THP-1 aufgezeigt werden. Die Restaktivität der IL-1^β-Freisetzung nach Infektion von NLRP3-siRNA-transfizierten humanen Monozyten mit L. monocytogenes ist wahrscheinlich auf eine nicht vollständige Herunterregulation von NLRP3 durch RNAi zurück zu führen und deutet weniger auf die Beteiligung eines weiteren Inflammasoms hin. Diese Annahme wurde durch Experimente mit Nlrp3 Knock-Out Mausmakrophagen gestützt, da diese Zellen nach Listerieninfektion so gut wie kein mIL-1ß mehr produzierten. Die dargestellten eigenen Ergebnisse bestätigen die Daten von Warren et. al. (2008) und Mariathasan et. al. (2006) und stehen im Gegensatz zu den Befunden von Franchi et. al. (2007a) und Kanneganti et. al. (2007). Darüber hinaus wurde mittels LDH-Messung bestätigt, dass die reduzierte IL-1 β -Produktion in Listerien-infizierten, NLRP3-siRNA-transfizierten humanen Monozyten nicht an einem verstärkten Zelltod gegenüber den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen liegt (Daten nicht gezeigt). Im späteren Verlauf dieser Arbeit konnte mit Hilfe der spezifischen NLRP3-siRNA gezeigt werden, dass auch die IL-1 β -Produktion durch aufgereinigtes LLO in humanen PBMCs NLRP3-abhängig ist. Für die Restproduktivität an IL-1ß in NLRP3siRNA-transfizierten, LLO-stimulierten humanen PBMCs ist vermutlich eine nicht vollständige Herunterregulation von NLRP3 durch RNAi verantwortlich. Diese Annahme konnte durch Experimente mit murinen NIrp3 Knock-Out BMMs gestützt werden. Für die Ausschüttung von IL-1ß nach Stimulation mit LLO war in murinen BMMs eine Vorbehandlung mit LPS erforderlich. Die Notwendigkeit einer LPS-Vorstimulation zur Erzielung einer ausreichenden pro-IL-1_B-Synthese in

Mausmakrophagen wurde bereits für viele andere PAMPs gezeigt und steht im Einklang mit der Literatur (Chu *et al.*, 2009;Martinon *et al.*, 2006).

Des Weiteren wurde die Bedeutung von NLRC4 in der Listerien-induzierten IL-1ß-Produktion in humanen Monozyten untersucht, da eine veröffentlichte Studie die Beteiligung von NIrc4 an der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion in murinen Makrophagen aufzeigte (Warren et al., 2008). NIrc4 wird aktiviert durch flagellierte und nicht-flagellierte Gram-negative Bakterien, welche durch porenbildende Typ IIIoder Typ IV-Sekretionssysteme bakterielle Effektormoleküle, wie z. B. Flagellin, in das Wirtszellzytosol übertragen. Neben dem Einschleusen von PAMPs in das Zellzytosol könnte diese Porenbildung aber auch lonenfluxe induzieren oder endogene DAMPs durch die Membranschädigung freisetzen, welche das NIrc4-Inflammasoms aktivieren könnten (Case et al., 2009;Sutterwala et al., 2007;Suzuki et al., 2007; Miao et al., 2006). Ein K⁺-Efflux ist für die Caspase-1-Aktivierung in S. typhimurium-infizierten Mausmakrophagen jedoch nicht von Bedeutung (Petrilli et al., 2007; Franchi et al., 2007a). ASC scheint an der NIrc4-vermittelten, Caspase-1abhängigen Zytokinsekretion beteiligt zu sein (Case et al., 2009;Sutterwala et al., 2007; Suzuki et al., 2007; Franchi et al., 2007b). L. monocytogenes ist ein Grampositives Bakterium und besitzt kein Typ III- oder Typ IV-Sekretionssystem, exprimiert aber Flagellin. Die listerielle Flagellin-Expression wird bei einer Temperatur von 37°C und bei Infektion der Wirtszelle herunterreguliert, um die Wirtszellimmunantwort zu reduzieren (Shen and Higgins, 2006). Dennoch gibt es einige wenige Listerienstämme, welche auch bei 37°C noch eine ausreichende Menge Flagellin exprimieren, um eine TLR5-vermittelte Aktivierung von NF-κB zu induzieren (Way et al., 2004). Für einen solchen Stamm (L. monocytogenes 10403s) wurde die Beteiligung von NIrc4 an der Caspase-1-Aktivierung und IL-1β-Sekretion in Mausmakrophagen gezeigt (Warren et al., 2008). Dahingegen konnte eine andere Arbeitsgruppe mit dem gleichen experimentellen Ansatz keine Beteiligung von NIrc4 an der Listerien-induzierten Caspase-1-Aktivierung nachweisen (Kanneganti et al., 2007; Franchi et al., 2007a). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels RNAi-Experimenten in humanen PBMCs und THP-1 (Daten nicht gezeigt) kein Hinweis auf eine Beteiligung von NLRC4 an der Listerien-induzierten IL-1ß-Produktion erbracht werden. Dieses Ergebnis ist höchstwahrscheinlich der fehlenden Expression von Flagellin bei 37°C des hier verwendeten Stamms L. monocytogenes EGD zuzuschreiben (Way et al., 2004).

Das humane NLRP1 und das murine Homolog Nlrp1b können durch MDP aktiviert werden (Hsu et al., 2008;Bruey et al., 2007;Faustin et al., 2007). Des Weiteren reagiert das murine NIrp1b-Inflammasom auf Anthrax Lethal Toxin (LT) von Bacillus anthracis (Boyden and Dietrich, 2006). Die Aktivierung von Nlrp1b durch LT erfordert Phagozytose von LT, Ansäuerung der LT-haltigen Endosomen die und anschließende Freisetzung von LT in das Zellzytosol. Hierbei involviert sind Cathepsin B und ein K⁺-Efflux/Ca²⁺-Influx (Newman et al., 2009;Wickliffe et al., 2008; Fink et al., 2008). Das Adaptermolekül ASC ist eine optionale Komponente im NLRP1-Inflammasom (Faustin et al., 2007; Martinon et al., 2002). In der Listerieninfektion waren LLO und MDP als NLRP1-Stimuli naheliegend. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unterstützen diese Hypothese jedoch nicht, da anhand der durchgeführten RNAi-Experimente keine wesentliche Beteiligung von NLRP1 an der IL-1ß-Sekretion in Listerien-infizierten humanen PBMCs oder THP-1 (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden konnte. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass ein möglicher Effekt aufgrund eines zu schwachen Knock-Downs von NLRP1 durch RNAi nicht detektiert wird. Dagegen spricht allerdings der deutliche funktionelle Effekt, welcher bei einem vergleichbar effizienten Knock-Down mit der NLRP3-siRNA erzielt wurde.

Der intrazelluläre Rezeptor NOD2 erkennt MDP und initiiert die NF-κB-abhängige Zytokinen. pro-inflammatorischen L. monocytogenes Expression von wird grundsätzlich von dem murinen Nod2 erkannt (Kobayashi et al., 2005). In mehreren Publikationen wurde eine positive Regulation der pro-IL-1ß Expression durch Nod2 beschrieben (Hsu et al., 2008;Marina-Garcia et al., 2008;Ferwerda et al., 2008;Pan et al., 2007; Mariathasan et al., 2006). Zusätzlich wurde aber auch eine Bedeutung von NOD2 für die Aktivierung von Caspase-1 beobachtet (Hsu et al., 2008;Ferwerda et al., 2008), wobei in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Bildung eines Nod2-NIrp1b Komplexes nach Stimulation mit MDP oder Infektion mit Bacillus anthracis in Mausmakrophagen postuliert wurde (Hsu et al., 2008). Trotz dieser Hinweise auf eine mögliche Rolle von NOD2 in der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion, verursachte der Knock-Down von NOD2 mit spezifischer siRNA in humanen PBMCs oder THP-1 (Daten nicht gezeigt) keine Minderung der IL-1
ß-Produktion nach Infektion mit L. monocytogenes. Da die extrazelluläre Erkennung von *L. monocytogenes* durch TLR2 zu einer NF-κB-vermittelten Expression von pro-IL-1β

führt (Ozoren *et al.*, 2006), kompensiert dieser Signalweg möglicherweise aufgrund von Redundanz eine Beteiligung von NOD2.

Das HIN200-Protein AIM2 ist das bisher einzige Rezeptormolekül, welches nicht zu der NLR-Familie gehört, aber mit Caspase-1 und ASC ein Inflammasom bilden kann. Des Weiteren wurde bislang nur für AIM2 eine direkte Bindung des Liganden dsDNA im Zellzytosol nachgewiesen, durch welche die Bildung des Inflammasoms aktiviert wird (Burckstummer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009; Hornung et al., 2009). In einer früheren Veröffentlichung wurde gezeigt, dass E. coli DNA, virale dsDNA oder die synthetische dsDNA poly(dA:dT), welche in das Zytosol von THP-1 Zellen transfiziert wurde, ein ASC-abhängiges Inflammasom aktiviert (Muruve et al., 2008). Bei diesem Inflammasom handelt es sich vermutlich um das jetzt identifizierte AIM2-Inflammasom. Die Hochregulation der AIM2 mRNA-Expression nach Listerieninfektion ist erklärbar mit der Interferon-Induzierbarkeit von AIM2. Zytosolische L. monocytogenes werden durch einen bislang unbekannten Rezeptor erkannt und induzieren eine TBK1-IRF3-abhängige Expression von IFN-β (O'Connell et al., 2005), wobei listerielle DNA als Ligand für diesen zytosolischen Rezeptor postuliert wurde (Stetson and Medzhitov, 2006). L. monocytogenes kann möglicherweise aktiv DNA in das Wirtszellzytosol absondern (Grillot-Courvalin et al., 2002) oder die DNA könnte bei der Degradation von Listerien in das Zytosol gelangen (Stetson and Medzhitov, 2006). L. monocytogenes DNA im Zytosol könnte induzieren sowie möglicherweise das AIM2-Inflammasom aktivieren. Die Ergebnisse der RNAi-Experimente mit zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen konnten jedoch keine Hinweise auf eine essentielle Bedeutung von AIM2 für die Listerien-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs erbringen. Auch eine Behandlung von humanen PBMCs mit rekombinantem IFN-ß zur Steigerung der AIM2-Expression vor Infektion mit L. monocytogenes führte zu keiner erhöhten IL-1ß-Sekretion (Daten nicht gezeigt).

Überexpressionsstudien mit humanen 293T und COS-7L Zellen demonstrierten, dass NLRP6 und NLRP12 mit ASC interagieren und diese Interaktion zur Aktivierung von NF-κB und Caspase-1 sowie zur Sekretion von IL-1β führt (Grenier *et al.*, 2002;Wang *et al.*, 2002). Dahingegen beschrieb eine andere Arbeitsgruppe die negative Regulierung von NF-κB durch NLRP12 (Williams *et al.*, 2005). Demzufolge könnten NLRP6 und NLRP12 potentiell die NF-κB-induzierte Expression von pro-IL-

 1β und zugleich die Caspase-1-abhängige Prozessierung zu IL- 1β steuern. Die durchgeführten RNAi-Experimente in dieser Arbeit konnten jedoch keinen Hinweis auf eine Regulation der IL- 1β -Produktion durch NLRP6 oder NLRP12 in Listerien-infizierten humanen PBMCs oder THP-1 (Daten nicht gezeigt) erbringen.

Zusammenfassend zeigten die RNAi-Experimente der vorliegenden Arbeit eine essentielle Rolle für NLRP3 in der Listerien-induzierten IL-1β-Freisetzung in humanen Monozyten auf, wohingegen sich keine Hinweise auf eine wesentliche Rolle von NLRC4, NLRP1, NOD2, AIM2, NLRP6 und NLRP12 ergaben. Die essentielle Rolle von NLRP3 in der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion wurde in murinen NIrp3 Knock-Out BMMs bestätigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch eine Stimulation von humanen PBMCs und LPS-vorbehandelten murinen BMMs mit aufgereinigtem LLO zu einer NLRP3-abhängigen IL-1β-Produktion führt.

6.3 Untersuchung der NLRP3-Aktivierung durch *L. monocytogenes*

Nachdem in dieser Arbeit die Abhängigkeit der IL-1β-Produktion in Listerieninfizierten humanen Monozyten von dem listeriellen Virulenzfaktor LLO und den wirtszellseitigen Inflammasom-Komponenten Caspase-1, ASC und NLRP3 aufgezeigt war, wurde die vorliegende Signaltransduktion näher untersucht. Der Mechanismus der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung ist noch unklar. Aufgrund der Fülle an strukturell verschiedenen NLRP3-aktivierenden Stimuli werden in der Literatur derzeit vier Modelle zur möglichen direkten oder indirekten Aktivierung von NLRP3 diskutiert. Diese umfassen die Porenbildung, die Herabsetzung des intrazellulären Kaliumspiegels durch einen K⁺-Efflux, die Freisetzuna von Cathepsin B aus Lysosomen in das Zellzytosol und die Bildung von ROS (reactive oxygen species). Die vier genannten Mechanismen stehen miteinander in Zusammenhang und sind in Abbildung 6-1 veranschaulicht.



Abbildung 6-1: Mögliche Mechanismen der NLRP3-Aktivierung

Verändert nach Pedra et. al. Curr. Opin. Immunol. 2009. 21:1-7.

Die Bedeutung von K⁺-Efflux und Cathepsin B-Freisetzung wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Inhibitor-Experimenten näher untersucht. Im Folgenden werden die möglichen Mechanismen zur NLRP3-Aktivierung im Kontext mit den eigenen Ergebnissen diskutiert.

Das Modell der NLRP3-Aktivierung durch Porenbildung basiert vornehmlich auf der Translokation von PAMPs in das Zellzytosol, steht aber in direktem Zusammenhang mit dem Modell des K⁺-Efflux. Ein K⁺-Efflux entsteht durch den P2X7-Rezeptor, welcher einen Kationenselektiven Ionenkanal in der Zellmembran darstellt und durch Bindung von ATP aktiviert wird. Endogenes ATP wird bei Zellschädigung oder Zellstreß freigesetzt (Petrilli *et al.*, 2007;Cruz *et al.*, 2007;Mariathasan *et al.*, 2006). Des Weiteren können porenbildende Toxine, wie z. B. Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila*, Nigericin aus *Streptomyces hygroscopicus* und Tetanolysin aus *Clostridium tetani*, einen K⁺-Efflux erzeugen, wobei sie den ATP-P2X7R-Ionenkanal umgehen (Chu *et al.*, 2009;Mariathasan *et al.*, 2006;Gurcel *et al.*, 2006;Hentze *et al.*, 2003). Der K⁺-Efflux über die Plasmamembran ermöglicht zugleich einen Ca²⁺-Influx,

welcher wahrscheinlich für die Ausschleusung von IL-1 β notwendig ist (Qu et al., 2007; Andrei et al., 2004). Es wird spekuliert, dass die Herabsetzung des intrazellulären Kaliumspiegels durch den K⁺-Efflux oder die entstehenden osmotischen Veränderungen von NLRP3 als DAMP erkannt werden könnten. Möglicherweise liegt das NLRP3-Inflammasom aber auch in einer inaktiven Form im Zellzytosol vor und wird durch den K⁺-Efflux in eine aktive Form gebracht, welche dann zytosolische PAMPS erkennen kann (Petrilli et al., 2007; Mariathasan et al., 2006). Zytosolische PAMPs können von intrazellulären Bakterien abgesondert werden oder könnten, ähnlich wie über bakterielle Typ III- und Typ IV-Sekretionssysteme, durch Zellmembranporen in das Zellzytosol gelangen. Poren dieser Größe können gebildet werden durch porenbildende Toxine (Mariathasan et al., 2006; Gurcel et al., 2006) oder durch Pannexin-1, welches ein Hemikanalprotein ist und an den ATP-aktivierten P2X7-Rezeptor koppelt (Marina-Garcia et al., 2008;Kanneganti et al., 2007). Im Zytosol könnten die PAMPs direkt das NLRP3-Inflammasom aktivieren sowie über intrazellluläre Rezeptoren eine TLR-unabhängige NF-kB-Aktivierung induzieren (Marina-Garcia et al., 2008;Kanneganti et al., 2007). Bisher wurde gezeigt, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Siliziumkristalle (Cassel et al., 2008), MSU (Dostert et al., 2008; Petrilli et al., 2007), Aluminiumsalze (Eisenbarth et al., 2008;Kool et al., 2008), Asbest (Dostert et al., 2008), Hemozoin (Tiemi et al., 2009) und E. coli (Petrilli et al., 2007) einen K⁺-Efflux erfordert. Zudem aktiviert die Zugabe von exogenem ATP das NLRP3-Inflammasom in Mausmakrophagen nach Stimulation mit vielen extrazellulär applizierten PAMPs (Kanneganti et al., 2007; Franchi et al., 2007a; Mariathasan et al., 2006). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass ein K⁺-Efflux für die IL-1 β -Produktion in Listerien-infizierten humanen PBMCs von Bedeutung ist, da die Hemmung des K⁺-Efflux die Freisetzung von IL-1 β verhinderte. Die IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs und LPS-vorbehandelten murinen BMMs durch Stimulation mit LLO erforderte ebenfalls einen K^+ -Efflux. Es ist bekannt, dass LLO für seine porenbildende Aktivität bei einer Temperatur von 37°C ein Optimum unter pH 5.5 hat (Schuerch et al., 2005). Dennoch kann LLO auch bei neutralem oder leicht basischem pH an cholesterolreiche Membranen binden und in diese Poren bilden (Bavdek et al., 2007). Diese Vermutung unterstützend zeigte eine Studie, dass aufgereinigtes, extrazelluläres LLO Poren in die Plasmamembran von HEK293 Zellen bildet, durch welche es zu einem K⁺-Efflux/Ca²⁺-Influx kommt (Repp *et al.*,

2002). Zusammenfassend ist es somit denkbar, dass LLO in der Listerieninfektion sowie bei extrazellulärer Applikation des aufgereinigten LLO Poren in die Zellmembran bildet, welche einen K⁺-Efflux ermöglichen. *L. monocytogenes*-infizierte Zellen könnten außerdem endogenes ATP freisetzen, welches über P2X7R ebenfalls einen K⁺-Efflux erzeugt. Der K⁺-Efflux könnte das NLRP3-Inflammasom aktivieren oder in eine Konformation bringen, welche intrazelluläre PAMPs detektieren kann. Eine direkte NLRP3-Aktivierung durch LLO oder andere listerielle PAMPs im Zytosol wäre möglich, da L. monocytogenes und LLO durch die LLO-vermittelte Porenbildung im Phagolysosom in das Zellzytosol freigesetzt werden. Auch das extrazellulär applizierte aufgereinigte LLO könnte durch Phagozytose oder die gebildeten Zellmembranporen in das Zellinnere gelangen (Gekara et al., 2008). Die Hypothese einer direkten Erkennung von LLO wird durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit gestützt, welche die Aktivierung von Caspase-1 durch zytosolisches LLO in Mausmakrophagen aufzeigte (Hara et al., 2008). In dieser Studie wurde eine isogene L. monocytogenes Komplementante (L. monocytogenes $\Delta hly::ilo$) eingesetzt, welche (ILO) aus L. ivanovii anstelle von LLO exprimiert. Diese Ivanolvsin O Komplementante kann Wirtszellen mit gleicher Effizienz invadieren, in das Zellzytosol entkommen und sich intrazellulär vermehren wie Wildtyp L. monocytogenes. Nach Infektion von Mausmakrophagen aktivierte die zytosolische L. monocytogenes Δhly ::ilo jedoch kaum Caspase-1 (Hara et al., 2008;Hara et al., 2007). Eine zusätzliche Expression von Wildtyp LLO oder nicht-porenbildendem LLO (trunkiertes LLO Domäne 1-3 oder punktmutiertes LLO W492A) durch L. monocytogenes Δhly :: *ilo* führte dahingegen zu einer deutlichen Caspase-1-Aktivierung. Diese Daten deuten an, dass die Aktivierung von Caspase-1 vornehmlich durch das LLO-Molekül initiiert wird, unabhängig von dessen membranbindender und porenbildender Eigenschaft (Hara et al., 2008). Im Einklang mit dieser Studie wurde LLO als essentieller Faktor für die Induktion von IFN-y in der murinen Listerieninfektion identifiziert. Die Expression von IFN- γ ist indirekt abhängig von Caspase-1, da sie abhängig ist von IL-18, welches von Caspase-1 prozessiert wird. Für die Aktivierung der IFN-γ Antwort ist trunkiertes LLO Domäne 1-3 ausreichend (Bou Ghanem et al., 2009;Hara et al., 2008;Hara et al., 2007;Kimoto et al., 2003;Kohda et al., 2002). Des Weiteren wird seit kurzem die Freisetzung der lysosomalen Protease Cathepsin B aus den Lysosomen in das Zellzytosol als Mechanismus zur NLRP3-

87

Inflammasom-Aktivierung diskutiert. Cathepsin B gelangt durch Permeabilisierung

oder gar Zerstörung der Lysosomen in das Zellzytosol (Tiemi et al., 2009;Hornung et al., 2008;Halle et al., 2008;Hentze et al., 2003). In der Listerieninfektion könnte die Zerstörung des Phagolysosoms durch LLO zu einer Freisetzung von Cathepsin B in das Zytosol führen. Die Bildung von ROS oder intrazelluläre osmotische Veränderungen durch einen K⁺-Efflux könnten ebenfalls zum Verlust der Lysosomenintegrität und zur Freisetzung von Cathepsin B beitragen (Gekara et al., 2007; Fujisawa et al., 2007; Blomgran et al., 2007). Cathepsin B ist involviert in die Aktivierung von NLRP3 in humanen Monozyten oder murinen Makrophagen durch Siliziumkristalle (Hornung et al., 2008), Aluminiumsalze (Sharp et al., 2009;Hornung et al., 2008), Amyloid- β (Halle et al., 2008), Nigericin (Hentze et al., 2003), Tetanolysin (Chu et al., 2009), Influenza A Virus (Allen et al., 2009), Hemozoin (Tiemi et al., 2009), Shigella flexneri (Willingham et al., 2007), Neisseria gonorrhoeae (Duncan et al., 2009), Klebsiella pneumoniae (Willingham et al., 2009) und Candida albicans (Joly et al., 2009). In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit reduzierte die Hemmung von Cathepsin B die L. monocytogenes-induzierte IL-1ß-Produktion in humanen PBMCs und murinen BMMs. Des Weiteren zeigten Konfokalmikroskopie-Experimente infizierten BMMs in nicht murinen ein punktförmiges Erscheinungsbild von Cathepsin B. welches vermutlich einer endolysosomalen Lokalisation entspricht. In Listerien-infizierten Zellen waren diese punktförmigen Ansammlungen dahingegen deutlich reduziert, was eine Freisetzung von Cathepsin B in das Zytosol andeutet. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse vermuten, dass eine LLO-vermittelte Zerstörung des Listerien-haltigen Phagolysosoms Cathepsin B freisetzt, welches direkt oder indirekt von NLRP3 erkannt wird. Darüber hinaus reduzierte die Hemmung das vakuolären H⁺-ATPase Systems mit Bafilomycin A1 die L. monocytogenes-induzierte IL-1β-Produktion in humanen PBMCs. Das vakuoläre H⁺-ATPase System ist notwendig für die Lysosomenansäuerung, die Phagolysosomenverschmelzung und die Aktivierung von lysosomalen Proteasen einschließlich Cathepsin B (Sharp et al., 2009; Hornung et al., 2008). Die Ansäuerung der Phagolysosomen ist aber auch für das Entkommen von L. monocytogenes aus dem Phagosom entscheidend. Bafilomycin A1 verhindert die Freisetzung von L. monocytogenes in das Zytosol (Shaughnessy et al., 2006;Conte et al., 1996). Somit unterstützt dieses Ergebnis die Annahme einer LLO-vermittelten Cathepsin B-Freisetzung durch *L. monocytogenes*. Unter Hemmung der phagolysosomalen Ansäuerung könnte zudem die von L. monocytogenes EGD und

Diskussion

EGD Δhly induzierte Signaltransduktion ähnlich sein. Demgemäß zeigte eine Arbeitsgruppe, dass die Inhibierung der endolysomalen Ansäuerung bei Infektion von Mausmakrophagen mit Wildtyp L. monocytogenes die Aktivierung von Caspase-1 verhindert. Eine Infektion mit LLO-negativen L. monocytogenes bewirkte ebenfalls keine Caspase-1-Aktivierung (Cervantes et al., 2008). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten interessanterweise auch, dass die mIL-1β-Produktion in Cathepsin B-Inhibitor-behandelten und mit EGD-infizierten Wildtyp BMMs etwas stärker war als die mIL-1β-Freisetzung nach Infektion von Wildtyp BMMs mit EGD Δhly oder nach Infektion von NIrp3 Knock-Out BMMs mit EGD. Dieser Befund deutet an, dass in der Listerieninfektion neben der LLO-abhängigen, Cathepsin B-abhängigen NLRP3-Aktivierung möglicherweise zusätzlich eine geringe LLO-abhängige, Cathepsin B-unabhängige NLRP3-Aktivierung bestehen könnte. In der Tat zeigte sich durch Experimente mit aufgereinigtem LLO, dass die NLRP3abhängige IL-1β-Produktion in humanen PBMCs und LPS-vorbehandelten murinen BMMs nach Stimulation mit LLO unabhängig war von Cathepsin B. Dahingegen zeigte eine kürzlich publizierte Studie eine Cathepsin B-abhängige NLRP3-Aktivierung durch das CDC Tetanolysin in Mausmakrophagen (Chu et al., 2009). Zusammengefasst deuten die Cathepsin B-Inhibitor-Ergebnisse mit aufgereinigtem LLO und L. monocytogenes an, dass bei Listerieninfektion wahrscheinlich auch ein LLO-abhängiger, Cathepsin B-unabhängiger Signalweg zur Aktivierung von NLRP3 besteht, in welchem zytosolisches LLO direkt von NLRP3 erkannt wird oder eine LLO-abhängige Porenbildung in der Plasmamembran einen NLRP3-aktivierenden K⁺-Efflux erzeugt.

Die Bildung von ROS ist ein weiterer diskutierter Mechanismus zur Aktivierung von NLRP3, welcher mit allen anderen Modellen in Zusammenhang steht. ROS können in den Mitochondrien oder von der phagozytären NADPH-Oxidase gebildet werden (Cassel *et al.*, 2008;Cruz *et al.*, 2007). Die Entstehung von ROS wird durch zellulären Stress oder Zellschädigung induziert, z. B. durch Phagozytose von PAMPs oder DAMPs (Cassel *et al.*, 2008;Dostert *et al.*, 2008;Cruz *et al.*, 2007), intrazelluläre osmotische Veränderungen durch Ionenfluxe (Cassel *et al.*, 2008;Petrilli *et al.*, 2007;Cruz *et al.*, 2007) oder den Verlust der Lysosomenintegrität (Allen *et al.*, 2009;Dostert *et al.*, 2008). Die Hemmung von ROS verminderte die NLRP3-vermittelte IL-1β Produktion in Reaktion auf Influenza A Virus (Allen *et al.*, 2009), Hemozoin (Tiemi *et al.*, 2009), Asbest (Dostert *et al.*, 2008), Siliziumkristalle (Cassel

et al., 2008), MSU (Dostert *et al.*, 2008;Petrilli *et al.*, 2007) und Aluminiumsalze (Kool *et al.*, 2008). Die Beteiligung von ROS bei der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung durch *L. monocytogenes* ist daher wahrscheinlich, konnte in dieser Arbeit allerdings nicht näher untersucht werden, da der zur Verfügung stehende ROS-Inhibitor das Listerienwachstum hemmte.

6.4 Modell der Listerien-induzierten IL-1β-Produktion

Zusammengefasst ergibt sich aus der aktuellen Literatur und den in dieser Studie erarbeiteten Ergebnissen für die Produktion von IL-1 β in *Listeria monocytogenes*-infizierten humanen Monozyten und murinen Makrophagen folgendes Modell:

Die extrazelluläre Erkennung von L. monocytogenes durch TLR2 induziert die Aktivierung von NF- κ B und führt zur Expression von pro-IL-1 β (Ozoren *et al.*, 2006). Möglicherweise wird auch LLO durch TLR4 erkannt (Park et al., 2004). Obwohl sich in dieser Arbeit kein Hinweis auf eine Beteiligung von NOD2 ergab, könnten NOD1/NOD2 zur pro-IL-1β Expression beitragen, da die Aktivierung von NF-κB durch TLR2 und durch NOD1/NOD2 in der Listerieninfektion möglicherweise redundante Signalwege darstellen. Die Freisetzung von reifem IL-1ß erfordert das NLRP3-Inflammasom, bestehend aus den Komponenten Caspase-1, ASC und NLRP3. Die Aktivierung von NLRP3 ist abhängig von LLO, einem K⁺-Efflux und Cathepsin B. Der K⁺-Efflux könnte entstehen durch LLO, welches Poren in die Zellmembran bildet, oder durch endogenes ATP, welches den P2X7-Rezeptor aktiviert. Das L. monocytogenes-haltige Phagolysosom wird durch LLO zerstört und die Bakterien werden in das Zellzytosol freigesetzt. Vermutlich gelangen hierbei zudem Cathepsin B und LLO in das Zytosol. Cathepsin B und möglicherweise auch LLO scheinen das NLRP3-Inflammasom direkt oder indirekt über einen unbekannten Mediator zu aktivieren. Eine direkte Erkennung von anderen listeriellen PAMPs im Zytosol durch NLRP3 wird durch die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen. Die Bildung von ROS trägt wahrscheinlich ebenfalls zur Aktivierung von NLRP3 in der Listerieninfektion bei (Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008), wurde hier aber nicht näher untersucht. Insgesamt scheint das NLRP3-Inflammasom in der Listerieninfektion durch mehrere Mechanismen aktiviert zu werden. Das hier beschriebene Modell ist in Abbildung 6-2 bildlich veranschaulicht.



Abbildung 6-2: Modell der Listerien-induzierten IL-1 β -Produktion

7 Zusammenfassung

Verschiedene Nod-like Rezeptoren sowie das kürzlich identifizierte HIN200-Protein AIM2 bilden Multiproteinkomplexe, welche als Inflammasome bezeichnet werden. Inflammasome vermitteln die Caspase-1-abhängige Prozessierung von pro-L-1ß und stellen kritische Komponenten des angeborenen Immunsystems dar. Listeria monocytogenes ist ein intrazelluläres Pathogen, welches von Monozyten und Makrophagen phagozytiert wird und mit Hilfe des porenformenden Toxins LLO in das Zellzytosol entkommt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung in humanen Monozyten und murinen Makrophagen nach Infektion mit L. monocytogenes näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass humane Monozyten und murine Makrophagen reifes IL-1ß freisetzen nach Infektion mit L. monocytogenes oder nach Stimulation mit aufgereinigtem LLO. Dahingegen produzierten humane Monozyten nur sehr wenig IL-1^β, wenn sie infiziert wurden mit der avirulenten *L. innocua* oder mit *L. monocytogenes*-Mutanten, welche kein LLO bzw. ein nicht-porenbildendes LLO exprimieren. RNAi- und Inhibitor-Experimente in humanen Monozyten sowie Experimente mit NIrp3 Knock-Out Makrophagen zeigten, dass die IL-1β-Produktion abhängig ist von den Inflammasom-Komponenten Caspase-1, ASC und NLRP3. Dahingegen konnte keine essentielle Bedeutung von NLRC4, NLRP1, NOD2, AIM2, NLRP6 und NLRP12 nachgewiesen Inhibitor-Experimente mit L. monocytogenes-infizierten werden. oder LLOstimulierten humanen Monozyten und murinen Makrophagen zeigten zudem, dass die Listerien-induzierte IL-1 β -Produktion abhängig ist von einem K⁺-Efflux sowie der phagolysosomalen Ansäuerung und Cathepsin B. Zusammenfassend wird das NLRP3-Inflammasom in der Listerieninfektion LLO-abhängig aktiviert. Hauptsächlich scheint eine LLO-vermittelte Phagolysosomenzerstörung und Freisetzung von Cathepsin B das NLRP3-Inflammasom zu stimulieren. Zusätzlich scheint es zu einer Cathepsin B-unabhängigen, möglicherweise direkten Erkennung von LLO durch NLRP3 zu kommen.

8 Literaturverzeichnis

Agostini,L., Martinon,F., Burns,K., McDermott,M.F., Hawkins,P.N., Tschopp,J. (2004). NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. Immunity. *20*, 319-325.

Alberti-Segui, C., Goeden, K.R., Higgins, D.E. (2007). Differential function of Listeria monocytogenes listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. Cell Microbiol. *9*, 179-195.

Allen, I.C., Scull, M.A., Moore, C.B., Holl, E.K., McElvania-TeKippe, E., Taxman, D.J., Guthrie, E.H., Pickles, R.J., Ting, J.P. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. Immunity. *30*, 556-565.

Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., Rubartelli, A. (2004). Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *101*, 9745-9750.

Bavdek,A., Gekara,N.O., Priselac,D., Gutierrez,A., I, Darji,A., Chakraborty,T., Macek,P., Lakey,J.H., Weiss,S., Anderluh,G. (2007). Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of Listeriolysin O. Biochemistry *46*, 4425-4437.

Blomgran,R., Zheng,L., Stendahl,O. (2007). Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. J.Leukoc.Biol. *81*, 1213-1223.

Bou Ghanem,E.N., McElroy,D.S., D'Orazio,S.E. (2009). Multiple mechanisms contribute to the robust rapid gamma interferon response by CD8+ T cells during Listeria monocytogenes infection. Infect.Immun. 77, 1492-1501.

Boyden, E.D., Dietrich, W.F. (2006). Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. Nat Genet. *38*, 240-244.

Bruey, J.M., Bruey-Sedano, N., Luciano, F., Zhai, D., Balpai, R., Xu, C., Kress, C.L., Bailly-Maitre, B., Li, X., Osterman, A., Matsuzawa, S., Terskikh, A.V., Faustin, B., Reed, J.C. (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. Cell *129*, 45-56.

Bruey, J.M., Bruey-Sedano, N., Newman, R., Chandler, S., Stehlik, C., Reed, J.C. (2004). PAN1/NALP2/PYPAF2, an inducible inflammatory mediator that regulates NF-kappaB and caspase-1 activation in macrophages. J.Biol.Chem. 279, 51897-51907.

Burckstummer, T., Baumann, C., Bluml, S., Dixit, E., Durnberger, G., Jahn, H., Planyavsky, M., Bilban, M., Colinge, J., Bennett, K.L., Superti-Furga, G. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. Nat Immunol.

Case,C.L., Shin,S., Roy,C.R. (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to Legionella pneumophila. Infect.Immun. 77, 1981-1991.

Cassel,S.L., Eisenbarth,S.C., Iyer,S.S., Sadler,J.J., Colegio,O.R., Tephly,L.A., Carter,A.B., Rothman,P.B., Flavell,R.A., Sutterwala,F.S. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *105*, 9035-9040.

Cervantes, J., Nagata, T., Uchijima, M., Shibata, K., Koide, Y. (2008). Intracytosolic Listeria monocytogenes induces cell death through caspase-1 activation in murine macrophages. Cell Microbiol. *10*, 41-52.

Chin,A.I., Dempsey,P.W., Bruhn,K., Miller,J.F., Xu,Y., Cheng,G. (2002). Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. Nature *416*, 190-194.

Chu,J., Thomas,L.M., Watkins,S.C., Franchi,L., Nunez,G., Salter,R.D. (2009). Cholesteroldependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1 beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner. J.Leukoc.Biol.

Conte,M.P., Petrone,G., Longhi,C., Valenti,P., Morelli,R., Superti,F., Seganti,L. (1996). The effects of inhibitors of vacuolar acidification on the release of Listeria monocytogenes from phagosomes of Caco-2 cells. J.Med.Microbiol. *44*, 418-424.

Conti,B.J., Davis,B.K., Zhang,J., O'connor,W., Jr., Williams,K.L., 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.

Cossart, P., Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. Science *304*, 242-248.

Cruz,C.M., Rinna,A., Forman,H.J., Ventura,A.L., Persechini,P.M., Ojcius,D.M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. J.Biol.Chem. *282*, 2871-2879.

Darji,A., Chakraborty,T., Niebuhr,K., Tsonis,N., Wehland,J., Weiss,S. (1995). Hyperexpression of listeriolysin in the nonpathogenic species Listeria innocua and high yield purification. J.Biotechnol. *43*, 205-212.

Dinarello,C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu.Rev.Immunol. *27*, 519-550.

Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T., Tschopp, J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. Science *320*, 674-677.

Duncan, J.A., Gao, X., Huang, M.T., O'Connor, B.P., Thomas, C.E., Willingham, S.B., Bergstralh, D.T., Jarvis, G.A., Sparling, P.F., Ting, J.P. (2009). Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. J.Immunol. *182*, 6460-6469.

Edelson,B.T., Unanue,E.R. (2002). MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to Listeria: no role for either in macrophage listericidal activity. J.Immunol. *169*, 3869-3875.

Eisenbarth,S.C., Colegio,O.R., O'Connor,W., Sutterwala,F.S., Flavell,R.A. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. Nature *453*, 1122-1126.

Faustin,B., Lartigue,L., Bruey,J.M., Luciano,F., Sergienko,E., Bailly-Maitre,B., Volkmann,N., Hanein,D., Rouiller,I., Reed,J.C. (2007). Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. Mol.Cell *25*, 713-724.

Fernandes-Alnemri, T., Yu, J.W., Datta, P., Wu, J., Alnemri, E.S. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. Nature.

Ferwerda,G., Kramer,M., de Jong,D., Piccini,A., Joosten,L.A., Devesaginer,I., Girardin,S.E., Adema,G.J., van der Meer,J.W., Kullberg,B.J., Rubartelli,A., Netea,M.G. (2008). Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1beta mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1beta. Eur.J.Immunol. *38*, 184-191.

Fink,S.L., Bergsbaken,T., Cookson,B.T. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *105*, 4312-4317.

Fiorentino,L., Stehlik,C., Oliveira,V., Ariza,M.E., Godzik,A., Reed,J.C. (2002). A novel PAADcontaining protein that modulates NF-kappa B induction by cytokines tumor necrosis factoralpha and interleukin-1beta. J.Biol.Chem. *277*, 35333-35340.

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., Nunez,G. (2006). Cytosolic flagellin requires lpaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. Nat Immunol *7*, 576-582.

Franchi,L., Kanneganti,T.D., Dubyak,G.R., Nunez,G. (2007a). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K+ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. J Biol Chem 282, 18810-18818.

Franchi,L., Stoolman,J., Kanneganti,T.D., Verma,A., Ramphal,R., Nunez,G. (2007b). Critical role for Ipaf in Pseudomonas aeruginosa-induced caspase-1 activation. Eur.J.Immunol. *37*, 3030-3039.

Fujisawa,A., Kambe,N., Saito,M., Nishikomori,R., Tanizaki,H., Kanazawa,N., Adachi,S., Heike,T., Sagara,J., Suda,T., Nakahata,T., Miyachi,Y. (2007). Disease-associated mutations in CIAS1 induce cathepsin B-dependent rapid cell death of human THP-1 monocytic cells. Blood *109*, 2903-2911.

Geijtenbeek, T.B., Gringhuis, S.I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. Nat.Rev.Immunol. *9*, 465-479.

Gekara,N.O., Dietrich,N., Lyszkiewicz,M., Lienenklaus,S., Weiss,S. (2009). Signals triggered by a bacterial pore-forming toxin contribute to toll-like receptor redundancy in gram-positive bacterial recognition. J.Infect.Dis. *199*, 124-133.

Gekara,N.O., Groebe,L., Viegas,N., Weiss,S. (2008). Listeria monocytogenes desensitizes immune cells to subsequent Ca2+ signaling via listeriolysin O-induced depletion of intracellular Ca2+ stores. Infect.Immun. *76*, 857-862.

Gekara,N.O., Westphal,K., Ma,B., Rohde,M., Groebe,L., Weiss,S. (2007). The multiple mechanisms of Ca2+ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of Listeria monocytogenes. Cell Microbiol. *9*, 2008-2021.

Grenier, J.M., Wang, L., Manji, G.A., Huang, W.J., Al Garawi, A., Kelly, R., Carlson, A., Merriam, S., Lora, J.M., Briskin, M., DiStefano, P.S., Bertin, J. (2002). Functional screening of five PYPAF family members identifies PYPAF5 as a novel regulator of NF-kappaB and caspase-1. FEBS Lett *530*, 73-78.

Grillot-Courvalin, C., Goussard, S., Courvalin, P. (2002). Wild-type intracellular bacteria deliver DNA into mammalian cells. Cell Microbiol. *4*, 177-186.

Gurcel,L., Abrami,L., Girardin,S., Tschopp,J., van der Goot,F.G. (2006). Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. Cell *126*, 1135-1145.

Halle,A., Hornung,V., Petzold,G.C., Stewart,C.R., Monks,B.G., Reinheckel,T., Fitzgerald,K.A., Latz,E., Moore,K.J., Golenbock,D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol *9*, 857-865.

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P. (2006). Listeria monocytogenes: a multifaceted model. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 423-434.

Hara,H., Kawamura,I., Nomura,T., Tominaga,T., Tsuchiya,K., Mitsuyama,M. (2007). Cytolysin-dependent escape of the bacterium from the phagosome is required but not sufficient for induction of the Th1 immune response against Listeria monocytogenes infection: distinct role of Listeriolysin O determined by cytolysin gene replacement. Infect.Immun. *75*, 3791-3801.

Hara,H., Tsuchiya,K., Nomura,T., Kawamura,I., Shoma,S., Mitsuyama,M. (2008). Dependency of caspase-1 activation induced in macrophages by Listeria monocytogenes on cytolysin, listeriolysin O, after evasion from phagosome into the cytoplasm. J.Immunol. *180*, 7859-7868.

Hentze,H., Lin,X.Y., Choi,M.S., Porter,A.G. (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. Cell Death.Differ. *10*, 956-968.

Hornung,V., Ablasser,A., Charrel-Dennis,M., Bauernfeind,F., Horvath,G., Caffrey,D.R., Latz,E., Fitzgerald,K.A. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature.

Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol *9*, 847-856.

Hsu,L.C., Ali,S.R., McGillivray,S., Tseng,P.H., Mariathasan,S., Humke,E.W., Eckmann,L., Powell,J.J., Nizet,V., Dixit,V.M., Karin,M. (2008). A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to Bacillus anthracis infection and muramyl dipeptide. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 7803-7808.

Ishii,K.J., Kawagoe,T., Koyama,S., Matsui,K., Kumar,H., Kawai,T., Uematsu,S., Takeuchi,O., Takeshita,F., Coban,C., Akira,S. (2008). TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. Nature *451*, 725-729.

Janeway, C.A., Jr., Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20, 197-216.

Joly,S., Ma,N., Sadler,J.J., Soll,D.R., Cassel,S.L., Sutterwala,F.S. (2009). Cutting Edge: Candida albicans Hyphae Formation Triggers Activation of the NIrp3 Inflammasome. J.Immunol.

Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M., Kim, Y.G., Chen, G., Park, J.H., Franchi, L., Vandenabeele, P., Nunez, G. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. Immunity. *26*, 433-443.

Kawai, T., Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int.Immunol. *21*, 317-337.

Kayal,S., Lilienbaum,A., Join-Lambert,O., Li,X., Israel,A., Berche,P. (2002). Listeriolysin O secreted by Listeria monocytogenes induces NF-kappaB signalling by activating the IkappaB kinase complex. Mol.Microbiol. *44*, 1407-1419.

Kayal,S., Lilienbaum,A., Poyart,C., Memet,S., Israel,A., Berche,P. (1999). Listeriolysin Odependent activation of endothelial cells during infection with Listeria monocytogenes: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. Mol.Microbiol. *31*, 1709-1722.

Kim,Y.G., Park,J.H., Shaw,M.H., Franchi,L., Inohara,N., Nunez,G. (2008). The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. Immunity. *28*, 246-257.

Kimoto, T., Kawamura, I., Kohda, C., Nomura, T., Tsuchiya, K., Ito, Y., Watanabe, I., Kaku, T., Setianingrum, E., Mitsuyama, M. (2003). Differences in gamma interferon production induced by listeriolysin O and ivanolysin O result in different levels of protective immunity in mice infected with Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii. Infect. Immun. *71*, 2447-2454.

Kinoshita,T., Wang,Y., Hasegawa,M., Imamura,R., Suda,T. (2005). PYPAF3, a PYRINcontaining APAF-1-like protein, is a feedback regulator of caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion. J.Biol.Chem. *280*, 21720-21725.

Kleinnijenhuis, J., Joosten, L.A., van de Veerdonk, F.L., Savage, N., van Crevel, R., Kullberg, B.J., van, d., V, Ottenhoff, T.H., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., Netea, M.G. (2009). Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1beta production by Mycobacterium tuberculosis. Eur.J.Immunol. *39*, 1914-1922.

Kobayashi,K.S., Chamaillard,M., Ogura,Y., Henegariu,O., Inohara,N., Nunez,G., Flavell,R.A. (2005). Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science *307*, 731-734.

Kohda,C., Kawamura,I., Baba,H., Nomura,T., Ito,Y., Kimoto,T., Watanabe,I., Mitsuyama,M. (2002). Dissociated linkage of cytokine-inducing activity and cytotoxicity to different domains of listeriolysin O from Listeria monocytogenes. Infect.Immun. *70*, 1334-1341.

Kool,M., Petrilli,V., De Smedt,T., Rolaz,A., Hammad,H., van Nimwegen,M., Bergen,I.M., Castillo,R., Lambrecht,B.N., Tschopp,J. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. J.Immunol. *181*, 3755-3759.

Labow, M., Shuster, D., Zetterstrom, M., Nunes, P., Terry, R., Cullinan, E.B., Bartfai, T., Solorzano, C., Moldawer, L.L., Chizzonite, R., McIntyre, K.W. (1997). Absence of IL-1 signaling and reduced inflammatory response in IL-1 type I receptor-deficient mice. J.Immunol. *159*, 2452-2461.

Le Bourhis, L., Benko, S., Girardin, S.E. (2007). Nod1 and Nod2 in innate immunity and human inflammatory disorders. Biochem.Soc.Trans. *35*, 1479-1484.

Lightfield,K.L., Persson,J., Brubaker,S.W., Witte,C.E., von Moltke,J., Dunipace,E.A., Henry,T., Sun,Y.H., Cado,D., Dietrich,W.F., Monack,D.M., Tsolis,R.M., Vance,R.E. (2008). Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. Nat.Immunol. *9*, 1171-1178.

Lippmann,J., Rothenburg,S., Deigendesch,N., Eitel,J., Meixenberger,K., van,L., V, Slevogt,H., N'guessan,P.D., Hippenstiel,S., Chakraborty,T., Flieger,A., Suttorp,N., Opitz,B. (2008). IFNbeta responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). Cell Microbiol. *10*, 2579-2588.

Machata,S., Tchatalbachev,S., Mohamed,W., Jansch,L., Hain,T., Chakraborty,T. (2008). Lipoproteins of Listeria monocytogenes are critical for virulence and TLR2-mediated immune activation. J Immunol *181*, 2028-2035.

Mariathasan,S., Weiss,D.S., Newton,K., McBride,J., O'Rourke,K., Roose-Girma,M., Lee,W.P., Weinrauch,Y., Monack,D.M., Dixit,V.M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. Nature *440*, 228-232.

Marina-Garcia, N., Franchi, L., Kim, Y.G., Miller, D., McDonald, C., Boons, G.J., Nunez, G. (2008). Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. J.Immunol. *180*, 4050-4057.

Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., Tschopp, J. (2004). Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. Curr Biol *14*, 1929-1934.

Martinon, F., Burns, K., Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of prolL-beta. Mol.Cell *10*, 417-426.

Martinon, F., Mayor, A., Tschopp, J. (2009). The inflammasomes: guardians of the body. Annu. Rev. Immunol. *27*, 229-265.

Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., Tschopp, J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. Nature *440*, 237-241.

Matzinger, P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. Science 296, 301-305.

Miao,E.A., Alpuche-Aranda,C.M., Dors,M., Clark,A.E., Bader,M.W., Miller,S.I., Aderem,A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. Nat Immunol *7*, 569-575.

Miao,E.A., Ernst,R.K., Dors,M., Mao,D.P., Aderem,A. (2008). Pseudomonas aeruginosa activates caspase 1 through Ipaf. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *105*, 2562-2567.

Michel, E., Reich, K.A., Favier, R., Berche, P., Cossart, P. (1990). Attenuated mutants of the intracellular bacterium Listeria monocytogenes obtained by single amino acid substitutions in listeriolysin O. Mol.Microbiol. *4*, 2167-2178.

Mosa,A., Trumstedt,C., Eriksson,E., Soehnlein,O., Heuts,F., Janik,K., Klos,A., Dittrich-Breiholz,O., Kracht,M., Hidmark,A., Wigzell,H., Rottenberg,M.E. (2009). Non-hematopoietic cells control the outcome of infection with Listeria monocytogenes in a NOD1-dependent manner. Infect.Immun.

Muruve,D.A., Petrilli,V., Zaiss,A.K., White,L.R., Clark,S.A., Ross,P.J., Parks,R.J., Tschopp,J. (2008). The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. Nature *452*, 103-107.

Netea,M.G., Nold-Petry,C.A., Nold,M.F., Joosten,L.A., Opitz,B., van der Meer,J.H., van de Veerdonk,F.L., Ferwerda,G., Heinhuis,B., Devesa,I., Funk,C.J., Mason,R.J., Kullberg,B.J., Rubartelli,A., van der Meer,J.W., Dinarello,C.A. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. Blood *113*, 2324-2335.

Newman,Z.L., Leppla,S.H., Moayeri,M. (2009). CA-074Me protection against anthrax lethal toxin. Infect.Immun.

Nishibori,T., Xiong,H., Kawamura,I., Arakawa,M., Mitsuyama,M. (1996). Induction of cytokine gene expression by listeriolysin O and roles of macrophages and NK cells. Infect.Immun. *64*, 3188-3195.

Nour,A.M., Yeung,Y.G., Santambrogio,L., Boyden,E.D., Stanley,E.R., Brojatsch,J. (2009). Anthrax lethal toxin triggers the formation of a membrane-associated inflammasome complex in murine macrophages. Infect.Immun. 77, 1262-1271.

O'Connell,R.M., Vaidya,S.A., Perry,A.K., Saha,S.K., Dempsey,P.W., 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., Portnoy,D.A. (2002). Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 13861-13866.

Opitz,B., Puschel,A., Beermann,W., Hocke,A.C., Forster,S., Schmeck,B., van,L., V, Chakraborty,T., Suttorp,N., Hippenstiel,S. (2006). 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.

Ozoren,N., Masumoto,J., Franchi,L., Kanneganti,T.D., Body-Malapel,M., Erturk,I., Jagirdar,R., Zhu,L., Inohara,N., Bertin,J., Coyle,A., Grant,E.P., Nunez,G. (2006). Distinct roles of TLR2 and the adaptor ASC in IL-1beta/IL-18 secretion in response to Listeria monocytogenes. J.Immunol. *176*, 4337-4342.

Palm,N.W., Medzhitov,R. (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. Immunol.Rev. 227, 221-233.

Pan,Q., Mathison,J., Fearns,C., Kravchenko,V.V., Da Silva,C.J., Hoffman,H.M., Kobayashi,K.S., Bertin,J., Grant,E.P., Coyle,A.J., Sutterwala,F.S., Ogura,Y., Flavell,R.A., Ulevitch,R.J. (2007). MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3. J.Leukoc.Biol. *82*, 177-183.

Park, J.H., Kim, Y.G., McDonald, C., Kanneganti, T.D., Hasegawa, M., Body-Malapel, M., Inohara, N., Nunez, G. (2007). RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. J.Immunol. *178*, 2380-2386.

Park, J.M., Ng, V.H., Maeda, S., Rest, R.F., Karin, M. (2004). Anthrolysin O and other grampositive cytolysins are toll-like receptor 4 agonists. J.Exp.Med. 200, 1647-1655.

Petrilli,V., Papin,S., Dostert,C., Mayor,A., Martinon,F., Tschopp,J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. Cell Death Differ *14*, 1583-1589.

Qu,Y., Franchi,L., Nunez,G., Dubyak,G.R. (2007). Nonclassical IL-1 beta secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. J.Immunol. *179*, 1913-1925.

Radtke,A.L., O'Riordan,M.X. (2006). Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. Cell Microbiol. *8*, 1720-1729.

Repp,H., Pamukci,Z., Koschinski,A., Domann,E., Darji,A., Birringer,J., Brockmeier,D., Chakraborty,T., Dreyer,F. (2002). Listeriolysin of Listeria monocytogenes forms Ca2+-permeable pores leading to intracellular Ca2+ oscillations. Cell Microbiol. *4*, 483-491.

Rose, F., Zeller, S.A., Chakraborty, T., Domann, E., Machleidt, T., Kronke, M., Seeger, W., Grimminger, F., Sibelius, U. (2001). Human endothelial cell activation and mediator release in response to Listeria monocytogenes virulence factors. Infect.Immun. *69*, 897-905.

Schnupf,P., Portnoy,D.A. (2007). Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. Microbes.Infect. *9*, 1176-1187.

Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M., Tweten, R.K. (2005). Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *102*, 12537-12542.

Seki,E., Tsutsui,H., Tsuji,N.M., Hayashi,N., Adachi,K., Nakano,H., Futatsugi-Yumikura,S., Takeuchi,O., Hoshino,K., Akira,S., Fujimoto,J., Nakanishi,K. (2002). Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of Listeria monocytogenes in mice. J.Immunol. *169*, 3863-3868.

Sharp,F.A., Ruane,D., Claass,B., Creagh,E., Harris,J., Malyala,P., Singh,M., O'Hagan,D.T., Petrilli,V., Tschopp,J., O'Neill,L.A., Lavelle,E.C. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *106*, 870-875.

Shaughnessy,L.M., Hoppe,A.D., Christensen,K.A., Swanson,J.A. (2006). Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in Listeria monocytogenes vacuoles. Cell Microbiol. *8*, 781-792.

Shen,A., Higgins,D.E. (2005). The 5' untranslated region-mediated enhancement of intracellular listeriolysin O production is required for Listeria monocytogenes pathogenicity. Mol.Microbiol. *57*, 1460-1473.

Shen,A., Higgins,D.E. (2006). The MogR transcriptional repressor regulates nonhierarchal expression of flagellar motility genes and virulence in Listeria monocytogenes. PLoS.Pathog. *2*, e30.

Stetson,D.B., Medzhitov,R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3dependent innate immune response. Immunity. *24*, 93-103.

Strieter, R.M. (2002). Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol *283*, L688-L689.

Sutterwala,F.S., Mijares,L.A., Li,L., Ogura,Y., Kazmierczak,B.I., Flavell,R.A. (2007). Immune recognition of Pseudomonas aeruginosa mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. J Exp Med *204*, 3235-3245.

Suzuki,T., Franchi,L., Toma,C., Ashida,H., Ogawa,M., Yoshikawa,Y., Mimuro,H., Inohara,N., Sasakawa,C., Nunez,G. (2007). Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages. PLoS Pathog *3*, e111.

Takaoka,A., Wang,Z., Choi,M.K., Yanai,H., Negishi,H., Ban,T., Lu,Y., Miyagishi,M., Kodama,T., Honda,K., Ohba,Y., Taniguchi,T. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. Nature *448*, 501-505.

Tiemi,S.M., Eisenbarth,S.C., Savaria,M., Vinet,A.F., Bellemare,M.J., Harder,K.W., Sutterwala,F.S., Bohle,D.S., Descoteaux,A., Flavell,R.A., Olivier,M. (2009). Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. PLoS.Pathog. *5*, e1000559.

Tilney,L.G., Portnoy,D.A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, Listeria monocytogenes. J Cell Biol *109*, 1597-1608.

Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V.J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B., Erard, F. (2004). Toll-like receptor 2 is required for optimal control of Listeria monocytogenes infection. Infect Immun 72, 2131-2139. Tsuji,N.M., Tsutsui,H., Seki,E., Kuida,K., Okamura,H., Nakanishi,K., Flavell,R.A. (2004). Roles of caspase-1 in Listeria infection in mice. Int.Immunol. *16*, 335-343.

van de Veerdonk, F.L., Joosten, L.A., Devesa, I., Mora-Montes, H.M., Kanneganti, T.D., Dinarello, C.A., van der Meer, J.W., Gow, N.A., Kulberg, B.J., Netea, M.G. (2009). Bypassing Pathogen-Induced Inflammasome Activation for the Regulation of Interleukin-1beta Production by the Fungal Pathogen Candida albicans. J.Infect. Dis.

Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin.Microbiol.Rev. *14*, 584-640.

Vinzing,M., Eitel,J., Lippmann,J., Hocke,A.C., Zahlten,J., Slevogt,H., N'guessan,P.D., Gunther,S., Schmeck,B., Hippenstiel,S., Flieger,A., Suttorp,N., Opitz,B. (2008). NAIP and Ipaf control Legionella pneumophila replication in human cells. J Immunol *180*, 6808-6815.

Wang,L., Manji,G.A., Grenier,J.M., Al Garawi,A., Merriam,S., Lora,J.M., Geddes,B.J., Briskin,M., DiStefano,P.S., Bertin,J. (2002). PYPAF7, a novel PYRIN-containing Apaf1-like protein that regulates activation of NF-kappa B and caspase-1-dependent cytokine processing. J Biol Chem 277, 29874-29880.

Wang,Y., Hasegawa,M., Imamura,R., Kinoshita,T., Kondo,C., Konaka,K., Suda,T. (2004). PYNOD, a novel Apaf-1/CED4-like protein is an inhibitor of ASC and caspase-1. Int.Immunol. *16*, 777-786.

Wang,Z., Choi,M.K., Ban,T., Yanai,H., Negishi,H., Lu,Y., Tamura,T., Takaoka,A., Nishikura,K., Taniguchi,T. (2008). Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *105*, 5477-5482.

Warren,S.E., Mao,D.P., Rodriguez,A.E., Miao,E.A., Aderem,A. (2008). Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during Listeria monocytogenes infection. J Immunol *180*, 7558-7564.

Way,S.S., Thompson,L.J., Lopes,J.E., Hajjar,A.M., Kollmann,T.R., Freitag,N.E., Wilson,C.B. (2004). Characterization of flagellin expression and its role in Listeria monocytogenes infection and immunity. Cell Microbiol. *6*, 235-242.

Wickliffe,K.E., Leppla,S.H., Moayeri,M. (2008). Anthrax lethal toxin-induced inflammasome formation and caspase-1 activation are late events dependent on ion fluxes and the proteasome. Cell Microbiol. *10*, 332-343.

Williams,K.L., Lich,J.D., Duncan,J.A., Reed,W., Rallabhandi,P., Moore,C., Kurtz,S., Coffield,V.M., Accavitti-Loper,M.A., Su,L., Vogel,S.N., Braunstein,M., Ting,J.P. (2005). The CATERPILLER protein monarch-1 is an antagonist of toll-like receptor-, tumor necrosis factor alpha-, and Mycobacterium tuberculosis-induced pro-inflammatory signals. J.Biol.Chem. *280*, 39914-39924.

Willingham,S.B., Allen,I.C., Bergstralh,D.T., Brickey,W.J., Huang,M.T., Taxman,D.J., Duncan,J.A., Ting,J.P. (2009). NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMGB1 release via inflammasome-dependent and -independent pathways. J.Immunol. *183*, 2008-2015.

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., 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.

Yoneyama, M., Fujita, T. (2009). RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunol.Rev. 227, 54-65.

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., 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.

9 Anhang

9.1 Publikationsliste

Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan PD, Witzenrath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1β depending on listeriolysin O and NLRP3. *Journal of Immunology* 184:922-930 (2010)

Opitz B, Eitel J, **Meixenberger K**, Suttorp N. Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thrombosis and Haemostasis* 102(6):1103-9 (2009)

Lippmann J, Rothenburg S, Deigendeisch N, Eitel J, **Meixenberger K**, van Laak V, Slevogt H, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Chakraborty T, Flieger A, Suttorp N, Opitz B. IFNβ responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cellular Microbiology* 10(12):2579-2588 (2008)

Schweiger B, Bruns L, **Meixenberger K**. Reassortment between human A(H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism. *Vaccine* 24(44-46):6683-90 (2006)

Schmeck B, Beermann W, van Laak V, Opitz B, Hocke AC, **Meixenberger K**, Eitel J, Chakraborty T, Schmidt G, Barth H, Suttorp N, Hippenstiel S. *Listeria monocytogenes* induced Rac1-dependent signal transduction in endothelial cells. *Biochemical Pharmacology* 72(11):1367-1374 (2006)

9.2 Kongressbeiträge

Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. Mechanism of inflammasome activation in *L. monocytogenes*-infected human monocytes. 2nd European Congress of Immunology. Berlin, 13.-16. September 2009.

9.3 Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin realisieren zu können, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Norbert Suttorp bedanken.

Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty danke ich für die Bereitstellung der Listerienmutanten sowie des aufgereinigten LLO und Herrn Prof. Dr. Jürg Tschopp danke ich für die Bereitstellung der NIrp3 Knock-Out BMMs.

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Bastian Opitz bedanke ich mich herzlich für die Vergabe dieses hochaktuellen Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die Erstellung des Erstgutachtens.

Für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors!

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern Georg und Karin für die zuverlässige Unterstützung in allen Lebenslagen sowie bei Michael für seine Geduld und seinen Zuspruch.

9.4 Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.
9.5 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Karolin Meixenberger, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Mechanismen der Inflammasom-Aktivierung durch *Listeria monocytogenes*, selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 07.09.2009

Karolin Meixenberger