

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

DISSERTATION

Differentielle Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch
Pneumolysin

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Florence Pache
aus Köln

Datum der Promotion: 05. Dezember 2014

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	2
1.1 Abbildungsverzeichnis	4
1.2 Tabellenverzeichnis	5
1.3 Abkürzungsverzeichnis	6
2 Zusammenfassung	8
3 Abstract	10
4 Einleitung	12
4.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
4.1.1 Pneumolysin	14
4.2 Angeborene und erworbene Immunität	16
4.3 Rezeptoren der angeborenen Immunität	17
4.3.1 Toll-like Rezeptoren	17
4.3.2 NLRs	18
4.3.3 AIM2 und andere DNA-Rezeptoren	23
4.4 Zytokine	24
4.4.1 IL-1 β	24
4.5 Bedeutung der angeborenen Immunität in der <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Infektion	25
5 Aufgabenstellung	27
6 Methodik	28
6.1 Zellbiologische Methoden	28
6.1.1 Materialien	28
6.1.2 Zellkultur	28
6.1.3 RNA-Interferenz	32
6.2 Mikrobiologische Methoden	33
6.2.1 Bakterienkultur	33
6.2.2 Lagerung und Anzucht	34
6.2.3 Zellstimulation	34
6.2.4 Chemische Inhibitoren	35
6.2.5 Stimulantien	35
6.2.6 Hämolysetest	36
6.3 Molekularbiologische Methoden	37
6.3.1 RNA-Isolierung	37
6.3.2 Reverse Transkription (RT)	37

6.3.3	Quantitative PCR.....	37
6.4	Biochemische Methoden	38
6.4.1	Enzyme linked immunosorbend assay (ELISA)	38
6.4.2	Western blot.....	38
6.5	Statistik.....	41
7	Ergebnisse	42
7.1	Die Pneumokokken-induzierte IL-1 β -Ausschüttung in monozytären Zellen ist abhängig vom bakteriellen Toxin Pneumolysin	42
7.2	Die Pneumokokken-induzierte IL-1 β -Ausschüttung ist abhängig von der Expression eines vollständigen Poren-bildenden Pneumolysins.....	44
7.3	Nicht-hämolytisches Ply exprimierende Serotyp 1 ST306- und Serotyp 8 ST53-Pneumokokken stimulieren keine IL-1 β -Produktion	47
7.4	Die IL-1 β -Produktion in <i>S. pneumoniae</i> -infizierten Zellen ist abhängig von TLR2, NLRP3 und dem Adaptermolekül ASC.....	50
7.5	Die IL-1 β -Produktion in PBMCs nach <i>S. pneumoniae</i> -Infektion ist abhängig von dem Caspase-1-abhängigen NLRP3-Inflammasom.....	52
7.6	Die IL-1 β - Produktion in mit Pneumokokken infizierten monozytären Zellen ist abhängig von K ⁺ -Effluxund reaktiven Sauerstoffspezies.....	54
8	Diskussion.....	56
8.1	Bedeutung des Pneumolysins in der IL-1 β -Produktion durch monozytäre Zellen	56
8.2	Die Rolle des NLRP3-Inflammsoms in der <i>S.pneumoniae</i> -vermittelten IL-1 β -Produktion.....	57
8.3	Die Aktivierung von NLRP3 durch Pneumolysin.....	60
8.4	Die Bedeutung von Pneumolysin-Mutanten und verschiedenen Pneumokokken-Serotypen in der Aktivierung von NLRP3 und Ausblick	63
9	Literaturverzeichnis	67
10	Eidesstattliche Versicherung	86
11	Lebenslauf	88
12	Publikationsliste.....	90
13	Danksagung.....	91

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	Zusammenfassender Mechanismus der Ply-induzierten NLRP3-abhängigen IL-1 β -Produktion	9
Abbildung 3-1	Resuming figure demonstrating the suggested mechanism of Ply-induced NLRP3-dependent IL-1 β production upon infection of macrophages by <i>S. pneumonia</i>	11
Abbildung 4-1:	Domänen-Struktur der Inflammasome	20
Abbildung 4-2	Inflammasome und ihre Stimuli	22
Abbildung 7-1-1	Die Produktion von IL-1 β in <i>S. pneumoniae</i> infizierten murinen Makrophagen ist abhängig von Ply	43
Abbildung 7-1-2	Die Produktion von IL-1 β in <i>S. pneumoniae</i> infizierten humanen monozytären Zellen ist abhängig von Ply	44
Abbildung 7-2	Vergleich der IL-1 β -Produktion nach Stimulation von humanen PBMCs mit aufgereinigtem Ply aus Revertanten	46
Abbildung 7-3-1	Allel 5-Ply exprimierende Serotyp I ST306 Pneumokokken vermitteln keine IL-1 β -Produktion in humanen monozytären Zellen	48
Abbildung 7-3-2	In murinen Zellen induziert Allel 5-Ply oder Allel 5-Ply exprimierende Pneumokokken keine IL-1 β -Produktion	49
Abbildung 7-4	IL-1 β -Produktion in BMMs ist abhängig von TLR2 und vom NLRP3-Inflammasom	51
Abbildung 7-5	Die IL-1 β -Produktion in humanen PBMCs mit D39-Pneumokokken ist abhängig vom Caspase-1-enthaltendem NLRP3-Inflammasom	53
Abbildung 7-6	Einfluss des intrazellulären Kalium-Milieus, ROS-Bildung und lysosomaler Ansäuerung auf das Inflammasom in der Peumokokken-Infektion	55

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1	NLRs und assoziierte nicht-mikrobielle Erkrankungen	22
Tabelle 6-1	Zellen und Bezugsquellen	28
Tabelle 6-2	Zellkulturmedien	29
Tabelle 6-3	siRNA Sequenzen	33
Tabelle 6-4	Bakterienstämme	33
Tabelle 6-5	Chemische Inhibitoren	35
Tabelle 6-6	Pneumolysin	35
Tabelle 6-7	Reagenzien für Western blot	38
Tabelle 6-8	Materialien für Western blot	40
Tabelle 8-1	Pneumolysin und Inflammasom-Aktivität verschiedener Pneumokokken-Stämme	64

1.3 Abkürzungsverzeichnis

AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
BMDM	<i>Bone marrow-derived mouse macrophage</i>
CAP	<i>Community-acquired pneumonia</i>
CAPS	<i>Cryopyrin-associated periodic syndrom</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC	<i>Cholesterol-depending cytolysin</i>
CSF	<i>Colony stimulating factor</i>
DAI	<i>DNA-dependent activator of interferon regulatory factors</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular pattern</i>
DRK	Deutsches rotes Kreuz
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HIN	<i>hematopoietic interferon-inducible nuclear protein</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IPD	<i>Invasive pneumococcal disease</i>
IRF	Interferon-regulierender Faktor
KO	<i>Knock-out</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MyD88	<i>Myloid-differentiation factor 88</i>
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
NFκB	<i>Nuclear transcriptionfactor-κB</i>
NLR	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NLRP3	<i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood monocytic cell</i>

PBP	Penicillin-bindendes Protein
PLY	Pneumolysin
PRR	<i>Pattern-recognition receptor</i>
PYD	N-terminal Pyrin
RPM	<i>Rounds per minute</i>
SG	Serogruppe
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
ST	Sequenz Typ
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
TIR	Toll-Interleukin-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter inducing interferon β</i>
Wt	Wildtyp
ZBP-1	Z-DNA bindendes Protein-1

2 Zusammenfassung

Pneumokokken-Infektionen, wie z.B. Pneumonien, stellen weltweit eine häufige Todesursache dar. Die Interaktion der Pneumokokken mit den Wirtszellen und insbesondere die Mechanismen der Erkennung durch das angeborene Immunsystem sind immer noch nur unvollständig aufgeklärt. Vor dem Hintergrund der weiterhin relativ hohen Mortalität der Pneumokokkeninfektionen sowie der zunehmenden Antibiotika-Resistenz ist ein grundlegendes Verständnis dieser Mechanismen von essentieller Bedeutung.

Am Anfang der Immunantwort gegen Bakterien einschließlich von Pneumokokken steht die Erkennung dieser Bakterien. Erste Zielzellen, die im Rahmen der Pneumokokkeninfektion betroffen sind und für eine frühe Verteidigung des Organismus sorgen, sind Makrophagen. Nachfolgend spielt die Produktion von Zytokinen, unter ihnen IL-1 β , eine wichtige Rolle. IL-1 β ist Schlüsselzytokin der frühen Immunantwort, verantwortlich für die Aktivierung und Regulation weiterer Wirtszellen und Abwehrmechanismen.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, über welche Mechanismen Makrophagen welche Pneumokokkenbestandteile erkennen, um die wichtige IL-1 β -Produktion zu aktivieren.

Es konnte gezeigt werden, dass ausschließlich vollständiges, Poren-bildendes Zytotoxin Pneumolysin zu einer Ausschüttung von reifem IL-1 β führt. Dabei war unerheblich, ob lebende Bakterien oder aufgereinigtes Pneumolysin verwendet wurden. Wichtig hierbei war außerdem, dass unterschiedliche Ply-Varianten dargebracht wurden, die nach derzeitigem Kenntnisstand eine Besonderheit der Pneumokokken innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Bakterien (sehr unterschiedliche immunologische Reaktionen, je nach Ausprägung des Virulenzfaktors Ply) aufzeigt. Auf Seiten des Wirts war für die Prozessierung und Ausschüttung von IL-1 β das Vorhandensein des NLRP3-Inflammasoms essentiell. Sowohl die Entstehung radikaler Sauerstoffspezies, als auch Kalium-Efflux aus dem Intrazellularraum, sind mögliche Mechanismen, die für die Ply-abhängige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ursächlich sein können. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung des Proteinkomplexes NLRP3 eine stark verminderte IL-1 β -Produktion zur Folge hat, ebenso führt eine Aufhebung des Kaliumgradienten sowie der Inhibierung von ROS-Bildung zu einer Inhibierung der IL-1 β -Produktion.

Insgesamt zeigt die Studie, dass dem NLRP3-Inflammasom eine kritische Rolle in der Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β bei einer Infektion mit *S. pneumoniae* zukommt und dass die Expression von hämolytischen Pneumolysins auf Seiten des Bakteriums hierfür notwendig ist. Es wird darüber hinaus die Besonderheit in der Pneumokokkeninfektion gezeigt, dass ein

bakterieller Virulenzfaktor-Polymorphismus zu einer veränderten Bakterien-Erkennung durch das angeborene Immunsystem führt.

Die Abbildung 2-1 bietet eine schematische Übersicht über den Mechanismus der IL-1 β -Produktion in der Infektion von Makrophagen durch *S. pneumoniae* unter der Zusammenfassung der in dieser Arbeit identifizierten Faktoren.

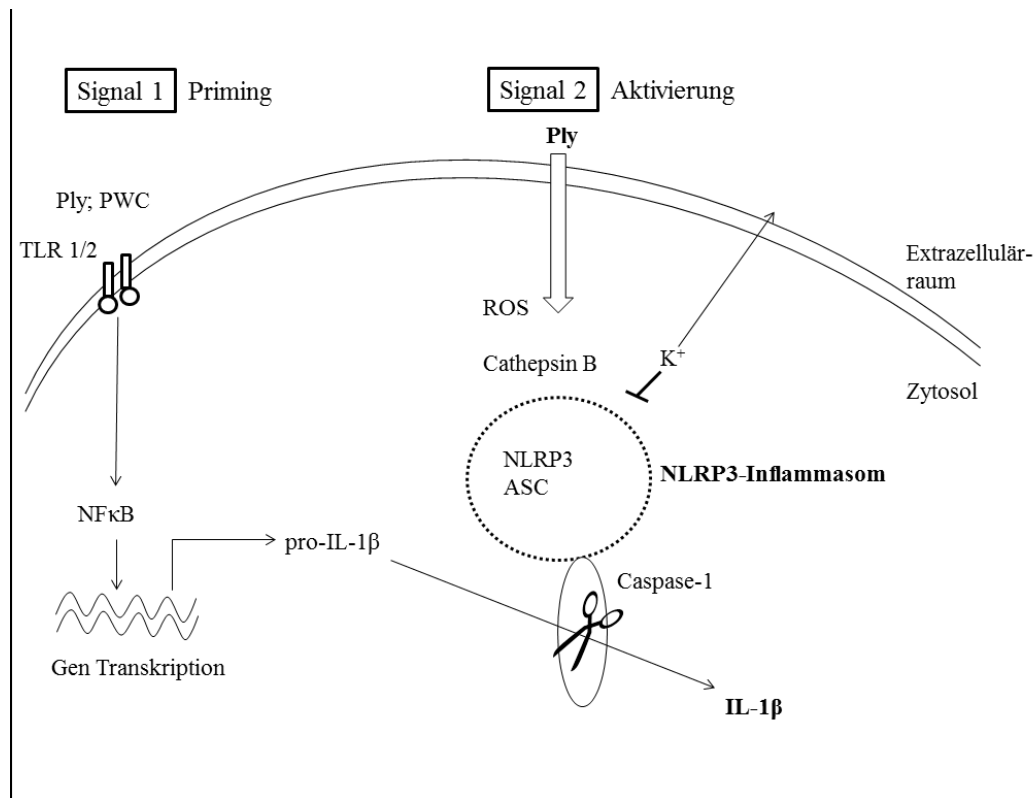


Abbildung 2-1 Zusammenfassung des Mechanismus der Ply-induzierten NLRP3-abhängigen IL-1 β -Produktion in *S. pneumoniae*-infizierten Makrophagen

3 Abstract

Globally infections with *Streptococcus pneumoniae* account for a high mortality and morbidity rate through infectious diseases. Mechanisms of host-pathogen interaction especially routes of pneumococcal recognition via the host's innate immune system are not well understood. Although different vaccinations against pneumococci are available a general protection against all different pneumococcal serotypes is not given. Furthermore increasing resistency of pneumococci towards antibiotic therapy reveals the urgency of a more complete understanding of the pathogen's virulence mechanisms and the host's defense strategy.

For the initiation of the host's immune response a reliable recognition of pathogens is key. Macrophages play a major role in early recognition of pneumococcal infection and thereby provide a first line of defense. Cytokines, notably IL-1 β are produced and secreted subsequently to pathogen recognition. IL-1 β is an important cytokine of the early innate immune system. It both induces the activation of the host's cellular immune response and orchestrates defense mechanisms.

The present dissertation identifies and discusses the key factors of pneumococcal recognition that are used by macrophages in order to activate the production of IL-1 β . Important results presented here are the following: The release of mature IL-1 β is only stimulated by the complete, pore-forming cytotoxine pneumolysine. In this context, it is irrelevant whether living bacteria or cleaned-up pneumolysin are the triggering factor. Furthermore it has to be noted that different ply variants were used as stimuli. By doing so, it could be demonstrated that pneumococci have a special status within the group of Gram-positive bacteria, with different immunological reactions depending on the polymorphism of the virulence factor ply. For the host, the presence of NLRP3-inflammasome was a necessary factor for the processing and release of IL-1 β . The ply-dependent activation of NLRP3 inflammasome turns out to be triggered by the emergence of radical oxygen species, as well as by an efflux of potassium from the intracellular compartment. As a further result, it was demonstrated that the inhibition of the NLRP3 proteine complex provoked a strongly decreased production of IL-1 β . Furthermore, the production of IL-1 β diminished when the protein complex NLRP3 was inhibited. Upon elimination of the potassium gradient or inhibition of ROS production after pneumococcal stimulation of macrophages IL-1 β production was strongly decreased.

As a general result, the dissertation demonstrates that the NLRP3 inflammasome plays an important role for the production of the pro inflammatory cytokine IL-1 β in the context of an infec-

tion with *S. pneumonia* that expresses hemolytic full length pneumolysin. Furthermore, it is demonstrated that in the context of an infection with pneumococci, a bacterial virulence factor polymorphism causes a modified identification of bacteria by the innate immune system. Finally, figure 3-1 gives a schematic overview over the mechanism of the production of IL-1 β in the infection of macrophages with *S. pneumonia*, considering the different relevant factors identified in the present dissertation.

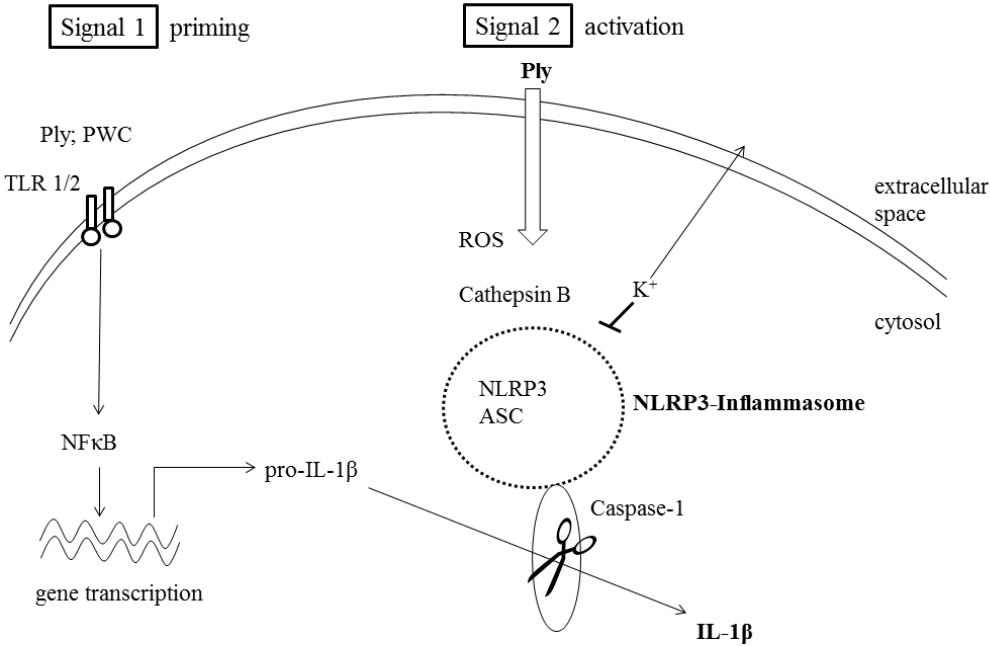


Figure 3-1 Resuming table demonstrating the suggested mechanism of Ply-induced NLRP3-dependent IL-1 β production upon infection of macrophages by *S. pneumoniae*

4 Einleitung

4.1 *Streptococcus pneumoniae*

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae*, auch als Pneumokokke bezeichnet, gehört zu der Familie *Streptococcaceae* und Gattung der Streptokokken. Es kann mikrobiologisch durch seine Größe von 1-3 μm , dem häufigen Vorliegen als Diplokokke, der Optochinsensibilität und der negativen Katalase-Reaktion charakterisiert werden (Henriques-Normark und Tuomanen, 2013). Pneumokokken verursachen eine α -Hämolyse auf Blutagarplatten. Dabei bleiben Erythrozytenmembranen weitgehend intakt, Hämoglobin hingegen wird zu einer biliverdinähnlichen Verbindung reduziert. Nach seiner Antigenstruktur durch unterschiedliche Kapselpolysaccharide können mehr als 90 verschiedene Serotypen eingeteilt werden. Nur einige wenige dieser aktuell 93 Serotypen (Henriques-Normark und Tuomanen, 2013) verursachen den Hauptanteil der Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen (Brueggemann et al., 2007).

Die Übertragung von *S. pneumoniae* erfolgt zumeist aerogen oder über eine Tröpfcheninfektion. Etwa 10% der gesunden Erwachsenen sind nasopharyngeal von Pneumokokken kolonisiert. Bei Kindern liegt der Anteil der gesunden Träger bei etwa 20-40 %. Allerdings kann bei ihnen abhängig von Alter und Umgebung (Kleinkinder, Besuch öffentlicher Kindertagesstätten) der Anteil bis zu 60% betragen (Van der Poll und Opal, 2009). Trotz möglicher lebenslanger gesunder Kolonisation oder spontaner Beseitigung der Besiedelung kann es, meist durch endogene Infektionen, zu Erkrankungen kommen (Kardioglu et al., 2008). Hierzu zählen vor allem Sinusitiden, Otitiden, Pneumonien und die gefürchteten Pneumokokken-Meningitiden sowie Septikämien. Prädisponierende Faktoren des Wirtes sind eine kompromittierte Abwehrlage durch hohes Alter, kardiopulmonale Grundleiden, Diabetes mellitus, Alkoholismus, Asplenie, Komplementdefekte und andere Immundefizienzsyndrome wie HIV oder eine vorausgegangene Infektionen durch Influenza-Viren (Bruyn et al., 1991; Turett et al., 2001, de Roux et al., 2006, Overturf, 2000).

Schon 1881 von Louis Pasteur und George Steinberg isoliert und 1944 von Oswald T. Avery, Colin M. MacLeod und Maclyn McCarty für Versuche zum Nachweis einer Säure als Träger der Erbinformation genutzt (Avery et al., 1944) gehört *S. pneumoniae* bis heute zu den meist untersuchten Bakterien. Dennoch sind viele Phänomene, unter ihnen vor allem die asymptomatische Kolonisierung und invasive Pneumokokken-Infektion sowie die Funktion einiger Virulenzfaktoren, weiterhin wenig verstanden und die Letalität der Pneumokokkeninfektion ist nach wie vor sehr hoch.

Insgesamt werden circa 30 % der ambulant erworbenen Pneumonien (*community acquired pneumonia*= CAP) in Deutschland und weltweit durch *S. pneumoniae* ausgelöst (Pletz et al., 2012). Die Pneumonie stellt in den Industrieländern eine häufige Todesursache dar. In Deutschland liegt die Inzidenz der hospitalisierten CAP-Patienten in den Jahren 2005/ 2006 bei 2,8 pro 1000 Einwohner und ist vor allem in älteren Patienten mit einer hohen frühen Mortalität vergesellschaftet (Ewig et al., 2009). Weltweit ist sie die dritthäufigste Todesursache, wobei hiervon besonders Kinder unter fünf Jahren betroffen sind: Rund 1,2 Millionen Kinder versterben jährlich an einer Pneumokokkenpneumonie oder einer Pneumokokkensepsis (Kadioglu et al., 2008). In Industriestaaten geht außerdem von der CAP eine hohe sozioökonomische Belastung aus (Pletz et al., 2012). In Deutschland belaufen sich die jährlichen Ausgaben des öffentlichen Gesundheitssystems durch Arztkontakte, Krankheitstage, ambulante und stationäre Behandlung auf eine Höhe von circa 500 Millionen Euro (Welte et al., 2004).

Nach aktueller Datenlage des Verbundes CAPNETZ liegt die geschätzte Gesamthäufigkeit der CAP in Deutschland bei 400.000 bis 600.000, wovon etwa die Hälfte durch Pneumokokken verursacht wird (Marrie et al., 2000, Höffken et al., 2009). Ein Drittel der Patienten müssen im Verlauf einer Pneumonie stationär behandelt werden. Externer Qualitätssicherungsprogrammen zufolge liegt die Letalität hospitalisierter Pneumokokken-Pneumonien bei etwa 14 % (BQS-Qualitätsreport 2007). Dies zeigt, dass die Morbidität und Mortalität der Pneumonie, insbesondere der Pneumokokkenpneumonie, auch in den Industrieländern hoch ist. Obwohl für die Behandlung der Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen verschiedene antibiotische Therapieoptionen zur Verfügung stehen, gewinnt die bakterielle Resistenz gegen Penicillin und Cephalosporine durch Penicillin-bindende Proteine (PBP) an Bedeutung. Außerdem muss hierbei eine Makrolidresistenzrate von 18 % im Jahr 2007, die über das vergangene Jahrzehnt in Deutschland weiter angestiegen ist, beachtet werden (van der Linden et al., 2008, Höffken et al., 2009).

Eine wichtige Rolle in der Pneumokokkeninfektion spielen die verschiedenen Virulenzfaktoren der Pneumokokken. Zunächst sind bei der Kolonisierung der nasopharyngealen Nische die Polysaccharid-Kapsel, Pili und verschiedene Enzyme, die extrazelluläre Matrixkomponenten degradieren, für Phagozytoseschutz und Adhäsion von Bedeutung (Weiser et al., 1994, Kimaro Mlacha et al., 2013, Kadioglu et al., 2008). Für die Entwicklung von Pneumokokkeninfektionen in sterilen Körperkompartimenten sind andere Virulenzfaktoren wichtig, hierunter Pneumolysin (Ply), ein zytolytisches Toxin, LytA, das die Freisetzung von Ply ermöglicht, sowie PspA, das die Bindung vom Komplementfaktor C3 an die bakterielle Oberfläche verhindert (Kadioglu et al., 2008).

Prophylaktisch stehen zur Immunisierung Impfstoffe zur Verfügung, die aus aufgereinigten Kapselpolysacchariden bestehen. Hierbei werden die 23 häufigsten Serotypen bei Erwachsenen verwendet (Brueggemann et al., 2007). Bei Kindern werden drei verschiedene Pneumokokken-Konjugat-Vaccine (*pneumococcal conjugate vaccines*, PCV) eingesetzt: PCV7 (mit Impfserotypen 4, 14, 6B, 9V, 18C, 19F and 23F), PCV10 (zusätzlich zu den Vorgenannten: Serotypen 1, 5 and 7F) und PCV13 (zusätzliche Serotypen 3, 6A and 19A) (Nurhonen und Auranen, 2014). Hierdurch kann sowohl ein Schutz der geimpften Einzelpersonen als auch durch die *herd immunity* der Schutz einer breiten Menge selber ungeimpfter Personen vor Pneumokokken-assoziierten Erkrankungen erreicht werden (Whitney et al, 2003). Es bleiben bezüglich der Impfung jedoch mehrere Punkte zu beachten: a) Da die in der Bevölkerung vorliegenden verschiedenen Pneumokokken-Serotypen einer Fluktuation in ihrer Prävalenz unterliegen, muss der verwendete Impfstoff regelmäßig angepasst und in seiner Zusammensetzung verändert werden. b) Es gibt Hinweise auf ein „*Serotype-Replacement*“ nach Impfung mit noch unabsehbaren Folgen sowohl für geimpfte Individuen als auch für die ungeimpfte *herd*, (Choi et al., 2011; Dagan et al., 2002). Begünstigt durch unvollständigen Impfschutz kann es zu Pneumokokkeninfektionen bei geimpften Individuen kommen (Choi et al. 2011). Auf die einzelnen Punkte gehe ich im Diskussionsabschnitt dieser Arbeit näher ein. Insgesamt zeigen sich am aktuellen Forschungsstand, dass sich trotz massiver Fortschritte bezüglich antibiotischer Therapiemaßnahmen und unserem aktuellen Verständnis der Pathophysiologie der Pneumokokkeninfektion nach wie vor massive Lücken.

4.1.1 Pneumolysin

Durch sein ausgefeiltes Waffenarsenal ist die Pneumokokke sowohl zu asymptomatischer Besiedelung des Nasen- und Rachenraumes als auch zu verschiedenartigsten invasive Infektionen fähig. Ein Hauptvirulenzfaktor, der den Übergang einer Kolonisierung in die Invasion steriler Körperkompartimente verursachen kann (Rubins et al., 1995, Kardioglu et al., 2002), ist das Pneumolysin (Ply) aus der Familie der Cholesterol-abhängigen porenbildenden Toxinen (*CDC cholesterol dependend cytolysins*). Ply wird von allen klinisch relevanten Pneumokokkenstämmen exprimiert. Weitere gut beschriebene *CDCs* sind die Toxine Gram-positiver Bakterien, darunter Perfringolysin O des *Clostridium perfringens*, Listeriolysin O der *Listeria monocytogenes* und Streptolysin O des *Streptococcus pyogenes* (Gonzalez et al., 2007).

Im Gegensatz zu den meisten anderen Cholesterin-abhängigen porenbildenden Toxinen fehlt dem 53 kDA großen Protein Ply eine sekretorische Sequenz. So wird Ply von Pneumokokken

durch bisher nicht vollständig verstandene Mechanismen freigesetzt (Price et al., 2012). Diskutiert werden hierbei: Freisetzung durch Autolyse der Pneumokokken (Rubins und Janoff, 1998), durch Lyse der Bakterien im Rahmen der antimikrobiellen Therapie, vor allem durch β -Lactam-Antibiotika (Cockeran et al., 2002), sowie durch Bakteriophagen, die selber Pneumolysin herstellen können (Ramirez et al., 1999).

Strukturell besteht Ply aus 4 Domänen aus insgesamt 471 Aminosäuren. Die Domänen 1-3 können zum porenbildenden Anteil oligomerisieren (Tilley et al., 2005), wobei die Domäne 4 für die Bindung an Cholesterol von Zielzellen verantwortlich ist (Kadioglu et al., 2008).

Die toxische Wirkung des Ply beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen: Zum einen aktiviert es sowohl den klassischen Weg der Komplementkaskade über Bindung des Fc-Teils von IgG (Kerr et al., 2005). Zum anderen wirkt es direkt durch seine Cholesterol-abhängigen lytischen Fähigkeiten an Zellmembranen (Kadioglu et al., 2008, Mitchell und Mitchell 2010). *In vitro*-Versuche mit Ply-suffizienten und -defizienten Pneumokokken haben gezeigt, dass Ply wichtig für die Caspase-abhängige Induktion von Apoptose ist (N'Guessan et al., 2005). Außerdem wurde seine Bedeutung in der Pathogenese in unterschiedlichen Pneumonie-Mausmodellen demonstriert (Kadioglu et al., 2002, Rubins et al., 1995). Auch in der Entstehung des Pneumokokken-induzierten *acute lung injury* spielt Ply eine entscheidende Rolle (Maus et al., 2004, Witzenrath et al., 2006). Als eine weitere Funktion wurde von Malley beschrieben, dass Ply als Agonist am Toll-like Rezeptor 4 fungiert und T-Zellen aktiviert (Malley et al., 2003).

So ergibt sich durch den Einfluss von Ply insgesamt eine Immunreaktion vor allem durch Komplementaktivierung (Paton et al., 1984), durch Hochregulation von allgemeinen Signaltransduktionswegen, auch bei sublytischen Ply-Konzentrationen (Ratner et al., 2006), sowie durch eine vermehrte Bildung pro-inflammatorischer Zytokine (Shoma et al., 2008). Diese Effekte sollten den Wirt vor einer invasiven Pneumokokkeninfektion schützen, sind allerdings im Falle eines Ungleichgewichts zu Gunsten überschießender pro-inflammatorischer Reaktionen, schädigend für den Wirt (Marriott et al., 2008).

Ply ist ein hochkonserviertes Protein. Dennoch existieren verschiedene Varianten des Proteins, die sich in ihrer Struktur durch wenige Aminosäuren und ihren hämolytischen Fähigkeiten unterscheiden. Die unterschiedlichen Ply werden nach ihren Sequenztypen (ST) oder Allelen differenziert. Wildtyp-Ply wird als ST227 bezeichnet (Lock et al., 1996). Durch Mutationsanalyse des Pneumolysin-Gens aus verschiedenen klinischen Pneumokokken-Isolaten konnte ein Pneumokokken-Phenotyp isoliert werden, der ein *in vitro* nicht-hämolytisches Ply exprimiert, das als Sequenz-Typ ST306 bezeichnet wird. (Jefferies et al., 2007, Lock et al., 1996, Kirkham et al.,

2006). Interessanterweise werden gerade diejenigen Pneumokokken-Serotypen häufig mit invasiven Pneumokokken-Erkrankungen assoziiert (Jefferies et al. 2007; Weinberger et al. 2010), die dieses als Allel 5 Ply bezeichnete nicht-hämolytische Ply exprimieren, darunter Serotyp 1 (Jefferies et al. 2007) sowie Serotyp 8 (Birtles et al. 2005; Berk et al. 1985), die dieses als Allel 5 Ply bezeichnete nicht-hämolytische Ply exprimieren, darunter Serotyp 1 (Jefferies et al., 2007) sowie Serotyp 8 (Birtles et al., 2005; Berk et al., 1985). Serotyp 1, ST306 ist eine der am häufigsten in invasiven Pneumokokkeninfektionen gefundene Pneumokokke (Harboe et al., 2009). Aber auch innerhalb der Serotypen sind verschiedene Sequenztypen charakterisiert, die jeweils das atypische Allel 5 Ply exprimieren (für Serotyp 1 neben ST306 auch ST228, ST617 und andere; für Serotyp 8 ST53, ST578, ST835, ST1110, ST1722) (Jefferies et al., 2007; Kirkham et al., 2006; Witzernath et al., 2011).

Ply kann insgesamt als zweischneidiges Schwert gesehen werden, da es, gerade im Rahmen der nasopharyngealen Kolonisierung, ebenfalls als ein Virulenzfaktor eingeordnet wird, der letztlich zur Beseitigung von Pneumokokken durch den Wirt führen kann (Rubins und Janoff, 1998).

4.2 Angeborene und erworbene Immunität

Das biologische Abwehrsystem eines Wirtsorganismus gegen Pathogene wird als sein Immunsystem bezeichnet. Es ist für den Wirt essentiell, dass potentiell infektiöse Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten) sowie infizierte oder entartete Zellen erkannt und eliminiert werden. Das Immunsystem aller höheren Lebewesen setzt sich aus dem phylogenetisch älteren angeborenen und dem erworbenen Immunsystem zusammen (Hoffmann et al., 1999).

Dringt ein Pathogen über physikalische und chemische Barrieren hinweg (Epithel der Schleimhäute, z.T. mit Zilien und Mukus ausgestattet) in einen Wirtsorganismus ein, wird zunächst das System der angeborenen, unspezifischen Immunität aktiviert (Janeway, 2008). Phagozytäre Zellen (vor allem neutrophile Granulozyten und Makrophagen) spielen hier eine zentrale Rolle, indem sie durch Phagozytose das Pathogen entfernen. Gleichzeitig orchestrieren sie über die Bildung und Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden die Rekrutierung weiterer Zellen der angeborenen (Granulozyten, NK-Zellen, monozytäre Zellen, insbesondere Makrophagen) sowie der erworbenen (Lymphozyten und dendritische Zellen, letztere bilden strenggenommen eine Brücke zwischen beiden Systemen) Immunität (Janeway und Medzhitov, 2002; Tosi, 2005; Opitz et al., 2010). Somit bilden Makrophagen auch eine wichtige Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität.

Die erste Linie der Pathogenerkennung erfolgt über Muster-erkennende (*Pattern recognition-receptors*, PRRs) Keimbahn-kodierte Rezeptoren, die vor allem von Makrophagen, dendritischen Zellen, Epithel- und Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden. Sie erkennen typische, hochkonservierte Pathogen-assoziierte Muster (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) sowie endogene Moleküle, die bei physikalischer Zellschädigung entstehen und als Gefahr-assoziierte Muster (*Danger-associated molecular patterns*, DAMPs) bezeichnet werden (Kawai and Akira, 2011; Matzinger, 2012).

Neben der sofort agierenden, jedoch unspezifischen Immunität spielt die adaptive, spezifische Immunität eine wichtige Rolle. Unter anderem obliegt ihren Funktionen die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses (Janeway, 2008). Über Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen erfolgt sowohl eine Stimulation der Zell-vermittelten Immunität mit konsekutiver Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen als auch eine Stimulation der humoralen Immunität über die Bildung und Sekretion von Antikörpern durch B- bzw. Plasmazellen. Während einer Infektion gebildete Gedächtniszellen können bei einer Re-Infektion durch das gleiche Pathogen zu einer effektiven Wiedererkennung und Verteidigung sorgen (ebenda).

4.3 Rezeptoren der angeborenen Immunität

Als erste Linie der Verteidigung gegen invadierende Pathogene gelten die Keimbahn-kodierten Muster-erkennenden Rezeptoren der angeborenen Immunität (Kawai and Akira, 2011).

4.3.1 Toll-like Rezeptoren

Als best-charakterisierte Strukturen der angeborenen Immunität gelten die transmembranären Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs), die sowohl in der Zellmembran als auch in der endosomalen Membran lokalisiert sein können. Als erster TLR wurde der TLR4 als nicht-redundanter LPS-erkennender Rezeptor charakterisiert. Die Familie der TLRs untergliedert sich in mehrere Proteine, die jeweils über eine N-terminale Leucin-reiche Domäne (*leucin-rich-repeat*, LRR) zur Ligandenbindung und eine Toll-Interleukin-Rezeptor-Domäne (TIR) zur intrazellulären Signaltransduktion verfügen. Je nach Gattung unterscheidet sich die Anzahl an TLRs. Im Menschen sind 10 bekannt, in der Maus 13. Nach Bindung des Liganden an einen TLR wird über die TIR-Domäne, über die Adapterproteine MyD88 und/oder TRIF der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, transloziert in den Zellkern und reguliert dort die Genexpression proinflammatorischer Zytokine. Ein weiterer Signaltransduktionsweg, der nur von manchen TLRs aktiviert

wird, führt über die Aktivierung von IRFs zu einer Expression von Typ I Interferonen. Manche TLRs, wie TLR1 und 2 können nur in Kooperation miteinander eine Signaltransduktion initiieren. Einige TLRs sind in ihrer Funktion abhängig von Ko-Rezeptoren (z.B. benötigt TLR4 den Ko-Rezeptor CD14 zur Erkennung von LPS), wobei diese Abhängigkeit jeweils ligandenspezifisch ist (siehe zu diesem Abschnitt Kawai und Akira, 2011). TLR2 erkennt Lipoteichonsäure (LTA) aus Gram-positiven Bakterien, sowie Lipoproteine von verschiedenen Gram-negativen Bakterien (Janeway, 2008).

4.3.2 NLRs

Eine weitere wichtige PRR-Familie ist die Familie der *Nod-like receptors* (Nod-ähnliche Rezeptoren, NLRs). NLRs sind im Zytosol der Wirtszelle lokalisiert und dienen u.a. der Erkennung von intrazellulären Infektionen sowie von Zellschäden (Franchi et al., 2009). Die Gruppe der humanen NLRs umfasst 23 Proteine, die durch eine gemeinsame Grundstruktur charakterisiert sind:

C-terminal befindet sich eine LRR-Domäne, die direkt oder indirekt der Ligandenerkennung dient. Zentral befindet sich die Namen-gebende Nod-Domäne, die die Rezeptor-Oligomerisierung initiiert. N-terminal ist die Effektor-domäne lokalisiert, die die Interaktion mit Signalmolekülen und somit die Signalweiterleitung vermittelt (Franchi et al., 2009).

Insgesamt können die bisher bekannten NLRs nach ihren N-terminalen Effektorstrukturen in fünf Untergruppen unterteilt werden: NLRA mit einer A-Domäne (*acidic transactivation domain*), NLRB mit einer BIR-Domäne (*baculovirus inhibitor of apoptosis repeat domain*), NLRX mit einer noch Domäne, welche die Lokalisation an Mitochondrien vermittelt, NLRC mit einer CARD (*Caspase recruitment domain*) und NLRP mit einer Pyrin-Domäne (PYD) (Lamkanfi und Dixit, 2012, Arnould et al., 2009).

4.3.2.1 NOD1 und NOD2

Bisher wurden die NLRs NOD1 und NOD2 am besten charakterisiert. Sie gehören mit ihren jeweiligen CARDS zu der Subgruppe der NLRCs und erkennen hochkonservierte Zellwandbestandteile. NOD1 detektiert mesoDAP, ein Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, wohingegen NOD2 ein Muramyl-Dipeptid (MDP) erkennt, das sowohl in gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien vorkommt (Correa et al., 2012).

Nach Signalerkennung durch NOD1 und NOD2 kommt es über CARD-CARD-Interaktion mit der Kinase RIP2 zu einer NF κ B-abhängigen Gentranskription.

Es ist bekannt, dass NOD1 und NOD2 eine wichtige Rolle in der Immunantwort auf Infektion durch *Legionella pneumophila* (Berrington et al., 2010), *Listeria monocytogenes* (Opitz et al., 2006, Travassos et al., 2010), *Samonella colitis* (Geddes et al., 2010) sowie *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Le Bourhis et al., 2009) und *Mycobacterium tuberculosis* (Pandey et al., 2009, Brooks et al., 2011) spielen. Die Annahme, dass NLRs grundsätzlich als komplementäres System zu den membranständigen TLRs funktionieren, indem sie ausschließlich Infektionen von Bakterien aufspüren, die sich eine intrazelluläre Nische geschaffen haben, muss nach neuem Stand der Forschung relativiert werden. Es zeigt sich, dass auch Bakterien, die einem primär extrazellulärem Lebenszyklus unterliegen [*Haemophilus influenzae* (Brooks et al., 2011; Ly-senko et al., 2007), *Helicobacter pylori* (Watanabe et al., 2010; Viala et al., 2004), *Staphylococcus aureus* (Deshmukh et al., 2009), *Streptococcus pneumoniae* (Opitz et al., 2004)], von NOD1 und/oder NOD2 aufgespürt werden können (Clarke und Weiser, 2011).

4.3.2.2 NLR-Inflammasome

Im Gegensatz zu NOD1 und NOD2 regulieren die NLRs NLRP1, NLRP3, NLRP6 und NLRC4 sowie das HIN200-Molekül AIM2 (siehe unten) die Produktion einiger proinflammatorischer Mediatoren vorrangig posttranslational und nicht auf der Ebene der Transkription (Lamkanfi und Dixit, 2012). Diese Rezeptormoleküle bilden in der Regel zusammen mit dem Adaptermolekül ASC sowie der Caspase-1 zytosolische Multiproteinkomplexe, die als Inflammasome bezeichnet werden (Martinon et al., 2009b). Hierbei ist das jeweilige NLR- bzw. PYHIN-Protein namensgebend. Einen schematischen Überblick hierzu vermittelt Abbildung 2-1.

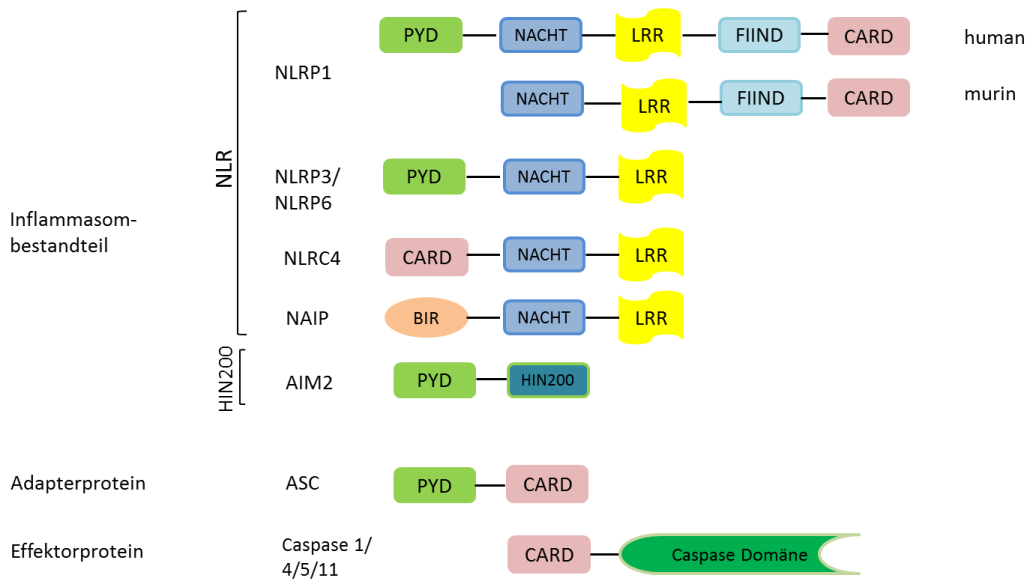


Abbildung 4-1: Domänen-Struktur der Inflammasomkomponenten

Modifiziert nach Lamkanfi und Dixit, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2012. 28:137-61

Alle Inflammasome scheinen Caspase-1-abhängig die proteolytische Spaltung inaktiver Pro-Formen von Zytokinen der IL-1-Familie (pro-IL-1 β und pro-IL-18) zu vermitteln, um nachfolgend die Freisetzung der aktiven Zytokine zu ermöglichen. Caspase-1 wird ebenfalls, wie auch andere Caspasen, als inaktives Zymogen (Pro-Caspase-1) synthetisiert und anschließend in strenger Regulation durch das Inflammasom proteolytisch in seine heterodimere Form mit je einer p10- und einer p20-Untereinheit gespalten (Martinon et al., 2002). Insgesamt ist die Produktion von IL-1 β und IL-18 somit von mindestens zwei Signalen abhängig. Durch Aktivierung von TLRs oder anderen Zytokinrezeptoren kommt es zum *priming*, d.h. der Expressionssteigerung von z.B. pro-IL-1 β sowie von Inflammasomkomponenten, wie z.B. NLRP3 (Bauerfeind, 2009). Das NLRP1 Inflammasom wird durch das *lethal toxine* von *Bacillus anthracis* aktiviert (Averette et al., 2009). Darüber hinaus scheint es möglicherweise in Kooperation mit NOD2 MDP zu erkennen (Bruey et al., 2007).

Das NLRC4 (veraltet: IPAF)-Inflammasom wird durch bakterielles Flagellin (z.B. von von *Salmonella typhimurium* (Franchi et al., 2006), *Listeria monocytogenes* (Sauer et al., 2011), *Legionella pneumophila* (Case et al., 2009), sowie durch einen Bestandteil des Typ III Sekretions-System z.B. von *Pseudomonas aeruginosa* (Miao et al., 2010; Sutterwala et al., 2007) stimuliert. Hierbei kooperiert NLRC4 mit jeweils einem anderen NLR Molekül, welches die Ligandenerkennung zu vermitteln scheint. So vermittelt NLRC4 zusammen mit NAIP5 die Reaktion auf Flagellin, wohingegen NLRC4 zusammen mit NAIP2 auf ein Molekül des bakteriellen Typ III

Sekretionsapparats reagiert (Zhao et al, 2011; Kofoed und Vance, 2011). Interessanterweise wurde kürzlich beschrieben, dass das NAIP5/NLRC4-Inflammasome (und möglicherweise auch andere Inflammasome) zusätzlich zur IL-1 β - und IL-18-Produktion auch die Ausschüttung von Eikosanoiden regulieren (von Moltke et al, 2013).

Das bisher best-charakterisierte Inflammasom ist das NLRP3-Inflammasom, welches von einer Vielzahl von Erreger- sowie Gefahr (*danger*)-assoziierten Stimuli (DAMPs) aktiviert werden kann. Das NLRP3-Inflammasom reagiert z.B. auf Bakterien, die ein Poren-bildendes Toxin exprimieren (Carlsson et al., 2010; Craven et al., 2009; Harder et al., 2009; Mariathasan et al., 2006; Meixenberger et al., 2010; Muñoz-Planillo et al., 2009). NLRP3 wird außerdem durch nekrotische Zellen bzw. von daraus freigesetzten DAMPs, wie z.B. Harnsäurekristalle, ATP und β -Amyloid stimuliert (Martinon et al., 2006, Duncan et al., 2007, Halle et al., 2008). Außerdem reagiert das NLRP3-Inflammasom auf exogene Moleküle, wie beispielsweise Silikate, Asbestfasern und Aluminiumsalze (Mariathasan et al., 2006; Cassel et al., 2008; Dostert et al., 2008; Eisenbarth et al., 2008; Hornung et al., 2008; Iyer et al., 2009).

Die große Vielzahl und Diversivität dieser Aktivatoren legt es nahe, dass NLRP3 diese Moleküle nicht direkt bindet und erkennt. Es wird hingegen angenommen, dass diese Aktivierung indirekt erfolgt. Nach derzeitigem Kenntnisstand scheinen ein Kalium-Ausstrom aus der Zelle, die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species*, ROS) und/ oder eine lysosomale Destabilisierung mit nachfolgendem Austritt von phagosomalen Enzymen ins Wirtszellzytosol stromaufwärts notwendig zu sein, um NLRP3 zu aktivieren (Lamkanfi und Dixit, 2012).

Auch andere Inflammasome regulieren Caspase-1 abhängig die Prozessierung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 zu reifem IL-1 β und IL-18. Die Stimulie für ihre Aktivierung sind unterschiedlich und zum Teil noch unvollständig charakterisiert. Für das NLRP6-Inflammasom ist gezeigt worden, dass es für die Konstitution einer ausgewogenen Darmflora notwendig ist, da bei fehlerhafter Expression von NLRP6 ein Überwiegen colitogener Bakterien gezeigt wurde (Elinav et al., 2011). Für NLRP12 wurde eine mögliche Rolle in der Negativregulation von NF κ B-Signaling gezeigt (Allen et al., 2012). NLRC5 wurde als Regulator der MHC Klasse I abhängigen Immunantwort beschrieben (Vladimer et al., 2013).

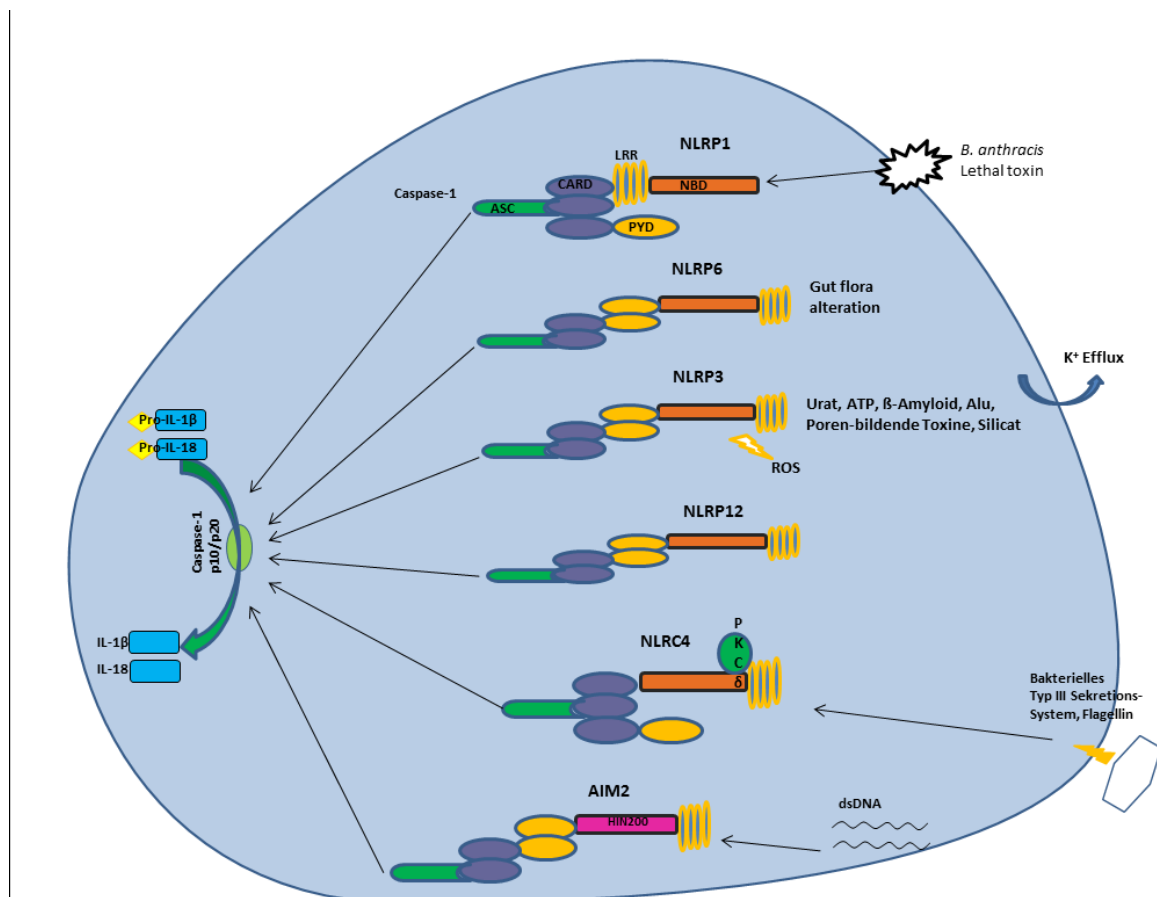


Abbildung 4-2: Inflammasome und ihre Stimulie; modifiziert nach Vladimer et al., *Curr Opin Microbiol.* 2013. 16(1), 23-31.

Neben den eben beschriebenen, bisher besser charakterisierten Inflammasomen existieren weitere NLRs, die ebenfalls zytosolische Multiproteinkomplexe bilden (Martinon et al., 2009b). Obgleich viele PRRs, insbesondere die Inflammasom-bildenden Rezeptoren, noch wenig charakterisiert sind, erschließt sich aus Mutationsanalysen bestimmter Erkrankung und Syndrome ein Teil ihrer Funktion. Einen kleinen Überblick relevanter Pathologien in diesem Zusammenhang, die z.T. bereits in experimentellen Mausmodellen Anwendung finden, soll Tabelle 2-1, modifiziert nach Mason et al., (2012), geben (Mason et al., 2012).

Tabelle 4-1 NLRs und assoziierte nicht-mikrobielle Erkrankungen

- NLRP1: Neuronale Verletzung, Systemische Sklerose, Vitiligo
- NLRP3: Gicht, rheumatoide Arthritis, Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (Muckle-Wells-SD, familiäre Kälteurtikaria u.a.), Multiple Sklerose und EAE, kardiovaskuläre Erkrankungen, chronisch-obstruktive Lungenerkrankungen, allergisches Asthma,

Kontaktexzeme, Silikose u.a. pathologische Reaktionen auf eingeatmete Partikel, Morbus Alzheimer, sterile Hepatitis, Adipositas und Insulin-Resistenz, chronisch-entzündliche Darmerkrankung

NLRP5: Neuronale Verletzung

NLRP6: Chronisch-entzündliche Darmerkrankung

NLRP7: Hydatidiforme Mole

NLRP14: Unvollständige Spermatogenese

NAIP: Spinale Muskelatrophie

CIITA: *bare lymphocyte syndrome*

4.3.3 AIM2 und andere DNA-Rezeptoren

Um potentielle Pathogene durch das Immunsystem effektiv zu erkennen, eignet sich die Mustererkennung konservierter Moleküle, wie z.B. Nukleinsäuren. Für einige Zeit galt der endosomale Rezeptor TLR9 als einziger Nukleinsäure-erkennende Rezeptor. Aktuell ist vor allem AIM2 (*absent in melanoma 2*) und cGAS (Ablasser et al., 2013; Wu et al., 2013) Gegenstand der Forschung. Daneben wurden aber noch andere DNA-erkennende Rezeptoren postuliert, unter ihnen DAI (*DNA-dependent activator of interferon regulatory factors*) (Takaoka et al., 2007; Wang et al., 2008).

AIM2 ist vorwiegend im Zytosol lokalisiert. Es gehört zur Familie der HIN200-Proteine, die durch eine Pyrin und eine HIN200-Domäne gekennzeichnet sind (Bürckstümmer et al., 2009). Da es mehrere HIN200-Moleküle zu geben scheint, die als PRR fungieren, hat sich außerdem die Bezeichnung *AIM2-like receptor* (ALRs) etabliert (Brunette et al., 2012, Keating et al., 2011).

Durch Typ I Interferon scheint die AIM2-Expression induziert zu werden, bei Erkennung von dsDNA aktiviert es Caspase-1 und bildet mittels ASC, das an seine N-terminale PYD-Domäne bindet ein zytosolisches Inflammasom. Das AIM2-Inflammasom nimmt innerhalb der Inflammasome eine Sonderstellung ein, da es als eines der wenigen Inflammasome ihren Liganden direkt (mittels der C-terminalen HIN-Domäne) bindet (Hornung et al., 2009; Bürckstümmer et al., 2009; Fernandes-Alnemri et al., 2009). AIM2 spielt eine essentielle Rolle in der Erkennung von dsDNA und reagiert dadurch auf Infektionen, wie z.B. mit Bakterien wie *Francisella tularensis* (Jones et al., 2010).

4.4 Zytokine

Für die Initiierung der Immunantwort sowie eine feine Abstimmung der Entzündungsreaktion nach Erkennung eines potentiellen Pathogens werden Zytokine produziert und sezerniert, die für eine lokale und, bei Abgabe in Blut oder andere Körperflüssigkeiten, systemische Reaktion sorgen. Nach ihrer Funktion oder Struktur lassen sie sich in Interleukine (IL), Tumornekrosefaktoren (TNF), Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), sowie Tumorstadiumsfaktoren (TGF) unterteilen. Chemotaktische Zytokine werden häufig als Chemokine bezeichnet (Janeway, 2008).

Insgesamt obliegt ihnen unter anderem die Orchestrierung der angeborenen Immunität, im Wesentlichen sind an einer pro-inflammatorischen Sofortreaktion vor allem die Zytokine IL-1 β und TNF α , im schnellen zeitlichen Verlauf auch IL-6, IFN γ und IL-8 und RANTES beteiligt. Von großer Bedeutung in der anti-inflammatorischen Reaktion ist z.B. IL-10. Im Weiteren gibt es bedeutende Verbindungen zur erworbenen Immunität (Janeway und Medzhitov, 2002)

4.4.1 IL-1 β

Im Rahmen vieler Infektionserkrankungen bestehen Fieber, Schüttelfrost und allgemeine Zeichen einer systemischen Entzündung. Während bis in die 1970er Jahre allgemein angenommen wurde, dass diese Effekte auf direkte Wirkung Pathogen-assoziiertes Endotoxin zurückzuführen sei, konnte Charles A. Dinarello 1977 zirkulierendes körpereigenes „Endotoxin“ nachweisen, das später als IL-1 β bezeichnet wurde und in den letzten Jahren immer besser in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen verstanden wird (Dinarello et al., 1977).

Leukozyten, insbesondere monozytäre Zellen, sind die Hauptquelle für IL-1 β . Die Produktion erfolgt in einem mehrschrittigen Prozess, so dass die Synthese und Sekretion dieses hoch potenten pro-inflammatorischen Zytokins (auch im Rahmen schwerer systemischer Infektionen sind lediglich IL-1 β -Level im Pikogramm-Bereich nachweisbar) eng kontrolliert und auf verschiedenen Ebenen modifiziert werden kann. Wie in Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben sind mindestens zwei Signale für die Aktivierung der IL-1 β -Produktion notwendig. Zum einen muss z.B. nach TLR oder Zytokinrezeptorstimulation NF- κ B-abhängig zunächst die inaktive Vorform des IL-1 β , pro-IL-1 β gebildet werden. Anschließend wird nach Aktivierung eines Caspase-1 abhängigen Inflammasoms der Übergang in die heterodimere Tetraform der Caspase-1 bewirkt, und es erfolgt eine Caspase-1-abhängige proteolytische Spaltung der pro-Sequenz des IL-1 β . In einem letzten

Schritt über bisher noch unvollständig verstandene Prozesse wird das biologisch aktive reife IL-1 β (molekulare Masse 17kDa) aus der Zelle sezerniert (Martinon et al., 2009b).

Die Erkennung des IL-1 β als systemischer Mediator pro-inflammatorischer Prozesse geschieht über den IL-1-Rezeptor (IL-1R), der außer IL-1 β auch IL-1 α erkennt (Dinarello, 2009). Der IL-1R enthält intrazellulär eine Toll-like-Rezeptor-Domäne (Toll/IL-1-Rezeptor TIR), über die nach Ligandenbindung das Adaptermolekül MyD88 rekrutiert und anschließend der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert wird (ebenda). Außerdem gibt es eine weitere Domäne des IL-1R, eine Immunglobulin-ähnliche Domäne zur Ligandenbindung. IL-1 β wirkt sowohl parakrin als auch autokrin.

Da in der inflammatorischen Immunantwort eine fein austarierte Balance gehalten werden muss, gibt es auch den körpereigenen Antagonisten zum pro-inflammatorischen IL-1R, den IL-1-RA, der als neutralisierender Counterpart des IL-1R angesehen werden kann und der nach Bindung des IL-1 β keine weitere inflammatorische Reaktion induziert (Wakabayashi et al., 1991).

4.5 Bedeutung der angeborenen Immunität in der *Streptococcus pneumoniae*-Infektion

Nach Kolonisierung der Schleimhäute des Nasopharynx durch *S. pneumoniae*, kann es zunächst über bislang unzureichend verstandene Mechanismen zu einer teilweise jahrelangen asymptomatischen Trägerschaft kommen (Kardioglu et al., 2008). Auch die Mechanismen, die zu einer invasiven Infektion führen und die Immunantwort hierauf, sind bisher nicht vollständig beleuchtet. Zunächst kommt es nach lokaler oder systemischer Schwächung der Abwehrfunktionen zu einer Überwindung der physikalischen und chemischen Barrieren des Nasopharynx. Hier bilden Flimmerepithelien, Mukussekretionen und Luftströme eine primitive Form der Verteidigung vor invadierenden Pathogenen. Vor allem nach mechanischen Störungen der Epithelbarriere, beispielsweise nach viraler Infektion, kann es zu einem erleichterten Eintreten von *S. pneumoniae* in den unteren, eigentlich sterilen, Respirationstrakt kommen. Die Erkennung von *S. pneumoniae* durch zelluläre oder soluble PRRs führt im Weiteren zu einer Einleitung weiterer Abwehrmechanismen v.a. der angeborenen Immunität gegen den Eindringling: Bekannt ist bisher, dass Bestandteile der Zellwand von *S. p.*, wie z.B. Peptidoglykane durch NOD2 (Opitz et al., 2004) und Lipoteichonsäuren (LTA) sowie Lipoprotein von transmembranären TLR2 erkannt werden (Schroeder et al., 2003; Schmeck et al., 2006; Yoshimura et al., 1999). Die Rolle vom LPS-Rezeptor TLR4 in der Erkennung von *S.p.* wird unterschiedlich bewertet. In der Vergangenheit wurde Ply als Ligand von TLR4 beschrieben (Malley et al., 2003), eine weitere Arbeitsgruppe zeigte, dass eine intranasale Applikation hoher Ply-Dosen eine TLR4-abhängige Zytokin-

Produktion (IL-1 β , IL-6, KC) und eine Rekrutierung von Neutrophilen zu Folge hatte (Dessing et al., 2009). Gelangt *S. p.* über Phagozytosemechanismen in das Endosom, werden hier unmethylierte CpG-DNA-Motive über TLR9 erkannt (Albiger et al., 2007). Letiembre sowie Albiger kommen zu dem Schluss, dass durch eine TLR2 und TLR9 vermittelte Reaktion, die Phagozytose von Pneumokokken sowie das intrazelluläre „Killing“ durch Leukozyten verstärkt werden (Letiembre et al., 2005; Albiger et al., 2007). Die in der Lunge ortsständigen Alveolarmakrophagen übernehmen einen wichtigen Anteil an der Phagozytose der eindringenden Bakterien, wobei dies in einem Maus-Pneumoniemodell bereits kontrovers beurteilt wurde (Knapp et al., 2003). Auf zellulärer Ebene kann die Pneumokokkeninfektion folgendermaßen beschrieben werden: Nach Stimulation der beschriebenen PRRs, zytosolischer DNA-Sensoren (Koppe et al., 2012) und weiterer, im Ergebnisteil dieser Arbeit beschriebener Rezeptoren der angeborenen Immunität, kommt es zunächst u.a. zur Bildung wichtiger Zytokine der frühen angeborenen Immunantwort, wie IL-1 β und TNF α in Alveolarmakrophagen und anderen Zellen (Henriques-Normark und Tuomanen, 2013). Durch diese werden weitere ortsständige Zellen, insbesondere Epithelzellen aktiviert, welche wiederum IL-8, MCP-1 und andere Chemokine produzieren (ebenda). Hierdurch werden neutrophile Granulozyten rekrutiert und im Verlauf der Entzündung kommen Exsudatsmakrophagen hinzu (ebenda).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass verschiedene TLRs sowie NOD2 eine NF κ B-abhängige Produktion verschiedener inflammatorischer Mediatoren vermitteln. Ein proinflammatorisches Schlüsselzytokin ist hierbei IL-1 β , das zur Produktion jedoch eines zweiten Signals bedarf, dessen Aktivator und Rezeptor oder Inflammasom in der Pneumokokkeninfektion noch nicht identifiziert war.

5 Aufgabenstellung

S. pneumoniae ist der häufigste Erreger ambulant erworbener Pneumonien, die mit zahlreichen pulmonalen und systemischen Komplikationen vergesellschaftet sein können. Durch unvollständige Möglichkeiten der Prävention und zunehmende Antibiotikaresistenz stellt die Pneumokokkeninfektion eine große medizinische und sozio-ökonomische Herausforderung dar. Zur Entwicklung besserer Präventions- und Therapiemöglichkeiten ist auch ein grundlegendes Verständnis der angeborenen Immunität gegenüber *S. pneumoniae* notwendig.

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Abwehrlinie gegenüber eindringenden Pathogenen, wie z.B. *S. pneumoniae*. Es erkennt Pneumokokken mit Hilfe von TLRs und anderen PRRs, welche u.a. NF κ B-abhängig die Expression und Produktion verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine vermitteln. Ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin der frühen Immunreaktion ist IL-1 β . Die Produktion von reifem IL-1 β ist neben der Expression abhängig von einem zweiten Inflammasom-abhängigen Regulationsschritt. Dieser Mechanismus sollte in der hier vorliegenden Arbeit charakterisiert werden.

Die vorliegende Dissertation untersucht daher folgende Fragestellungen:

1. Welcher Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* ist essentiell für die IL-1 β -Produktion in monozytären Zellen?
2. Welches Inflammasom vermittelt die *S. p.*-induzierte IL-1 β -Produktion in Makrophagen?

6 Methodik

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Materialien

Die verwendeten Plastikmaterialien stammten von den Firmen Nunc (Wiesbaden), Falcon (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen) und Sigma (Deisenhofen).

6.1.2 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an Zellkulturbänken mit laminarer Strömung durchgeführt. Alle Medien bzw. Flüssigkeiten wurden vor Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt, soweit nicht anders angegeben. Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen bezogen:

Nunc (Roskilde, Dänemark); Falcon; Becton-Dickinson (Heidelberg).

Alle Grundsubstanzen zur Herstellung von Puffern, Lösungsmitteln sowie weitere Laborchemikalien und Grundsubstanzen zur Zellkultur wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Life Technologies Ltd (Praisley, UK), PAA (Linz, Österreich); Pharmingen (Hamburg), PAN (Aidenbach), Gibco Life Technologies (Eggenstein) und Boehringer (Mannheim) bezogen.

Tabelle 6-1 Zellen und Bezugsquellen

BMMs	murine Knochenmarksmakrophagen (C57BL/6 Mäuse) Wildtyp	Firma Charles River, Sulzbach
	NLRP3 <i>knock out</i>	Prof. Jürg Tschopp, Lausanne
	TLR4 <i>knock out</i> (C57BL/ 10 ScSn)	Max-Planck Institut für Immunbiologie, Freiburg
	TLR2 <i>knock out</i> (C57BL/ 10 ScSn)	Prof. Stefan Bereswill/ Dr. Makus Heimessat Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité- Universitätsmedizin Berlin
	ASC <i>knock out</i>	Firma Genentech, San Francisco
RAW 264.7	murine Knochenmarksmakrophagen- Zelllinie (BALB/c Mäuse)	ATCC TIB-71TM
PBMCs	humane primäre Monozyten aus	DRK, Berlin

peripherem Blut (Ursprung Buffy coats)
 THP-1 humane monozytäre Zelllinie ACC 16 DSMZ, Braunschweig

Tabelle 6-2 Zellkulturmedien

Medien für Zellkultur	Zusammensetzung	Hersteller
Kultivierungsmedium (THP-1, PBMCs L929)	500 ml RPMI 1640	Gibco®
	10 % FCS	Gibco®
Kultivierungsmedium (RAW 246.7)	500 ml RPMI 1640	Gibco®
	10 % FCS	Gibco®
	1 % Glutamin	
	1 % Penicillin-Streptomycin	Gibco®
Kultivierungsmedium (BMMs)	500 ml RPMI 1640	Gibco®
	10 % FCS	Gibco®
	15 % L929 Zellüberstand	
Wachstumsmedium (BMMs)	500 ml RPMI 1640	Gibco®
	20 % FCS	Gibco®
	30 % L929 Zellüberstand	
	1 % Penicillin-Streptomycin	Gibco®
Infektionsmedium	500 ml RPMI 1640	Gibco®
Einfríermedium (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
EDTA-Waschpuffer (BMMS)	500 ml Dulbecco's PBS	PAA
	w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	
	2 mM EDTA	Roth

6.1.2.1 Gewinnung primärer humaner monozytärer Zellen (PBMCs)

Um monozytäre Zellen aus peripherenvenösem heparinisiertem Blut gesunder Probanden zu gewinnen, wurde eine Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt, bei der es sich dem Prinzip nach um eine Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen eines Leukozytenfilms nach ihrem spezifischen Gewicht handelt.

Hierfür wurden *buffy coats* (DRK Berlin) im Verhältnis 1:1 mit einem EDTA-Waschpuffer vermischt, jeweils 20 ml dieser Mischung auf 20 ml Pancoll (PAN Biotech, Aidenbach) in einem

50 ml Falcon-Gefäß geschichtet, ohne dass sich hierbei die beiden Phasen vermischten und für 25 min bei 800 g, Raumtemperatur, ohne Bremse zentrifugiert. Nach Sammlung der PBMCs wurden diese zur weiteren Aufreinigung in weiteren Waschschritten zuerst mit 50 ml und anschließend mit 25 ml EDTA-Waschpuffer gemischt und jeweils bei 300 g (mit Bremse) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml Waschpuffer aufgenommen, über einen verdünnten Pancoll-Gradienten (10 ml Pancoll mit 1,4 ml PBS) geschichtet und erneut für 25 min, bei 800 g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Nach ein bis zwei weiteren Waschschritten (wie zuvor beschrieben, in diesem Falle zur Minimierung des Thrombozytenanteils und subsequenter Verhinderung eines *Cytokine bursts* nach bakterieller Stimulation im Rahmen des Experiments) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS aufgenommen. Nach Auszählen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die gewonnenen PBMCs zur Kultivierung in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (supplementiert mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS) in 48-/96-Loch-Platten ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ und 99 % relativer Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

Für RNA Inhibitionsversuche wurden die gewonnenen PBMCs wie unten beschrieben vor Aussaat weiterbehandelt.

6.1.2.2 Präparation von Knochenmarksmakrophagen aus Mäusen (BMM)

In eine 5 ml Zellkultur-Schale wurde 5 ml RPMI-Medium gegeben. Aus einer zuvor getöteten Maus wurden beide Femora intakt entnommen und sorgfältig von Muskel und Bindegewebe befreit. Während Mörser und Pistill mit 70 % Ethanol sterilisiert wurden, wurden die Knochen im Medium in der Kulturschale bewahrt, anschließend für circa 5 min in den Mörser mit erneut reichlich 70 % Ethanol gegeben, um alles zu sterilisieren. Das Ethanol wurde abgesaugt und Knochen, Mörser und Pistill einmal mit sterilem RPMI-Medium abgewaschen. Dieses wurde wiederum abgesaugt, 20 ml steriles RPMI wurde zugegeben und durch Zerdrücken der Knochen mit dem Pistill konnte das Knochenmark austreten, ohne dass sich hierbei Knochensplitter bildeten. Das Medium wurde zur Suspendierung der Zellen wiederholt auf- und abpipettiert und durch einen 70 µl Nylon *cell strainer* (BD Falcon), zur Abtrennung von Knochenteilen, in ein 50 ml Zentrifugionsgefäß gegeben. In den Mörser wurde erneut 10 ml RPMI gegeben, letzte Knochenmarksreste durch Pipettieren suspendiert und durch den *cell strainer* zu der übrigen Zellsuspension gegeben. Die Zellen wurden bei 1100 RPM für 10 min zentrifugiert, in FCS resuspendiert, ausgezählt und zuzüglich 10 % DMSO in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Cryoröhrchen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.1.2.3 Ausplattieren und Kultivieren der BMMs

Entweder direkt nach Isolierung oder nach Auftauen aus dem Cryostock wurden die BMMs auf zwei 10 cm OPTILUX-Petrischalen aufgeteilt. Hierfür wurde Kultivierungsmedium vorbereitet, die Zellstocks wurden zügig im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, anschließend die aufgetaute Zellsuspension in ein leeres 15 ml Falcon-Gefäß gegeben, tropfenweise 10 ml warmen Mediums hinzugefügt (hierbei verdampft unter leichten Schwenkbewegungen das cytotoxische DMSO), für 5 min bei 1000 RPM zentrifugiert, altes Medium abgesaugt und 10 ml neues Kultivierungsmedium hinzugefügt. Nach Aufteilung auf die Kulturschalen (je 5×10^6 Zellen/Schale) wurden die Zellen in 10 ml Medium 7 Tage kultiviert.

Am 4. Tag wurde in jede Schale 10 ml frisches vorgewärmtes Wachstumsmedium gegeben. Am 7. oder 8. Tag waren die BMMs subkonfluent und konnten in 48-Loch-Platten zur Infektion ausgesät werden. Das weitere Verfahren wurde entsprechend dem Infektionsprotokoll durchgeführt.

6.1.2.4 Aussäen der BMMs

Zur Aussaat der BMMs wurden die Überstände der Zellkulturen in 50 ml Falcon-Gefäße überführt, die Zellen mit 7 ml sterilem eiskaltem EDTA-Waschpuffer überschichtet, 5-10 min bei 4°C belassen und anschließend von ihrer Kulturschale abgewaschen. Die abgespülten Zellen wurden zu den bereits gesammelten Überständen in die entsprechenden Gefäße gegeben. Um die letzten Zellen aus den Kulturplatten zu erfassen, wurden diese erneut mit ca. 12 ml eiskaltem Waschpuffer abgespült und die nun gesammelte Suspension bei 1000 RPM für 7 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert, die Zellen gepoolt, erneut bei 1000 RPM für 7 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml Wachstumsmedium aufgenommen, um sie mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auszuzählen. Die Zellsuspension wurde auf eine finale Konzentration von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt und zur Infektion nach Protokoll ausgesät.

6.1.2.5 Gewinnung von L929-Überständen

Um ein konditioniertes Medium für die Zucht von BMDMs herzustellen, wird eine Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF)-Quelle benötigt, die dem Kulturmedium (*growth* und *replating* Medium) mittels L929-Zellkulturüberständen zugefügt wird. Hierzu wurde ein Cryostock L929-Zellen aufgetaut, in 10 cm Zellkulturplatten in Zellkulturmedium gegeben und

im Inkubator bis zu ihrer Konfluenz kultiviert, anschließend mit Trypsin/EDTA behandelt, in 10,5 ml Medium resuspendiert und jeweils 2 ml Zellsuspension in eine T175 Zellkulturflasche mit 100 ml RPMI + 10 % FCS gegeben. Unter täglicher mikroskopischer Wachstumskontrolle wurden die Zellen kultiviert bis ein konfluenter Zellrasen vorhanden war und anschließend weitere 10 Tage. Nach 10 Tagen wurden die Überstände abgenommen, steril-filtriert und in Falcon-Gefäße zur Lagerung bei -80°C gegeben.

6.1.2.6 Zell-Linie RAW 264.7

Bei der RAW 264.7-Zelllinie handelt es sich um adhärenente Makrophagen, die ursprünglich aus einem murinen Ableson-Leukämie-Virus induziertem Tumor stammen. Zur Kultivierung wurden die Zellen in geeignetem Kulturmedium gehalten und zur Passagierung mit PBS gewaschen und anschließend mit 2,5 %iger Trypsinlösung am Boden ihrer Kulturflasche bedeckt. Die Lösung inkubierte 3 min bei 37°C, durch Zugabe FCS-haltigen Mediums wurde anschließend die Ablösung der Zellen gestoppt und die Suspension gelöster Zellen bei 1000 RPM für 7 min zentrifugiert. Nach Resuspendierung des entstandenen Zellpellets wurden die L929-Zellen in einer Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml ausgesät und bis zur Infektion kultiviert.

6.1.2.7 Zelllinie THP-1

Die humane monozytäre Zelllinie THP-1, immortalisiert durch eine akute monozytäre Leukämie wurde in Suspensionskultur in 30 ml FCS-haltigem RPMI-Medium und einer Dichte bis maximal 2×10^6 Zellen/ml in T125 Kulturflaschen gehalten. Sie wurden alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium versorgt und regelmäßig im Verhältnis 1:4 passagiert, um optimale Kulturbedingungen zu schaffen. Für Infektionsversuche wurden die THP-1-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingesetzt, wobei die Zellen lediglich bis zu ihrer 30. Passage genutzt wurden.

6.1.3 RNA-Interferenz

Um die Rolle einzelner Proteine im Rahmen einer Signalkaskade analysieren zu können, kann durch die Methode des *RNA-Silencing* spezifisch die Synthese von bestimmten Proteinen durch das Einbringen von *small interfering RNA* verhindert werden.

Hierbei wurden humane PBMCs nach Isolation aus *buffy coats* mit Hilfe eines Nucleofector™ (Amaxa), den Herstellerangaben für das Human Monocyte Nucleofector™ Kit folgend, unter

Zugabe von 5 µg siRNA je 1 x 10⁷ Zellen und Verwendung des Programms Y-01 transfiziert. 72 Stunden nach erfolgreicher Transfektion wurden die PBMCs für Stimulationsversuche verwendet.

6.1.3.1 Small interfering RNAs (siRNAs)

Die verwendeten siRNAs wurden von Ambion® bezogen oder von MWG Biotech synthetisiert.

Tabelle 6-3 siRNA-Sequenzen

siRNA		Sequenz
control	sense	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUtt
	antisense	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAAtt
NLRP3	sense	5'-GGUGUUGGAAUUAGACAACt
	antisense	5'-GUUGUCUAAUCCAACACctg

6.2 Mikrobiologische Methoden

6.2.1 Bakterienkultur

Die Bakterienstämme wurden in Cryostocks bei -80°C gelagert. Sämtliche Medien wurden für 15 min bei 121°C autoklaviert. Arbeiten wurden in Laboren der Sicherheitsstufe 2 unter Sterilbänken mit laminarer Strömung durchgeführt. Alle mit kontagiösen Arbeitsmitteln in Kontakt gekommene Materialien wurden autoklaviert und den Richtlinien entsprechend entsorgt.

Tabelle 6-4 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Merkmale	Bezugsquelle
D39	Wildtyp Serotyp 2 <i>S. pneumoniae</i>	National Collection of Type NTCT 7466 Cultures, UK
D39Δply	Isogenetische Pneumolysin negative Mutante PLN-A (Berry et al., 1989)	T. Mitchell, University of Glasgow
R6x	unkapselte Serotyp 2 Mutante (Moynet et al., 1980)	S. Hamerschmidt, Universität Greifswald
R6xΔply	Isogenetische Pneumolysin- negative Mutante	S. Hamerschmidt, Universität Greifswald
pAHS1	Revertante, exprimiert Ply Domäne 1 bis 3	T. Mitchell, University of Glasgow

pAHS2	Revertante, exprimiert Ply Domäne 4	T. Mitchell
pAHS3	Revertante, exprimiert wt Ply	T. Mitchell
pAHS6	Revertante, exprimiert RFP- gekoppeltes Ply	T. Mitchell
Serotyp I	Klinisches Isolat (Krikham et al., 2006)	T. Mitchell

6.2.2 Lagerung und Anzucht

Zur Aufbewahrung wurde ein Bakterienstock angelegt und bei -80°C in THY-Medium (30 g Todd-Hewitt-Broth (BD Microbiologie), supplementiert mit 5 g Hefeextrakt (Sigma), Aqua bi-dest ad 1000 ml) plus 20 % 99 %igem Glycerol (Sigma) gelagert.

16 h vor der Stimulation mit *S. pneumoniae* wurde der betreffende Stamm auf einer vorgewärmten Columbia-Agarplatte mit 5 % Schafsblut (BD Mikrobiologie), gegebenenfalls mit 40 μl eines entsprechenden Selektionantibiotikums (D39 Δ ply Erythromycin [1 mg/ml], pAHS1-3 sowie pAHS6 jeweils Erythromycin [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$]) vorbehandelt, in einem Verdünnungsausstrich aufgetragen und für 8-10 h in einem Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 bebrütet. Am nächsten Morgen wurden mit Hilfe eines sterilen Wattestäbchens einzeln stehende Kolonien aufgenommen und in vorgewärmtes THY-Medium (37°C 10 ml, ohne Antibiose) überführt. Es wurde eine OD (optischen Dichte) von 0,045-0,06 eingestellt und die Bakteriensuspensionen erneut im Inkubator bei 37°C , 5 % CO_2 unter mikroaerophilen Bedingungen wachsen gelassen, bis nach 2-3 h das Bakterienwachstum die log-Phase (bei photometrischer Bestimmung OD 0,2-0,4, entspricht $2-4 \times 10^8$ Kolonie-bildenden Einheiten/ ml) erreicht hat. In dieser bakteriellen Wachstumsphase haben die Pneumokokken ihre höchste Virulenz zur Infektion der Zellkulturen erreicht.

6.2.3 Zellstimulation

Zur Infektion wurde nach Bestimmung der OD die Bakteriensuspension für 10 Minuten bei 1800 g in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Bakterienpellett in RPMI 1640 Medium (Gibco) so resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^8 CFU/ ml erreicht wurde. Für die Stimulation wurde die Suspension in 1:10 Verdünnungsschritten auf die zu erreichende Zielkonzentration titriert. Für die Stimulation von BMMs wurde das alte Medium abgesaugt und durch die Bakteriensuspension ersetzt, für die Stimulation der PBMCs wurde das gleiche Volumen einer doppelt konzentrierten Bakteriensuspension zum Zellkulturmedium gegeben.

Je nach Versuchsprotokoll wurde eine halbe Stunde vor Stimulation das Kulturmedium erneuert und ein chemischer Inhibitor hinzu gegeben.

Zum Teil erfolgte die Zellstimulation nicht durch bakterielle Infektion, sondern durch Zugabe von aufgereinigtem Pneumolysin und dessen trunkierten Formen, entsprechend den Pneumokokken-Revertanten pAHS1-3.

6.2.4 Chemische Inhibitoren

Tabelle 6-5 Chemische Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
KCl	Merck
NaCl	Merck
Z-YVAD-FMK	Alexis® Biochemicals

6.2.5 Stimulantien

Durch Zugabe von aufgereinigtem Pneumolysin, die freundlicherweise von Prof. T. Mitchell, University of Glasgow, zur Verfügung gestellt wurden, konnte ein Vergleich zur bakteriellen Stimulation von Zellen aufgestellt werden. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Die Bezeichnung der verschiedenen Pneumolysinvarianten ist wie folgt: Wildtyp-Pneumolysin aus D39 oder pAHS3 (wt Ply), Pneumolysin, das nur die porenbildende Domäne enthält aus pAHS1 (D1-3), Pneumolysin, das nur die Cholesterin-bindende Domäne enthält aus pAHS2 (D4) als Trunkationsformen, sowie aus Serotyp I Pneumokokken gewonnenes Allel 5-Ply.

Tabelle 6-6 Pneumolysin

Pneumolysin	Merkmale	Herkunft
wt Ply	hämolytisch aktiv	aus D39 oder pAHS3 Pneumokokken
D1-3	enthält die porenbildende Domäne	aus pAHS1 Pneumokokken
D4	enthält die Cholesterin-bindende Domäne	aus pAHS2 Pneumokokken
Allel 5 Ply	nicht hämolytisch aktiv	aus Serotyp I Pneumokokken

6.2.6 Hämolysetest

Es wurde zur Prüfung der hämolytischen Potenz sowohl von aufgereinigtem PLY als auch verschiedener Pneumokokkenstämme ein Hämolysetest verwendet, der sich am Protokoll der Aufbereitung des Blutes an den Angaben nach Jefferies et al. (2007) und zur Behandlung der Probenplatten und abschließender Beurteilung der Lyse an Benton et al. (1997) orientiert.

Zusammenfassend wurde hierzu 10 ml humanes Blut, aus einer peripheren Vene entnommen, mit 150 I.E. Heparin gemischt, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen gegeben und bei 2200 RPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Serum, Plasma) wurde abgenommen und die Schicht der Erythrozyten zuerst dekantiert und anschließend in 10 ml PBS resuspendiert. Nach Schwenken des befüllten Zentrifugationsröhrchen wurde der oben beschriebene Zentrifugationsschritt noch zweimal wiederholt, von der erhaltenen Erythrozytensuspension 1 ml abgenommen und auf 49 ml PBS gegeben. Mit dem 2 %igen gewaschenen Blut wurde der Infektionsversuch begonnen.

Für die Vorbereitung der Proben wurde entweder 1 µg aufgereinigtes Pneumolysin in 1000 µl PBS gelöst und die Hämolyseeigenschaften des Toxins der verschiedenen Revertanten untersucht oder es wurde ein Pneumokokkenlysat nach folgendem Protokoll hergestellt:

Nach über-Nacht-Kultur der zu untersuchenden Pneumokokkenstämme wurden Kolonien in 20 ml THY-Medium angeimpft und im Inkubator bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,6 wachsen gelassen. Anschließend wurden die Stämme für 18 min bei 4000 x g bei 4°C zentrifugiert, das entstandene Bakterienpellet in 1 ml Lysispuffer (25 mM Tris und 50 mM NaCl zuzüglich je 5 µl Proteinaseinhibitoren Pepstatin, Leupeptin und Antipain) resuspendiert, die Suspension für eine Stunde bei 4°C mit 5 mg/ml Lysozym stehen gelassen und anschließend 4 x 30 sek mittels Ultraschall behandelt. Unter der Annahme, dass eine OD von 0,1 1 x 10⁸ CFU/ ml entspricht, wurden für den Versuch, orientiert am geringst konzentrierten Pneumokokkenstamm, in jedem Reaktionsvolumen die angegliche absolute Menge an Pneumokokkenlysat eingesetzt.

Hierzu wurde in eine 96-Loch-Platte mit U-förmigem Boden 50 µl PBS in jedes Loch vorgegeben, jeweils in die oberste Reihe 50 µl Probe zugefügt. Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Mit einer Reihenverdünnung um jeweils 1:2, unter Wechsel der Pipettenspitze nach jeder Verdünnungsstufe und vorsichtigem Durchmischen durch Auf- und Abpipettieren, wurde eine finale Verdünnung der Probe um 1:256 erreicht. Anschließend wurde in jede Reaktionsvertiefung mit vorgelegter Probe 50 µl des 2 %igen Blutes gegeben, für 30 min im Inkubator und anschließend 30 min bei Raumtemperatur inkubieren gelassen und schließlich

die Platte bei 1100 RPM für 10 min zentrifugiert. Als Endpunkt wurde die 50 %-Lyse genommen und das Ergebnis photographisch dokumentiert.

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 RNA-Isolierung

Um die Gesamt-RNA aus Zellen zu isolieren, wurden die kommerziellen Kits QIAshredder und RNeasy nach Herstellerangaben verwendet. Nach erfolgter Isolation wurde die RNA-Konzentration mittels photometrischer Extinktion (Messung in einer Quarzküvette mit BioPhotometer) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer 1:100 Verdünnung RNA: destilliertem Wasser bestimmt. Zur Berechnung der RNA-Konzentration wurde die Formel

$$\text{OD}_{260} \times 4 = \text{RNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

herangezogen. Zum Ausschluss von Proteinverunreinigung wurde der Quotient OD₂₆₀ (Absorptionsmaximum RNA) zu OD₂₈₀ (Absorptionsmaximum Proteine) gebildet, wobei dieser sich bei Vorliegen von reiner RNA in einem Zielbereich von 1,7 und 1,9 befand.

Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80°C.

6.3.2 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription von RNA zu cDNA erfolgte bei späterer Verwendung der cDNA für semi-quantitative PCR mit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) nach Herstellerprotokoll. Zur reversen Transkription von RNA zu cDNA für einen Einsatz zur quantitativen PCR wurde das High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) nach Herstelleranleitung verwendet. Vor Verwendung der cDNA für ihre Analyse mittels qPCR wurden die Proben bei -20°C gelagert und unmittelbar vor der PCR auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

6.3.3 Quantitative PCR

Um die Genexpression auf der Ebene der mRNA nach Infektion von Zellen und konsekutiver Induktion bzw. Inhibition bestimmter Gene zu analysieren, wurde die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Hierfür wurde das 7300 Real Time PCR System genutzt und die cDNA mittels TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) für NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12 und GAPDH amplifiziert. Die mRNA Expression des zu analysierenden Gens wurde mit der mRNA Expression des Haushaltsgens GAPDH (konstitutiv exprimiertes Gen) abgeglichen. Die Probenzusammensetzung war Folgende:

Reagenz	Menge
cDNA	5µl
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)	12,5µl
TaqMan® Gene Expression Assay-on-Demand (20 µM)	1,25µl
Nuklease-freies Wasser	6,25µl

Die einzelnen Ansätze wurden in MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plates (Applied Biosystems) pipettiert und mit entsprechendem adhäsivem Film verschlossen. Die qPCR lief unter folgenden Bedingungen: 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40x (95°C 15 sek, 60°C 1 min) und wurde mittels 7300 System Sequence Detection Software Version 1.4 ausgewertet.

6.4 Biochemische Methoden

6.4.1 Enzyme linked immunosorbend assay (ELISA)

Um nach längeren Infektionszeiten und in Abhängigkeit verschiedener Inflammasome und bakterieller Toxine die Konzentration verschiedener Zytokine in Zellüberständen zu messen, wurden die kommerziellen Kits BD OptEIA™ Human IL-1β ELISA Set II, das BD OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set, der Mouse IL-1β ELISA Ready-SET-Go! bzw. der Mouse TNF-α ELISA Ready-SET-Go! verwendet und nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierfür konnten die Zellüberstände von adhärenen Zellen direkt abgenommen werden, Suspensionszellen wurden für 10 Minuten bei 1000 RPM abzentrifugiert und die Überstände zum Teil mit Assay diluent nach Herstellerangaben verdünnt. Für die photometrische Auswertung wurde das Plattenlesegerät MR5000 bei einer Wellenlänge von 450 nm verwendet.

6.4.2 Western blot

Tabelle 6-7 Reagenzien für Western blot

Western blot	Zusammensetzung	Hersteller
Phosphoprotein- waschpuffer	5 ml Natriumorthovanadat (200 mM)	Sigma-Aldrich®
	50 ml Natriumpyrophosphat (150 mM)	Sigma-Aldrich
	50 ml Natriumfluorid (1 M)	Sigma-Aldrich®
	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-Aldrich®
	1 µl EDTA (250 mM)	Roth

	50 µl Nonidet™ P-40	Sigma-Aldrich®
	10 µl PMSF (1 mM)	Sigma-Aldrich®
	je 5 µl Antipain, Leupeptin, Pepstatin (10 µg/ml)	Sigma- Aldrich®
	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-Aldrich®
	800 µl Glycerol	Sigma-Aldrich®
	16 ml SDS (10% w/v)	Serva
	400 µl Bromphenolblau (1% w/v)	Sigma-Aldrich®
	400 µl β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich®
	ad 5 ml Aqua bidest	
Laufpuffer	3 g Tris-Base	Sigma-Aldrich®
	14,4 g Glycin	Merck
	1 g SDS	Serva
	ad 1 l Aqua bidest	
Blotpuffer	3 g Tris-Base	Sigma-Aldrich®
	14,4 g Glycin	Merck
	200 ml Methanol	Merck
	ad 1 l 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-Aldrich®
	50 ml Essigsäure (100%ig)	Merck
	ad 1 l Aqua bidest	
Sammelgel	2,5 ml Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	Sigma-Aldrich®
	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/v)	Serva
	ad 10 ml Aqua bidest	
Trenngel 16%ig	2,5 ml Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	Sigma-Aldrich®
	100 µl SDS (10% w/v)	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-Aldrich®

	100 µl SDS (10% w/v)	Serva
	3,25 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	
Waschpuffer	5 l Dulbecco´s PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG
	5 ml Tween 20	Sigma-Aldrich®

Tabelle 6-8 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

Nach Infektion von THP-1 Zellen mit Pneumokokken (Vergleich zwischen R6x und R6xΔply) mit 1×10^6 beziehungsweise 1×10^7 CFU/ ml für 16 h wurden die Zellen einmal mit Phosphoproteinwaschpuffer und anschließend in Gesamtproteinlysepuffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 10 Minuten bei 12000 RPM zentrifugiert und der Gesamtproteingehalt des so gewonnenen Überstandes mittels Bradford-Methode (Bio-Rad Protein Assay: 20% Bio-Rad Protein Assay mit 80% Aqua bidest mischen, 5µl Proteinüberstand zu 995µl des Reagenz in Einmalküvetten und anschließende Messung nach 5 Minuten Inkubationszeit in einem BioPhotometer bei 595nm) ermittelt.

Da IL-1β lediglich in geringen Konzentrationen in den Zellüberständen zu finden ist, musste zur Detektion durch Western blot der Proteingehalt aufkonzentriert werden. Hierfür wurden 100µl Zellüberstand in einem Microcon Ultracel YM-3 Centrifugal Device für 30 Minuten bei 12.000 RPM zentrifugiert, wodurch etwa 20µl eines Proteinkonzentrats gewonnen werden konnte. Zur Probenvorbereitung für den Abklatsch wurde eine definierte, mittels Bradford-Reaktion zuvor ermittelte Gesamtproteinmenge beziehungsweise 20µl der aufkonzentrierten Zellüberstände nach Zugabe von 4x Laemmli-Puffer und Inkubation für 5 Minuten bei 95°C vorbereitet. Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer spezifischen Größe und Ladung wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit einem 16%igen SDS-Gel durchgeführt. Die Bedingungen hierfür waren: 1h Laufzeit bei einer Spannung von 100V in einem mit Laufpuffer gefüllten Mini-Protean Tetra Electrophoresis System. Für den Proteinabklatsch wurde ein elektrophoretischer

Membrantransfer der Proteine unter Verwendung von Hybond-Nitrozellulosemembranen in einer Blotpuffer-gefüllten Mini Trans-Blot Cell nach Herstellerprotokoll für 1h bei einer Spannung von 100V und 4°C durchgeführt. Vor der Antikörperbehandlung wurde die Membran reversibel mit Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit Blockpuffer für 1h geblockt, um im Folgenden den Antikörpern eine spezifischere Bindung zu ermöglichen. Der primäre Antikörper gegen IL-1 β (17 kDa, Spezies Kaninchen, Cell Signaling) bzw. Aktin (60kDa, Spezies Ziege, Santa Cruz) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, nach 3 Waschschritten von je 10 Minuten mit PBS+ TWEEN wurde die Membran für eine Stunde mit einem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser ist gegen die Herkunftspezies (anti-Kaninchen-IgG, Spezies Ziege, gekoppelt an Cy5.5, Licor®; anti-Ziege-IgG, Spezies Esel, gekoppelt an IRDye800, Licor®) des primären Antikörpers gerichtet. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran zweimal mit PBS+ TWEEN und abschließen einmal mit PBS für 10 Minuten gewaschen, Zur Detektion wurde das Odyssey® Infrared Imaging System genutzt, die Auswertung erfolgte anschließend mit der Odyssey® 3.0 Software.

6.5 Statistik

Alle gezeigten Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Student's t-Tests (gegebenenfalls mit Welch- Korrektur) oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (One-way ANOVA) 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® Version 4 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, es sei denn die Abbildungsunterschrift kennzeichnet anderweitiges Vorgehen.

7 Ergebnisse

Wie aus bisherigen Untersuchungen hervorgeht (Houldworth et al., 1994; Shoma et al., 2008), führt eine Infektion mit *S. pneumoniae* zu einer Caspase-1 abhängigen Produktion von IL-1 β *in vitro*. Die zugrunde liegenden Mechanismen waren hierbei jedoch weitgehend ungeklärt, auch war zu Beginn der Untersuchungen nicht bekannt, ob ein und ggf. welches Inflammasom mit welchem bakteriellen Faktor funktionell interagiert, um die IL-1 β -Produktion in Pneumokokken-infizierten monozytären Zellen zu vermitteln. Daher wurden in dieser Studie die für die IL-1 β -Produktion essentiellen Faktoren, sowohl auf Seite des Pathogens als auch auf Seite des Wirts, charakterisiert und die Signaltransduktion in monozytären Zellen analysiert. Die Ergebnisse werden, unter einigen Ergänzungen, dargestellt wie in unserer Veröffentlichung, die auf den Ergebnissen dieser Arbeit sowie zusätzlichen Mausexperimenten beruht (Witzenrath et al., 2011).

7.1 Die Pneumokokken-induzierte IL-1 β -Ausschüttung in monozytären Zellen ist abhängig vom bakteriellen Toxin Pneumolysin

Um die Hypothese zu prüfen, dass Inflammasome an der Wirtszellantwort auf eine *S. pneumoniae*-Infektion beteiligt sind wurde zunächst die IL-1 β -Produktion als *readout* für Inflammasomaktivierung gemessen.

Hierfür wurden zunächst murine BMMs mit Wildtyp Serotyp 2 Pneumokokken (D39) oder mit Ply-defizienten D39 Pneumokokken (D39 Δ ply) infiziert.

Eine robuste Produktion von IL-1 β mRNA erfolgte nach Infektion der BMMs sowohl mit Ply-suffizienten als auch Ply-defizienten Pneumokokken (Abb. 7-1-1 A). Im Gegensatz dazu war IL-1 β in den Zellüberständen nur nach Infektion mit Ply-suffizienten Wildtyp Bakterien, nicht jedoch nach Infektion mit Ply-defizienten Pneumokokken detektierbar. Wie erwartet konnte das Inflammasom-unabhängig produzierte Zytokin TNF α in den Zellüberständen sowohl der mit WT D39 als auch der mit D39 Δ ply infizierten Makrophagen gemessen werden (nicht gezeigte Daten).

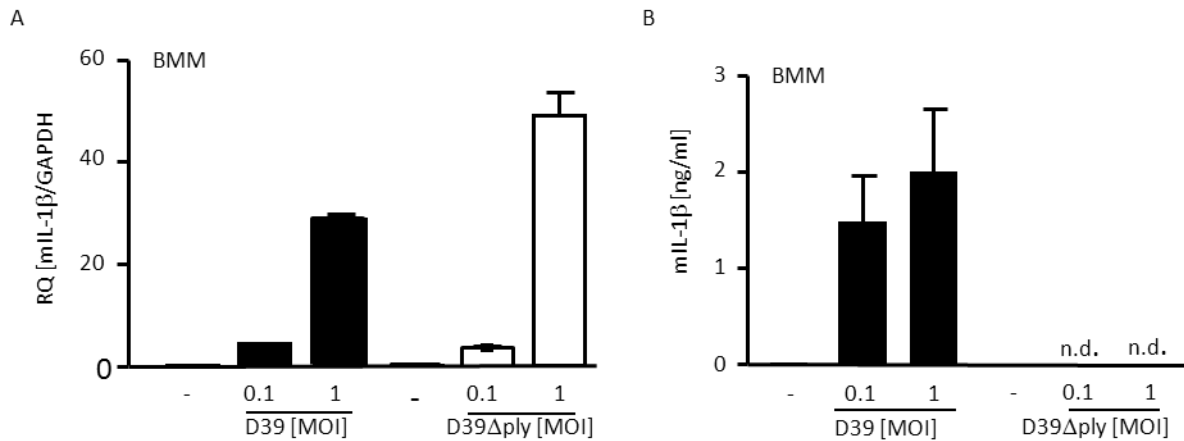


Abbildung 7-1-1 Die Produktion von IL-1 β in *S. pneumoniae*-infizierten murinen Makrophagen ist abhängig von Ply

A und B: C57BL/6 BMMs wurden mit D39 Wildtyp oder Ply-defizienten D39 (D39 Δ ply) *S. pneumoniae* für 6 (A) oder 16 (B) Stunden infiziert. A: Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Expression von IL-1 β mRNA bestimmt. B: IL-1 β -Konzentrationen in Zellüberständen wurden mit einem ELISA quantifiziert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (\pm SEM) von zwei (A) bzw. drei (B) unabhängigen, in Triplikaten durchgeführten Experimenten. n.d.: nicht detektierbar, MOI: *multiplicity of infection* (Infektionsdosis).

Zusätzlich sollte auch geprüft werden, ob auch in humanen Zellen IL-1 β abhängig von Ply produziert wird. Hierfür wurde der unkapselte Serotyp 2-Pneumokokkenstamm R6x sowie eine entsprechende Ply-defiziente Mutante eingesetzt. Es wurden frisch isolierte *peripheral blood monocyctic cells* (PBMCs) (Abb. 7-1-2 A und B) und zum Vergleich Kulturen der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 (Abb. 7-1-2 C) für 16 Stunden mit Ply-suffizienten und -defizienten R6x infiziert. Die IL-1 β -Produktion wurde mittels ELISA bzw. Western blot getestet. Auch in diesen humanen Zellen bzw. bei Infektion mit kapsellosen Bakterien zeigte sich, dass Pneumokokken abhängig von Ply die IL-1 β -Produktion stimulieren. Im Gegensatz dazu waren beide Pneumokokkenstämme in der Lage, die Produktion des Inflammasom-unabhängig produzierten Zytokins IL-8 in gleichem Ausmaß zu induzieren (nicht gezeigte Daten).

Zusammenfassend zeigen diese Versuche, dass die IL-1 β -Produktion in der *S. pneumoniae*-Infektion von murinen und humanen monozytären Zellen abhängig von Ply ist.

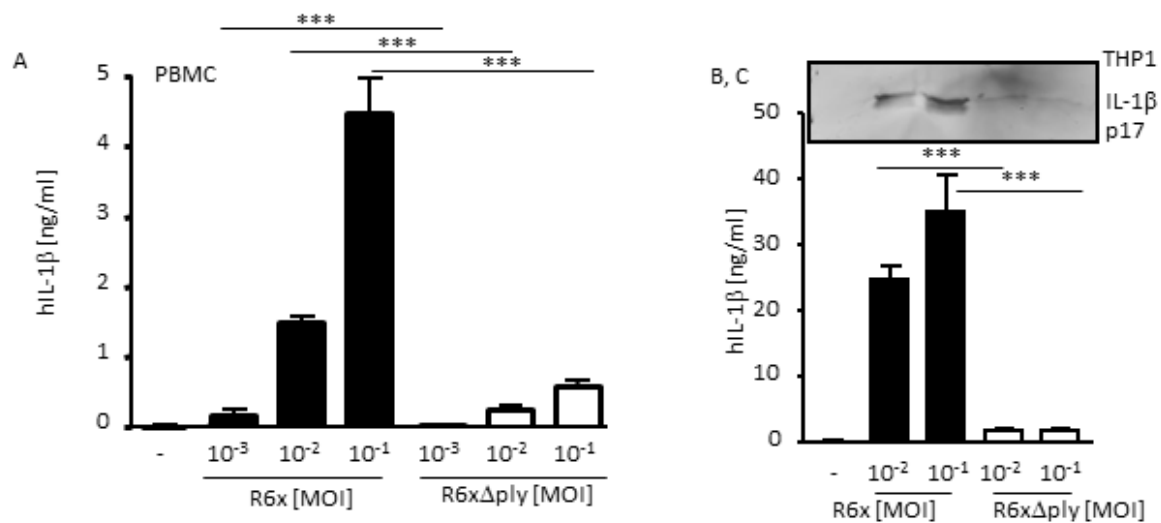


Abbildung 7-1-2 Die Produktion von IL-1β in *S. pneumoniae*-infizierten humanen monozytären Zellen ist abhängig von Ply

A und B: humane PBMCs und adhärenente THP-1 Zellen (C) wurden mit R6x Wildtyp oder Ply-defizienten R6x (R6xΔply) *S. pneumoniae* für 16 Stunden infiziert. Zellfreie Überstände wurden mittels quantitativer ELISA und (C) Western blot auf IL-1β-Konzentrationen untersucht. Die gezeigten ELISA-Daten zeigen Mittelwerte (\pm SEM) aus drei voneinander unabhängigen in Triplikaten durchgeführten Experimenten bzw. einen repräsentativen Western blot von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit drei Sternen ($p < 0.001$) markiert.

7.2 Die Pneumokokken-induzierte IL-1β-Ausschüttung ist abhängig von der Expression eines vollständigen Poren-bildenden Pneumolysins

Um zu überprüfen, welcher Bestandteil von Ply die IL-1β-Produktion vermittelt, wurden weitere Versuche in murinen und humanen monozytären Zellen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen entweder mit vollständigem oder trunkierten, aufgereinigtem Ply aus D39-Wildtyp-Bakterien stimuliert oder mit D39-Bakterienmutanten infiziert, die ein vollständiges oder trunkiertes Ply exprimierten. Bei den Bakterienmutanten handelte es sich um Pneumokokkenrevertanten, die lediglich die eingangs beschriebenen zur Porenbildung notwendigen Domänen 1-3 (D1-3) exprimierten oder ausschließlich die zur Cholesterol-Bindung notwendige Domäne 4 (D4) bildeten

(s. Tabelle 6-4). Die Stimulation auf subkonfluenten Zellkulturen erfolgte mit einer Ply-Konzentration von 0,5 µg/µl.

Die Abbildung 7-2 A zeigt, dass eine Stimulation der humanen Zellen mittels Ply alleine eine robuste IL-1β-Produktion in die Zellüberstände bewirkt. Demgegenüber führt die Stimulation mit trunkierten D1-3- oder D4-Toxinen zu keiner detektierbaren IL-1β-Produktion in den untersuchten Zellen. Hierbei zeigte es sich in den Versuchen als unerheblich, ob Ply dem Kulturmedium zugesetzt wurde oder mittels Transfektionsreagenz Saint PhD in die Zellen transfiziert wurde (Daten nicht gezeigt).

Die IL-1β-stimulierende Aktivität der aufgereinigten Toxine korreliert direkt mit den hämolytischen Aktivitäten. So zeigte sich im Hämolysetest (dargestellt in Abbildung 7-2 B), dass nur das vollständige Ply, nicht jedoch die Trunkationsvarianten D1-3 und D4 Erythrozyten lysierten. Die Hämolyse ist ein visueller Indikator für die Poren-bildende und Membran-bindende Potenz des jeweiligen Ply. Für wt Ply entsprach der Punkt der 50%-Lyse einer Ply-Konzentration von 0,0625 µg/ml, für trunkierte Ply-Varianten konnte keine Hämolyse selbst nach Stimulation mit deutlich höheren Konzentrationen nachgewiesen werden. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass nur vollständiges, porenbildendes Ply die IL-1β-Produktion in humanen PBMCs verursacht.

Als nächstes sollte nun nachvollzogen werden, ob sich im Infektionsversuch durch Revertanten auf BMMs und im Hämolysetest mit verschiedenen Serotyp 2-Pneumokokkenlysate die Hypothese bestätigen ließe. Es zeigte sich, dass nur Pneumokokken, die vollständiges, porenbildendes Ply exprimieren, eine IL-1β-Produktion und eine Hämolyse der Erythrozyten als Maß für hämolytische/porenbildene Aktivität stimulieren (Abbildung 7-2 C und D). Anders als die Bildung von IL-1β war die Pneumokokken-stimulierte TNFα-Produktion in BMMs unabhängig von porenbildenen Ply (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl in humanen als auch murinen Wirtszellen vollständiges, porenbildendes Ply für die Aktivierung einer IL-1β-Produktion notwendig ist.

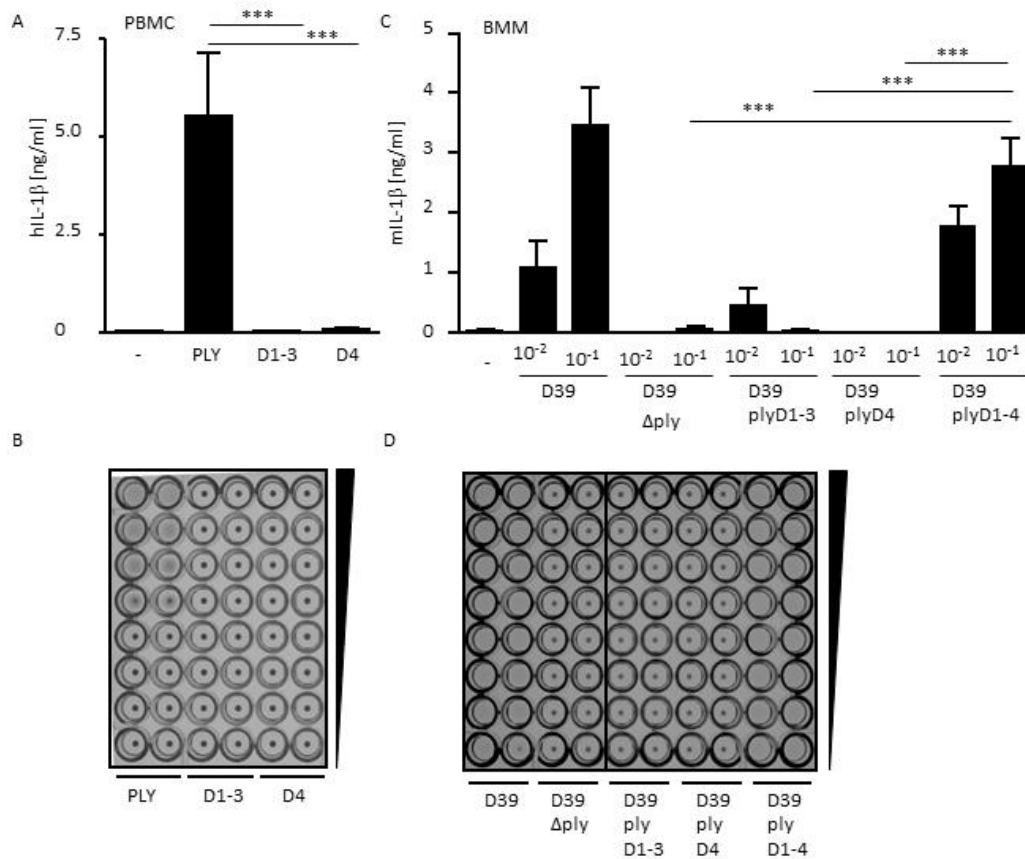


Abbildung 7-2: Vergleich der IL-1 β -Produktion nach Stimulation von monozytären Zellen mit aufgereinigtem Pneumolysin oder Infekton mit Revertanten sowie Hämolysekapazität

A: Humane PBMCs wurden mit Wildtyp-Ply oder PLY-Trunktionsvarianten (D1-3 und D4) stimuliert. Die Produktion von IL-1 β in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels eines spezifischen ELISAs untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von drei repräsentativen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. B und D: Eine Suspension von 2% humanen Erythrozyten in PBS wurde für insgesamt 60 Minuten mit aufgereinigtem Pneumolysin (B) bzw. Serotyp 2-Pneumokokkenlysaten (D) in serieller Verdünnung in 1:2 Schritten inkubiert, begonnen mit einer finalen Konzentration 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (B) bzw. $9,8 \cdot 10^7$ CFU/ml, zur Visualisierung abzentrifugiert und unter Bodenbeleuchtung fotografiert. Knopfbildung bedeutet fehlende Hämolyse. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchen. C: Murine BMMs wurden mit *S. pneumoniae* D39 Wildtyp, Δply oder Revertanten, welche Ply D1-3, Ply D4 oder Ply D1-4 exprimieren, infiziert. Die Produktion von IL-1 β in den zellfreien Überständen wurde 16 h später mittels eines spezifischen ELISAs untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von drei in Triplikaten durchgeführten, repräsentativen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet

7.3 Nicht-hämolytisches Ply exprimierende Serotyp 1 ST306- und Serotyp 8 ST53-Pneumokokken stimulieren keine IL-1 β -Produktion

Wie eingangs erwähnt werden gerade Pneumokokken-Serotypen, die ein nicht-hämolytisches Allel 5-Ply exprimieren, insbesondere Serotyp 1 ST305 und Serotyp 8 ST53, häufig bei invasiven Pneumokokkeninfektionen isoliert (Weinberger et al., 2010). Um die hämolytische Aktivität von Serotyp 1 Pneumokokken zu testen, wurden zunächst Hämolysetests mit Lysaten von Wildtyp D39-Pneumokokken im Vergleich zu Serotyp 1-Pneumokokken ST306 sowie mit aufgereinigtem Allel 5-Ply im Vergleich zu Wildtyp-Ply durchgeführt. Dargestellt in Abbildung 7-3-1 A und B zeigte sich lediglich eine geringgradige hämolytische Aktivität von Serotyp 1 Pneumokokken bzw. durch ihr isoliertes Pneumolysin auf humane Erythrozyten.

Die Infektion von PBMCs mit Serotyp 1 ST306-Pneumokokken führte anders als die Infektion mit Serotyp 2 D39-Pneumokokken nicht zur Produktion von IL-1 β (Abbildung 7-3-1 C). Hingegen konnte die Produktion des Inflammasom-unabhängigen Zytokins IL-8 durch beide Pneumokokken-Serotypen stimuliert werden (Abbildung 7-3-1 D). Durch die Stimulation von humanen PBMCs mit Allel 5 Pneumolysin im Vergleich zu wt Ply zeigt sich der gleiche Effekt einer robusten IL-1 β -Produktion in Abhängigkeit von der hämolytischen Poren-bildenden Aktivität des Ply (Abb. 7-3-1 E).

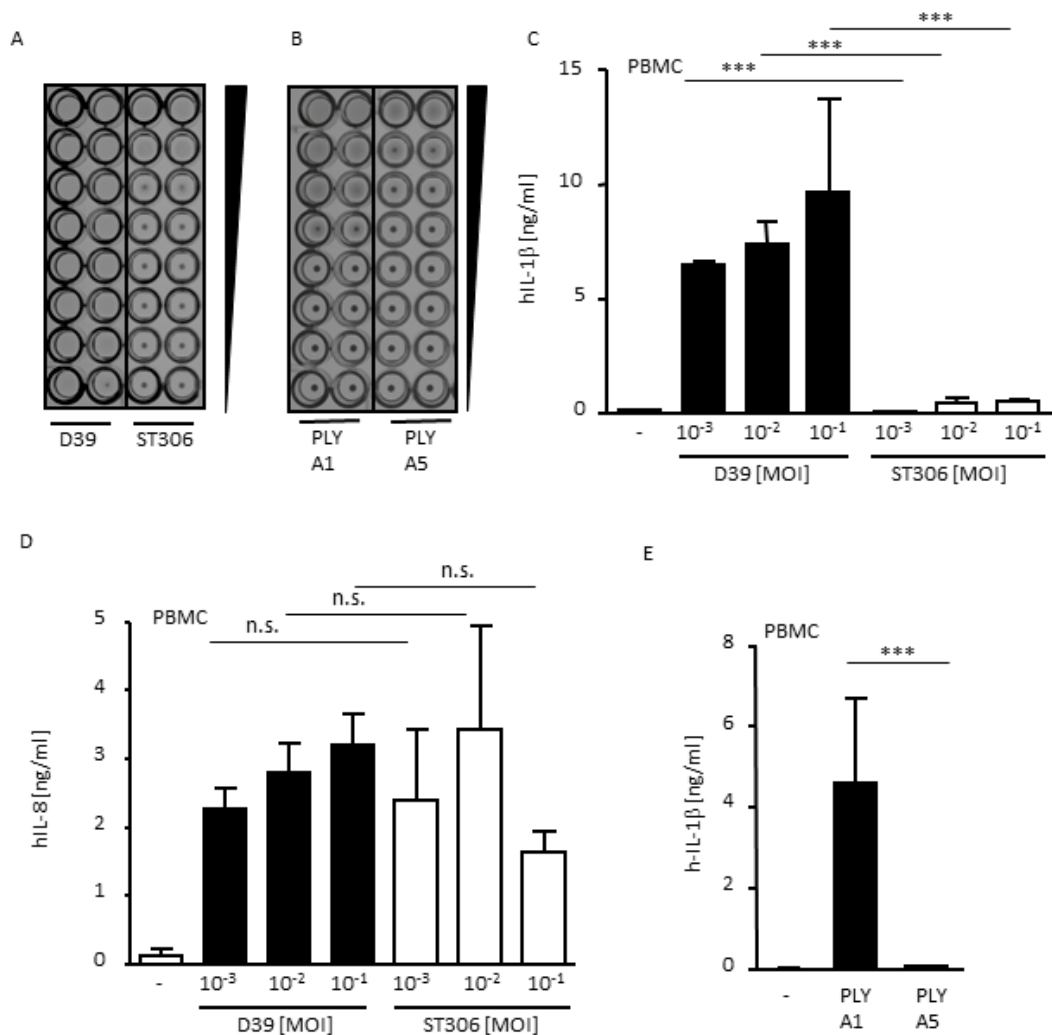


Abbildung 7-3-1: Allel 5-Ply exprimierende Serotyp 1 ST306-Pneumokokken induzieren keine IL-1β-Produktion in humanen monozytären Zellen

A und B: Humanes Vollblut wurde mit D39 Serotyp 2- oder Serotyp 1 ST306-Pneumokokkenlysate (A) bzw. mit Allel 1-Ply oder Allel 5-Ply inkubiert, um die hämolytischen Fähigkeiten zu testen. C, D und E: Humane PBMCs wurden mit D39- oder ST306-Pneumokokken infiziert (C und D) bzw. mit aufgereinigtem Allel 1- und Allel 5-Ply stimuliert und die zellfreien Überstände nach 16 Stunden mittels ELISA auf IL-1β (C und E) und IL-8 (D) untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (± SEM) von drei repräsentativen Experimenten, in Triplikaten durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede mit n.s.

Wie eingangs beschrieben unterscheiden sich nicht nur Pneumokokkenserotypen, sondern es unterliegt auch ein hochkonserviertes bakterielles Protein wie Pneumolysin einer geringen genetisch determinierten Variabilität. Die IL-1β-Produktion nach 16 Stunden Infektion mit Serotyp 1

Pneumokokken ST306 war im Vergleich zur Infektion mit wt Serotyp 2 D39 Pneumokokken mittels ELISA nicht nachweisbar (Abb. 7-3-2 A). Im Weiteren wurden andere Pneumokokken-Serotypen, die ein atypisches Allel 5 Ply exprimieren, auf ihre Fähigkeit, eine IL-1 β -Produktion zu induzieren geprüft. Während ST217 (aus Serotyp 1 Pneumokokken, die ein hämolytisch aktives Ply produzieren) dosisabhängig die Produktion einer geringen Menge IL-1 β stimulieren konnten, war nach Infektion von BMMs mit ST191 (aus Serotyp 7F Bakterien, die Ply mit geringer hämolytischer Aktivität produzieren) kaum und nach Infektion mit ST53 (aus Serotyp 8 Bakterien mit fehlender hämolytischer Aktivität des Allel 5 Plys) kein IL-1 β im Zellüberstand nachweisbar (Abb. 7-3-2 B). Alle drei getesteten Allel 5 Ply-exprimierenden Pneumokokken waren hingegen in der Lage, vergleichbare Mengen von IL-1 β mRNA zu induzieren (Abb. 7-3-2 C).

Insgesamt zeigt sich, dass die IL-1 β -Produktion in murinen und humanen Zellen davon abhängig ist, dass die Pneumokokken ein hämolytisches, d.h. porenbildendes Ply exprimieren.

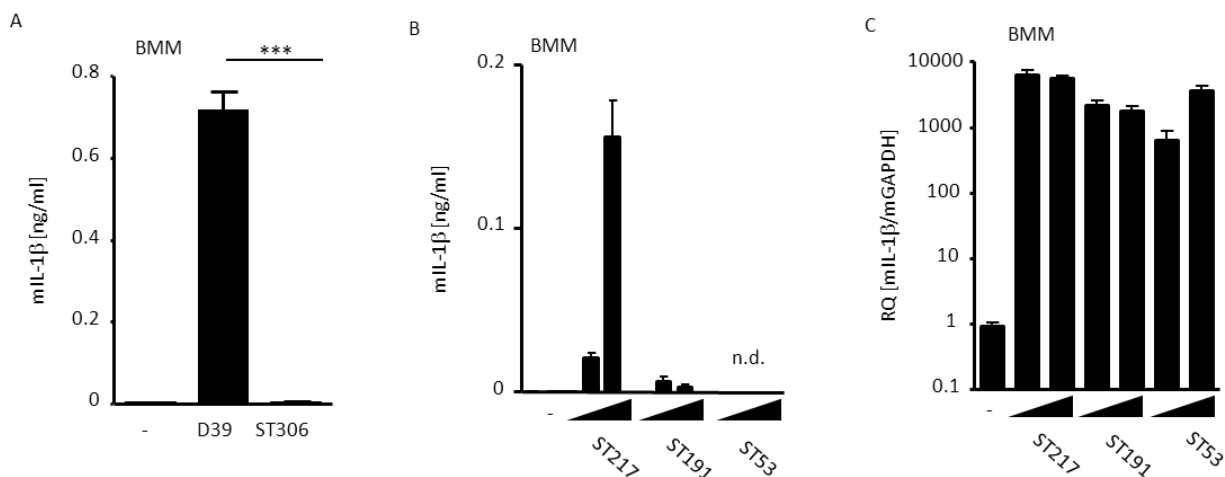


Abbildung 7-3-2: In murinen Zellen induzieren Allel 5-Ply oder Allel 5 Ply-exprimierende Pneumokokken keine IL-1 β -Produktion

Murine BMMs wurden mit D39- bzw. ST306-Pneumokokken mit einer Infektionsdosis von 0.1 (A) bzw. D39-, ST306-, ST217-, ST191- oder ST53-Pneumokokken mit einer Infektionsdosis von 0.01 und 0.1 infiziert. Nach 16 Stunden wurde IL-1 β in zellfreien Überständen mittels ELISA quantifiziert (B). Durch RT-PCR wurde die relative IL-1 β mRNA-Expression bestimmt (C). Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von drei in Triplikaten durchgeführten, repräsentativen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet. N.d., nicht detektierbar.

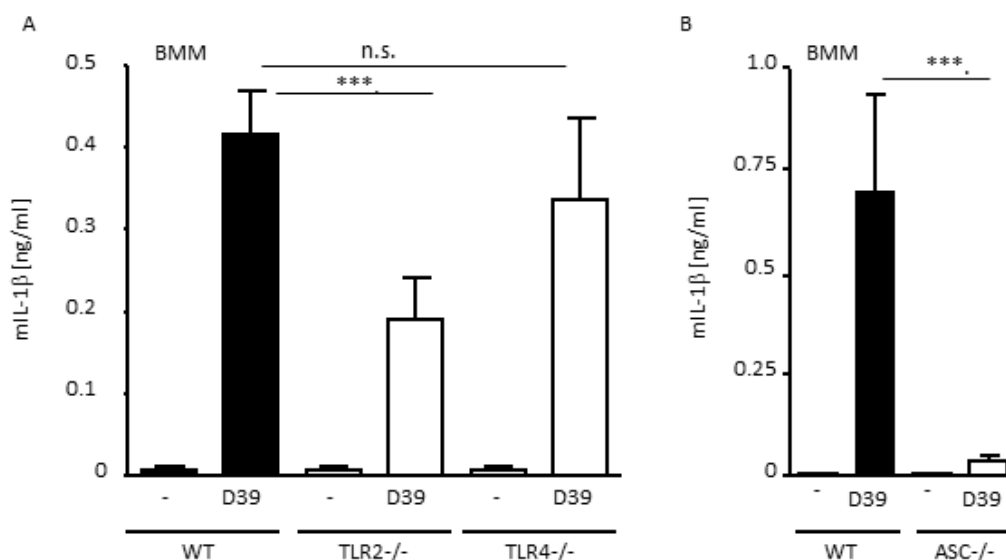
7.4 Die IL-1 β -Produktion in *S. pneumoniae*-infizierten Zellen ist abhängig von TLR2, NLRP3 und dem Adaptermolekül ASC

Als nächstes wurden die Mechanismen auf Seiten der Wirtszelle untersucht, die die IL-1 β -Produktion nach Pneumokokkeninfektion vermitteln. Hierfür wurden Knochenmarksmakrophagen verschiedener *knockout* Tiere isoliert und mit D39-Pneumokokken infiziert.

Es zeigte sich, dass TLR2 $^{-/-}$ BMMs signifikant weniger IL-1 β nach Infektion mit D39 produzierten, als Wildtyp-BMMs (Abbildung 7-4 A). Demgegenüber war die Pneumokokken-stimulierte IL-1 β -Produktion in TLR4 $^{-/-}$ BMMs nicht reduziert im Vergleich zu Wildtyp BMMs (ebenda). Im Weiteren zeigte sich, dass die durch *S. pneumoniae* induzierte Produktion von IL-1 β vom Vorhandensein des Inflammasom-Adapterproteins ASC abhängig war (Abbildung 7-4 B).

BMMs, die defizient für das Inflammasom-bildene NLR-Protein NLRP3 waren, bildeten nach Infektion mit D39-Pneumokokken nur geringe Mengen an IL-1 β (Abb. 7-4 C). Auf die Produktion des Inflammasom-unabhängig produzierten Zytokins TNF α hatte die NLRP3-Defizienz keinen Einfluss (Abb. 7-4 D). Die Abbildung 7-4 E zeigt die Abhängigkeit der IL-1 β -Produktion in BMMs sowohl von der Vollständigkeit des Ply als auch vom Vorhandensein des NLRP3-Inflammasoms.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die IL-1 β -Stimulation in *S. pneumoniae* infizierten BMMs von einem TLR2-abhängigen und einem NLRP3-abhängigem Signal bestimmt wird.



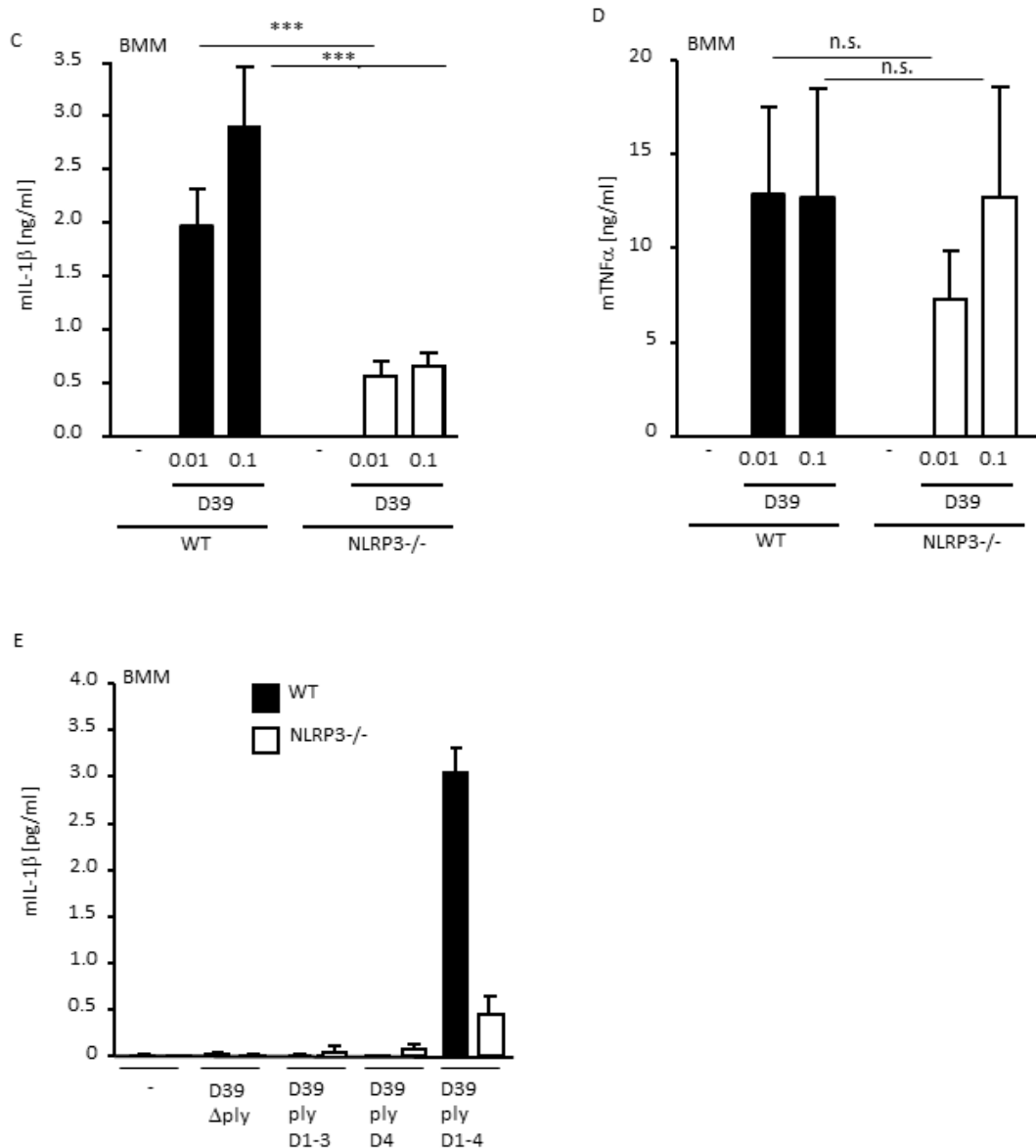


Abbildung 7-4: Die durch *S. pneumoniae* stimulierte IL-1 β -Produktion in BMMs ist abhängig von TLR2 und vom NLRP3-Inflammasom

Murine Wildtyp- oder *knockout*-BMMs wurden mit D39-Pneumokokken und –Revertanten infiziert. Nach 16 Stunden wurde IL-1 β (A-C und E) bzw. TNF α (D) in zellfreien Überständen mittels ELISA quantifiziert. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von drei repräsentativen Experimenten, in Triplikaten durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet, nicht signifikante Unterschiede ($p > 0.05$) mit n.s.

7.5 Die IL-1 β -Produktion in PBMCs nach *S. pneumoniae*-Infektion ist abhängig von dem Caspase-1-abhängigen NLRP3-Inflammasom

Um in humanen PBMCs die Abhängigkeit der IL-1 β -Produktion von NLRP3 zu testen, wurde in frisch isolierte PBMCs mittels Elektroporation (Nucleofection) *small interfering RNA* (siRNA) gegen NLRP3 bzw. *non-silencing* Kontroll-siRNA eingebracht. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit D39-Pneumokokken für 16 Stunden infiziert. Die Analyse der NLRP3-mRNA mit Hilfe von qRT-PCR zeigte, dass die Expression von NLRP3 gemindert wurde (Abb. 7-5 A) und dass die IL-1 β -Produktion reduziert wurde (Abb. 7-5 B). Im Gegensatz dazu war die Produktion des Inflammasom-unabhängigen Zytokins IL-8 durch die Hemmung von NLRP3 unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Das NLRP3-Inflammasom prozessiert abhängig von Caspase-1 pro-IL-1 β zu reifem IL-1 β (Martinon et al., 2009b). Daher wurde als nächstes getestet, ob die IL-1 β -Produktion nach *S. pneumoniae*-Infektion in humanen PBMCs abhängig von Caspase-1 ist. Hierzu wurden PBMCs für 1 h mit dem spezifischen Caspase-1-Inhibitor ZYVAD in einer Konzentration von 10 μ M vorbehandelt, anschließend mit D39 infiziert und die Überstände mittels ELISA auf die Produktion von IL-1 β hin untersucht. Der Caspase-1-Inhibitor hatte in der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 7-5 C gezeigt, wird die durch D39-Infektion hervorgerufene IL-1 β -Produktion signifikant durch die Hemmung von Caspase-1 vermindert. Die Produktion des Inflammasom-unabhängigen Zytokins IL-8 wurde durch ZYVAD nicht beeinflusst (Abb. 7-5 D).

Sowohl die Defizienz von NLRP3 in murinen Makrophagen (Abb. 7-4 C) als auch die Expressionshemmung von NLRP3 mittels siRNA in humanen PBMCs (Abb. 7-5 B) reduzierte die Pneumokokken-stimulierte IL-1 β -Produktion nicht vollständig. Es wurde deshalb angenommen, dass weitere Inflammasome an der IL-1 β -Produktion beteiligt waren. Die Inhibition von NLRP1, NLRP6 und NLRP12 mittels siRNA hatte jedoch keine Verminderung der *S. pneumoniae*-inuzierten IL-1 β -Produktion zur Folge (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das NLRP3-Inflammasom die IL-1 β -Produktion in Pneumokokken-infizierten PBMCs maßgeblich vermittelt, obwohl wahrscheinlich noch weitere Inflammasome (wahrscheinlich nicht die NLRP1-, NLRP6- und NLRP12-Inflammasome) beteiligt sind.

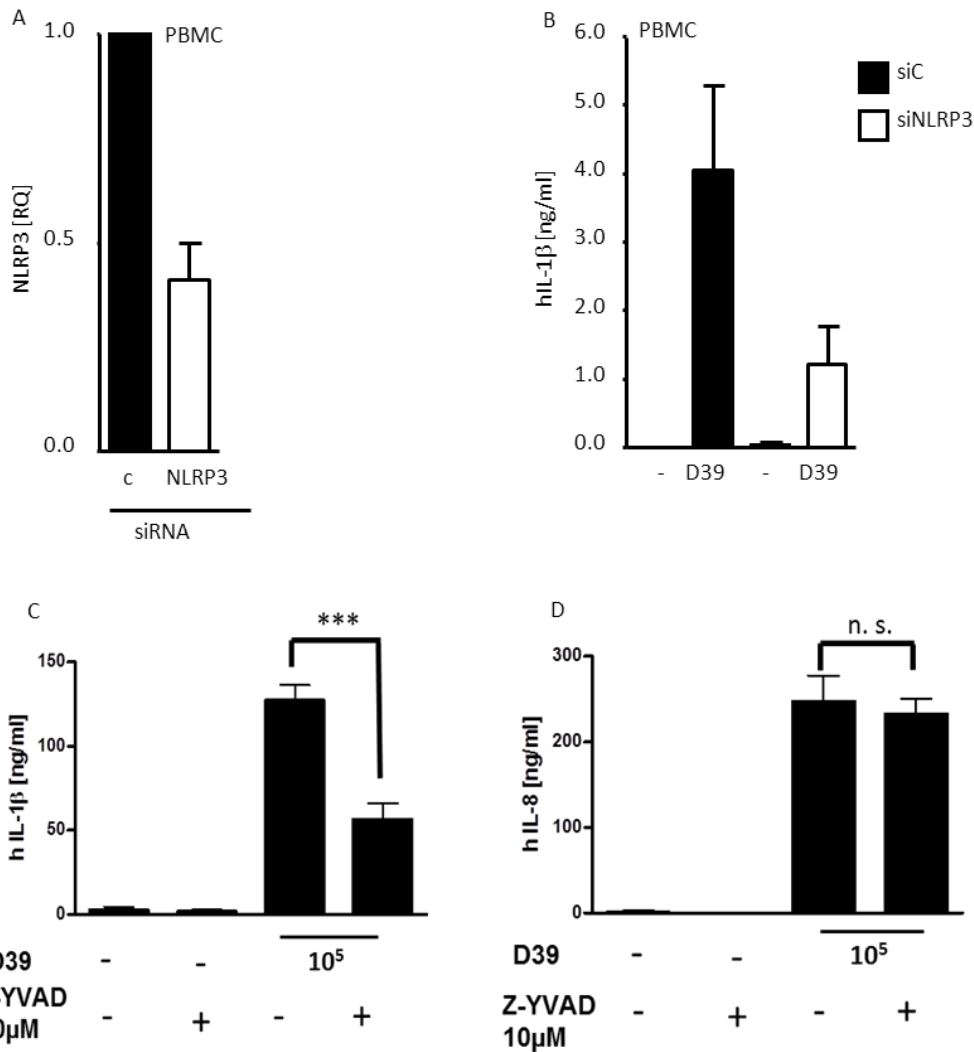


Abbildung 7-5: Die Pneumokokken-stimulierte IL-1 β-Produktion in humanen PBMCs ist abhängig vom NLRP3-Inflammasom

A und B: 72 h nach Transfektion humaner PBMCs mit spezifischer siRNA gegen NLRP3 oder Kontroll-siRNA wurden die Zellen für 16 h mit *S. pneumoniae* D39 [10^3 CFU/ ml] infiziert. Der *knockdown* von NLRP3 wurde mittels quantitativer PCR überprüft (A) und gewonnene zellfreie Überstände wurden mittels spezifischer ELISA auf die Produktion von IL-1β (B) untersucht. C und D: Humane PBMCs wurden für eine Stunde mit einem spezifischen Hemmstoff der Caspase-1, Z-YVAD, vorinkubiert, anschließend für 16 Stunden mit 10^5 CFU/ ml D39-Pneumokokken stimuliert. Die Produktion von IL-1β in den zellfreien Überständen wurde mittels eines spezifischen ELISAs untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte (\pm SEM) von zwei repräsentativen Experimenten, in Triplikaten durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen gekennzeichnet, statistisch nicht signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) mit n.s.

7.6 Die IL-1 β - Produktion in mit Pneumokokken infizierten monozytären Zellen ist abhängig von K⁺-Efflux und reaktiven Sauerstoffspezies

Aus bisherigen Veröffentlichungen lassen sich unterschiedliche Modelle der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms postulieren. Im Folgenden sollte eine NLRP3-Aktivierung durch K⁺-Efflux aus dem intrazellulären Milieu (Walev et al., 1995; Arlehamn et al., 2010) sowie durch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Cassel et al., 2008; Cruz et al., 2007) zur Testung im verwendeten Pneumokokken-Infektionsmodell überprüft werden.

Die Bedeutung des K⁺-Effluxes wurde untersucht, in dem die Zellen in Zellkulturmedium vorinkubiert wurden, welches KCl im Überschuss enthielt (zur Hemmung des K⁺-Effluxes) oder stattdessen NaCl in hoher Konzentration enthielt (als Kontrolle). Anschließend wurden die Zellen mit D39-Pneumokokken (1x 10³ CFU/ ml; 16 h) infiziert. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Hemmung des K⁺-Ausstroms aus der Zelle die durch Pneumokokken stimulierte IL-1 β -Produktion hemmt, hingegen nicht die Produktion des Inflammasom-unabhängigen Zytokins IL-8 (Abb. 7-6 A).

Im Weiteren wurden die PBMCs für eine Stunde mit einem Hemmstoff von ROS, N-Acetylcystein (NAC), vorinkubiert. Die Zugabe von NAC bewirkte ebenfalls eine signifikante Verminderung der Infektions-abhängigen IL-1 β -Produktion, wohingegen das Inflammasom-unabhängig produzierte Zytokin IL-8 von der Zugabe des ROS-Inhibitors unbeeinflusst blieb (Abb. 7-6 B).

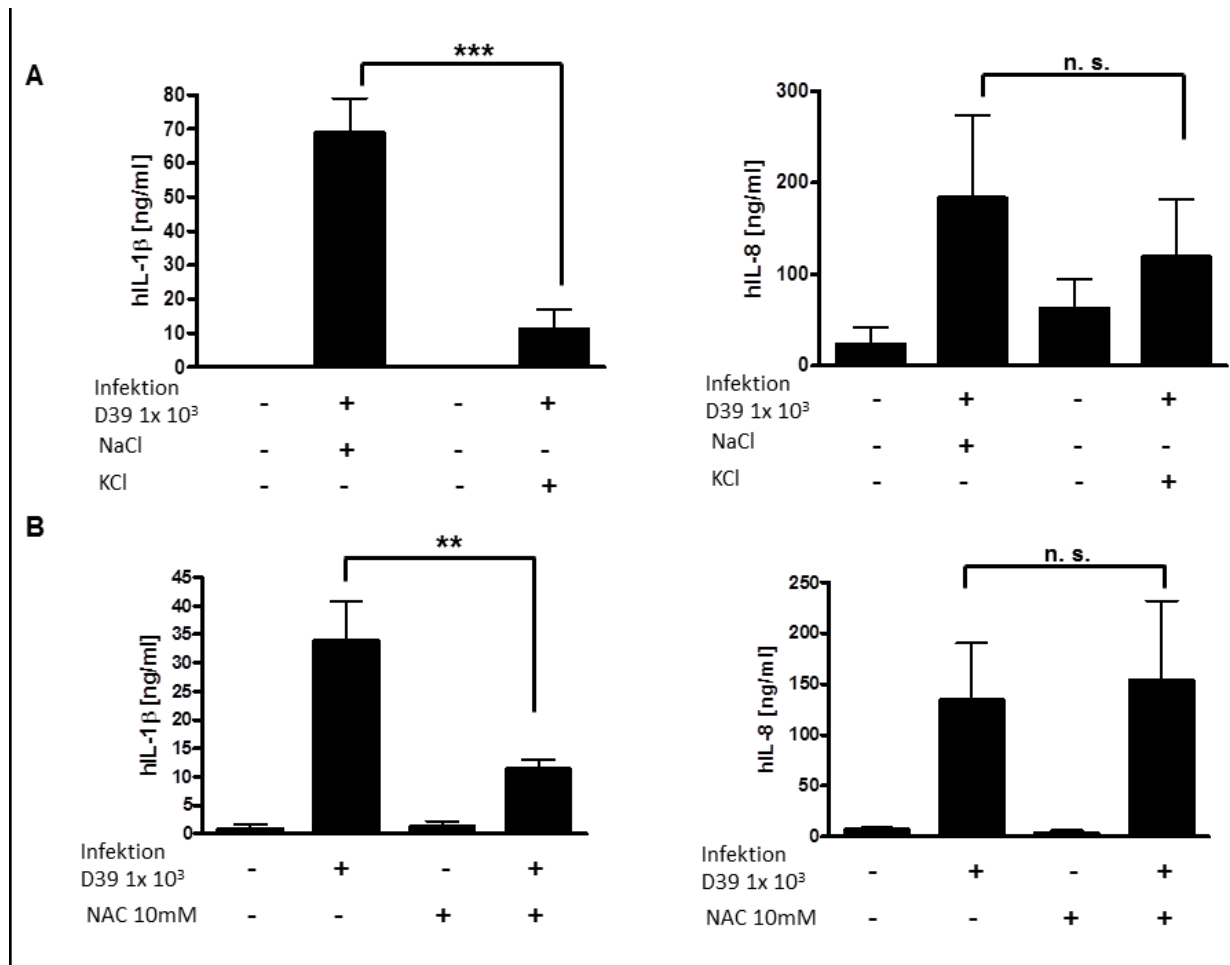


Abbildung 7-6: Einfluss von K⁺-Efflux und ROS-Bildung auf die durch Pneumokokken stimulierte IL-1β-Produktion

PBMCs wurden für eine Stunde vorinkubiert in einem 130 mM KCl beziehungsweise NaCl-haltigen (A), und ROS-Inhibitor NAC-haltigen- (B) haltigen Medium, anschließend in Nährmedium ausgesät. Es erfolgte eine 16 stündige Infektion mit D39. Gewonnene zellfreie Überstände wurden mittels eines spezifischen ELISAs auf die Produktion von IL-1β und IL-8 untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert (\pm SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern ($p < 0.05$), zwei Sternen ($p < 0.01$) oder drei Sternen ($p < 0.001$) gekennzeichnet, statistisch nicht signifikante Unterschiede mit n.s.

8 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit charakterisieren den Mechanismus der Produktion von IL-1 β in humanen und murinen monozytären Zellen nach Infektion mit *S. pneumoniae*. Es konnte gezeigt werden, dass die durch *S. pneumoniae* stimulierte IL-1 β -Produktion abhängig ist von vollständig exprimiertem, porenbildenden Ply auf Seiten des Bakteriums. Pneumokokken, die ein nicht-porenbildendes Ply exprimieren, wie beispielsweise Serotyp 1/Sequenztyp ST306-Pneumokokken, induzieren keine IL-1 β -Produktion. Auf Seiten des Wirts sind TLR2 sowie das NLRP3-Inflammasom (NLRP3, ASC, Caspase-1) für eine optimale Bildung und Freisetzung von IL-1 β notwendig. Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Ply ist abhängig von einem K⁺ Efflux sowie wahrscheinlich von der Bildung von ROS.

Insgesamt stehen einige dieser Daten in Einklang mit einer weiteren Studien, die nach Abschluss der Datenerhebung publiziert wurde. McNeela et al., konnten in dendritischen Zellen ebenfalls zeigen, dass Ply der Schlüsselvirusfaktor für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in der Pneumokokkeninfektion ist (McNeela et al., 2010).

Die erhobenen Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert und ihre Bedeutung für weitere Forschung näher eingeordnet werden.

8.1 Bedeutung des Pneumolysins in der IL-1 β -Produktion durch monozytäre Zellen

Pneumolysin ist ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken (Kardioglu et al., 2008). Durch Ply kann eine Evasion des Komplementsystems erreicht werden, was zu einer verminderten Erkennung von Pneumokokken durch das Immunsystem führt (Quin et al., 2007). Insbesondere vor dem Hintergrund der bedeutenden Rolle des Komplementsystems in der Abwehr von Pneumokokkeninfektionen [vermehrte systemische Pneumokokkeninfektionen mit erhöhter Fatalitätsrate bei Patienten mit Defekten des Komplementsystems (Bruyn et al., 1992), Fähigkeit von Ply C3 zu spalten und hierdurch *in vivo* die Opsonisierung der Pneumokokken zu verhindern (Rubins et al., 1995)] kommt hierdurch dem Ply eine große Bedeutung zu. Darüberhinaus ist Ply ein wichtiger Faktor für die Invasion in sterile Kompartimente z.B in Lunge und Blut. Ply zerstört im Zusammenspiel mit Wasserstoffperoxid, das durch Pneumokokken gebildet wird, das Alveolarepithel und somit kann ein Ödem im Alveolarraum akkumulieren (Canvin et al., 1995). Z.T wurden Makrophagen als direktes Vehikel der bakteriellen Invasion zusätzlich zur Störung der Integrität von Zellbarrieren gezeigt (Dunstone und Tweten 2012; Keyel et al., 2011). Im Weiteren ist eine Ply-abhängige konsekutive Stimulation pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α ,

IL-1 β und IL-6 beschrieben, die sowohl als Verstärkungsmechanismus der angeborenen Immunität und damit als Abwehrmechanismus gegen eine disseminierte Pneumokokkeninfektion essentiell sind, andererseits durch eine verstärkte Inflammation auch deletären Charakter für den Wirt haben können (Malley et al., 2003; Shoma et al., 2008). Dem Zytokin IL-1 β , erstmals 1977 als endogenes Pyrogen aus PBMCs isoliert worden ist (Dinarello et al., 1977), kommt in der Infektionsabwehr eine bedeutende Rolle zu. So wurde in einem *Staphylococcus aureus* Sepsis Mausmodell gezeigt, dass *knockout* Mäuse, die homozygot defizient für IL-1 Rezeptor α -Kette sind, schneller septisch werden und in Folge der Septikämie versterben (Hultgren et al., 2002). Vor diesem Hintergrund ist nun von besonderem Interesse, von welchem zugrunde liegenden Mechanismus die IL-1 β -Produktion in der Pneumokokkeninfektion abhängig ist und dieser wurde daher in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der IL-1 β -Produktion nach Infektion von monozytären Zellen mit Serotyp 2 Pneumokokken sowohl von der Vollständigkeit (dem Vorhandensein aller vier Domänen) des Ply (Abbildungen aus 7-1 und 7-2) als auch von ihrer Poren-bildenden hämolytischen Aktivität (Abb. 7-2 B und D). Die Induktion der IL-1 β -Produktion konnte für murine (Abb. 7-1-1) sowie humane (Abb. 7-1-2) monozytären Zellen gezeigt werden. Hierbei zeigte es sich als unerheblich, ob Ply in aufgereinigter Form dargebracht wurde (Abb. 7-2 A und B) oder durch Infektion mit Ply-suffizienten Pneumokokken (Abb. 7-2 C und D). Ply-Trunktionsformen oder Revertanten-Infektionen, in denen nur einzelne Domänen von Ply exprimiert wurden, stimulierten keine IL-1 β -Produktion. An späterer Stelle soll im Diskussionsteil dieser Arbeit die Bedeutung verschiedener Ply-Varianten für die IL-1 β -Produktion näher beleuchtet werden.

Zunächst ist interessant, woher die Ply-induzierte IL-1 β -Produktion kommt. Bereits für Porenbildende Toxine mehrerer Gram-positiver Bakterien (z.B. *S. aureus*, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes*) wurde beschrieben, dass sie NLRP3-Inflammasom-abhängig die Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β stimulieren (Mariathasan et al., 2006; Meixenberger et al., 2010; Muñoz-Planillo et al., 2009, Craven et al., 2009; Harder et al., 2009).

Im Folgenden soll der hierdurch initiierte intrazelluläre Erkennungsmechanismus, einschließlich der essentiellen Wirtsfaktoren, näher diskutiert werden.

8.2 Die Rolle des NLRP3-Inflammasoms in der *S.pneumoniae*-vermittelten IL-1 β -Produktion

Aus den Ergebnissen 7-1-1 sowie 7-3-2 B und C geht hervor, dass nach Infektion von Makrophagen mit Serotyp 2-Pneumokokken reifes sezerniertes IL-1 β in zellfreien Überständen abhän-

gig von Ply gefunden wurde, IL-1 β -mRNA wird hingegen auch in Abwesenheit von Ply in Pneumokokken-stimulierten Zellen gefunden. Dies legt nahe, dass ein Inflammasom, das die Prozessierung von unreifem pro-IL-1 β in seine reife Form IL-1 β vermittelt, durch Ply aktiviert wird. Da es sich bei der Inflammasom-Aktivierung um einen Caspase-1-vermittelten Mechanismus handelt, wurde zunächst die Hypothese überprüft, dass eine pharmakologische Inhibierung der Caspase-1 in monozytären Zellen die Produktion von reifem sezernierten IL-1 β nach *S.p.*-Infektion unterbinden könne (7-5). Da sich diese Hypothese für das Inflammasom-abhängige Zytokin IL-1 β , nicht jedoch für ein Inflammasom-unabhängig produziertes pro-inflammatorisches Zytokin, IL-8, in humanen PBMCs bestätigte, kann hieraus postuliert werden, dass an dem zu untersuchenden Mechanismus zumindest ein Inflammasom beteiligt ist.

Da in Infektionsversuchen und –Modellen aus eigenen Arbeiten mit Poren-bildenden Toxinen Gram-positiver Bakterien (Meixenberger et al., 2010) und andere (Mariathasan et al., 2006; Muñoz-Planillo et al., 2009, Craven et al., 2009; Harder et al., 2009) eine Abhängigkeit der IL-1 β -Produktion vom NLRP3-Inflammasom zeigte, wurde zunächst die Bedeutung eben dieses Inflammasoms in der Pneumokokkeninfektion von monozytären Zellen getestet. In Abhängigkeit von der NLRP3-Expression konnte nach Infektion mit Pneumokokken, die ein vollständiges Poren-bildendes Ply exprimierten, eine robuste Stimulation von IL-1 β nachgewiesen werden.

Dennoch war auch in Überständen Pneumokokken infizierter NLRP3-defizienter monozytärer Zellen noch residuelle Mengen IL-1 β mittels ELISA messbar (Abb. 7-4 C und E sowie Abb. 7-5 A und B).

Daher wurden weitere Kandidaten-Inflammasome, die zuvor im Zusammenhang mit PAMP- und DAMP-Erkennung nach bakteriellen Infektionen beschrieben waren (eine Übersicht hierzu bietet Martinon et al 2009b), untersucht.

Durch *knockdown* der mRNA für die Inflammasome NLRP1, NLRP6, NLRP12 (nicht gezeigte Daten) und NLRP3 konnte schließlich NLRP3 als wichtiger Bestandteil in der Prozessierung von IL-1 β bestätigt werden. Hiernach denkbar ist eine mögliche Restprozessierung von pro-IL-1 β zu reifem sezernierten IL-1 β nach siRNA-Transfektion in humanen PBMCs, da auch in der RT-PCR zwar ein starker, allerdings nicht vollständiger *knockdown* von NLRP3 gefunden wurde. Da allerdings murine *knockout* BMMs ebenfalls in der Lage waren, geringe aber nachweisbare Mengen IL-1 β nach *S. pneumoniae*-Infektion zu produzieren, deuten die Ergebnisse auf einen zusätzlichen, NLRP3-unabhängigen Mechanismus der IL-1 β -Produktion hin. Gerade die fast vollständig verminderte IL-1 β -Produktion in ASC^{-/-}-BMMs (Abb. 7-4 B) bietet Hinweis auf ein weiteres Inflammasom, das an der IL-1 β -Produktion nach Pneumokokkeninfektion beteiligt ist

und das Adaptermolekül ASC verwendet. Diese Vermutung bestätigte sich kürzlich durch eine Veröffentlichung durch Fang, die eine Rolle des AIM2-Inflammasoms, welches ebenfalls ASC und Caspase-1 beinhaltet, in dendritischen Zellen zeigen konnten (Fang et al., 2011; Koppe et al., 2012).

Nach den vorliegenden *in vitro*-Versuchen stellte sich die Frage nach einer Relevanz des beschriebenen Mechanismus *in vivo*. In weiterführenden Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigt sich, dass NLRP3^{-/-} Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für Pneumokokken-Pneumonien im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen aufweisen, mit gleichzeitig verminderter Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , sowie IL-18, möglicherweise als Folge verminderter KC- und IFN- γ -Produktion (Witzenrath et al., 2011). Das Leukozytenrekrutment in infiziertem Gewebe zeigte sich unverändert, hingegen war die Durchlässigkeit des Lungengewebes (ermittelt durch einen HSA-Quotienten BAL/ Serum) erhöht, so dass sich früh ein Lungenödem entwickeln konnte. Außerdem war das Überleben der Mäuse nach intranasaler Applikation von *S.pneumoniae* in einem LD20-Versuch, in dem 80 % der wt-Mäuse überlebten, bei NLRP3^{-/-}-Mäusen auf 45 % vermindert und in der Überlebenskurve verstarben die NLRP3^{-/-}-Mäuse zu einem früheren Zeitpunkt (70 % nach 72h) (Witzenrath et al., 2011).

Insgesamt zeigt sich somit, dass das NLRP3-Inflammasom an der protektiven Immunantwort in der Pneumokokken-Pneumonie auch in der Maus beteiligt ist (Witzenrath et al., 2011). Auch die *in vivo* Daten sind im Einklang mit den Studien von McNeela und Fang (McNeela et al., 2011; Fang et al., 2011). Da sie eine verbleibende IL-1 β -Produktion nach Pneumokokkeninfektion in NLRP3^{-/-} Zellen finden, die hingegen in ASC^{-/-}-Zellen nicht mehr nachweisbar ist, folgern die Autoren, dass mindestens ein redundantes, ASC-enthaltendes Inflammasom in die IL-1 β -Produktion mit Pneumokokken involviert sein muss. Möglicherweise ist hieran das ASC-enthaltende Inflammasom AIM2 beteiligt, da dies ebenfalls eine Rolle in der *S. pneumoniae*-vermittelten IL-1 β -Produktion spielt (Fang et al., 2011; Koppe et al., 2012). Entsprechend zeigen ASC^{-/-}-Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Pneumokokken-Pneumonien im Vergleich zu wt-Mäusen (Fang et al., 2011).

Aktuell ist noch kontrovers diskutiert, ob das NLRP3-Inflammasom in humanen PBMCs konstitutiv aktiviert ist (Netea et al., 2009). Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten stehen in Widerspruch mit der zuvor genannten Forschungsarbeit, da sich eine robuste Freisetzung von reifem sezernierten IL-1 β nur nach Stimulation mit vollständigem porenbildenden Ply zeigte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit mehreren anderen Forschungsarbeiten zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in humanen PBMCs (Vladimer et al., 2013; Witzenrath et al., 2011).

8.3 Die Aktivierung von NLRP3 durch Pneumolysin

NLRP3 kann als das aktuell best-untersuchtete Inflammasom gesehen werden. Zu seiner Aktivierung sind eine Vielzahl verschiedener Stimuli, direkt Pathogen-assoziierte wie auch indirekte Gefahr-assoziierte Molekülstrukturen, bekannt. Nach derzeitigem Kenntnisstand führen sie alle zu einer Endstrecke, die auf 3 verschiedenartige Mechanismen heruntergebrochen werden kann: a) K^+ -Efflux aus dem Zellinneren, b) Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS), c) Cathepsin B-Freisetzung aus dem Lysosom für große Moleküle (Muñoz-Planillo et al., 2009; Dostert et al., 2008; Hornung et al., 2008; Pétrilli et al., 2007; Perregaux und Gabel 1994; rezensiert in Lamkanfi und Dixit, 2012). Es sind noch weitere Aktivatoren des NLRP3-Inflammasoms beschrieben, unter ihnen das Anschwellen von Zellen (Lamkanfi und Dixit, 2012), Ca^{2+} -Einstrom in Zellen (Lamkanfi und Dixit, 2009) sowie die TRIF-abhängige Erkennung von mikrobiellen RNAs aus Phagosom-Leckage in das Zytosol (Sander et al., 2011). Möglicherweise münden aber auch diese Aktivatoren in einem der aufgeführten Mechanismen a)-c).

Die jeweilige Bedeutung dieser alternativen Endstrecken ist nicht gleichwertig und die unterschiedlichen Mechanismen sollen weiter unten diskutiert werden.

Aufgrund der Ergebnisse aus Abb. 7-6 ist davon auszugehen, dass in der Pneumokokken-Infektion monozytärer Zellen zumindest K^+ -Efflux sowie die Bildung von ROS eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und subsequenter IL-1 β -Produktion spielen.

Durch die hohe Anzahl diverser Stimuli des NLRP3-Inflammasoms und die proinflammatorische Konsequenz seiner Aktivierung ist eine besonders engmaschige Kontrolle der Aktivierung von Bedeutung. Im Gegensatz zu anderen NLRs wird Nlrp3 in naiven dendritischen Zellen und Makrophagen nur in geringem Umfang exprimiert. Es ist ein NF- κ B-abhängiger *priming*-Schritt erforderlich, ehe ein zweites Signal TLR-abhängig (durch Exposition der Zellen gegenüber bakteriellen Toxinen, DAMPs oder Kristallen) die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ermöglicht (Bauernfeind et al., 2009; Lamkanfi und Dixit, 2012).

Für die Aktivierung über K^+ -Efflux ist gezeigt, dass eine Anhebung der extrazellulären K^+ -Konzentration und damit ein verminderter Konzentrations- und Ladungsgradient über der Zellmembran zu einer Inhibition des NLRP3-Inflammasoms führt (Walev et al., 1995; Pétrilli et al., 2007; Cain et al., 2001; Fink et al., 2008; Arlehamn et al., 2010). Im Verständnis der K^+ -Efflux-vermittelten NLRP3-Aktivierung in Infektionsmechanismen mit Pathogenen oder Stimulation mit Poren-bildenden Toxinen (Dostert et al., 2008; Pétrilli et al., 2007; Mariathasan et al., 2006;

Kanneganti et al., 2007) wird angenommen, dass es durch den Liganden-gesteuerte Ionenkanal P2X₇, sowie andere Ionenkanäle und Poren-bildende Toxine (etwa Maitotoxin, Nigericin, Hämolytine) zu einem Kalium-Efflux aus dem Cytosol in den Extrazellularraum kommt. (Perregaux und Gabel, 1994; Surprenant et al., 1996; Pétrilli et al., 2007; Walev et al., 1995). Allerdings kann der spezifische Charakter über Kalium-Efflux bisher nur vermutet werden, da durch die genannten Ionenkanäle und Zytotoxine auch zelluläre H⁺-, Na⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen beeinflusst werden können, die ebenfalls eine Rolle in der NLRP3-Aktivierung spielen könnten. Unterstützt wird diese Hypothese über eine Verhinderung des K⁺-Effluxes nach Zugabe des K⁺-Kanal-Inhibitors Glibenclamid *in vitro* (Lamkanfi et al., 2009). Insgesamt betrachtet muss beachtet werden, dass eine spezifische Bindung an einen bestimmten körpereigenen Ionenkanal bei der Vielzahl unterschiedlicher Stimuli des NLRP3-Inflammasoms unwahrscheinlich ist.

Im Zusammenhang mit der NLRP3-Aktivierung wird neben dem K⁺-Efflux auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert. Unabhängig von ihrem Ursprung (mitochondriale ROS wie beschrieben durch Cassel oder durch die zytosolische NADPH-Oxidase der Phagozyten nach Cruz) werden ROS bei einer Vielzahl zellulärer Stressmechanismen freigesetzt (Cassel et al., 2008; Cruz et al., 2007) und fungieren als DAMPs. Nur einige spezifische DAMPs führen konsekutiv zu einer NLRP3-Aktivierung. So verminderte die Hemmung von ROS die NLRP3-vermittelte IL-1 β Produktion in Reaktion auf Influenza A Virus (Allen et al., 2009), Hemozoin (Shio et al., 2009), Asbest (Dostert et al., 2008), Siliziumkristalle (Cassel et al., 2008), Aluminiumsalze (Kool et al., 2008) und MSU (Dostert et al., 2008). Allerdings ist mittlerweile gezeigt, dass die Hemmung von ROS, beispielsweise mittels NAC (N-Acetyl-Cystein), oberhalb der NLRP3-Aktivierung, also auf Ebene der NF- κ B-Aktivierung geschieht (Bauernfeind et al., 2011). Auch spielt die Quelle des ROS eine Rolle, während für mitochondriales ROS gezeigt ist, dass es NLRP3 aktivieren kann, ist durch Versuche mit Zellen von Patienten mit Mutation der zytosolischen NADPH-Oxidase gezeigt, dass sie nach Stimulation normale Mengen IL-1 β produzieren können (Bulua et al., 2012).

Die hier aufgeführten Studien wie auch die durchgeführten Versuche, die eine Rolle für ROS-Bildung in der Pneumolysin-abhängigen IL-1 β -Produktion zeigen, wurden mit Hilfe eines Inhibitors durchgeführt. Daher müssen die Ergebnisse sehr differenziert betrachtet werden: auf der einen Seite kommt dem verwendeten Inhibitor NAC eine klinische Rolle zu. Seine anti-inflammatorische Wirkung ist seit langer Zeit bekannt und kann an anderer Stelle detailliert nachgelesen werden (Gillissen et al., 1997). Auf der anderen Seite zeigen Metaanalysen klinischer Studien, dass bei Anwendung von NAC bei vorwiegend inflammatorischen Erkrankungen

wie SIRS oder Sepsis kein Nutzen in Hinblick auf die Mortalität bestünde (Szakmany et al., 2012).

Kontrovers beurteilt wird auch die Rolle der ROS-vermittelten NLRP3-Aktivierung, da es nach Bauerfeind et al., (2011) durch Sauerstoffspezies weniger zu einer Inflammasom-Aktivierung als vielmehr dem ersten Schritt des *primings* führt und damit eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung für die Caspase-1 vermittelte IL-1 β -Produktion darstellt. Die hier dargestellten Experimente erlauben jedoch keine eindeutige Aussage darüber, an welchem Angriffspunkt es zu einer Hemmung der IL-1 β -Produktion kommt.

Als weiterer Mechanismus, der zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führen kann, zählt möglicherweise die Freisetzung von Cathepsin B. Diese lysosomale Protease wird bei Schädigung des Lysosoms ins Zytosol freigesetzt, ein Mechanismus der als gemeinsame Endstrecke einer größeren Anzahl von Stimuli zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt. Beschrieben ist dieser Mechanismus für den Austritt lysosomaler Enzyme aus dem Phagolysosom ins Zytosol nach mechanischer Perforation des Phagolysosoms durch große Moleküle z. B. durch Siliziumkristalle (Hornung et al., 2008) und Aluminiumsalze (Sharp et al., 2009; Hornung et al., 2008), durch Toxine wie Tetanolysin O (Chu et al., 2009) oder Listeriolysin (Meixenberger et al., 2011), Pathogene wie Influenza A Virus (Allen et al., 2009), *Neisseria gonorrhoeae* (Duncan et al., 2009), *Shigella flexneri* (Willingham et al., 2007), *Klebsiella pneumoniae* (Willingham et al., 2009), aber auch in komplexen neurologischen Erkrankungen wie M. Alzheimer durch β -Amyloid (Halle et al., 2008), α -Synucleinopathien (Codolo et al., 2013). Interessanterweise ist durch lysosomale Membran-Permeabilisation unter Cathepsin B-Freisetzung eine besondere Form des Zelltodes beschrieben, die weder direkt mit der NLRP3-abhängigen Pyroptose noch mit Apoptose oder Nekrose einhergeht (Boya und Kroemer, 2008).

Die Ergebnissen der eigenen Versuche mit dem Cathepsin B-Inhibitor CA-074 Me und Stimulation durch Ply lassen keine direkten Rückschlüsse auf die Bedeutung von Cathepsin B in der Ply-vermittelten NLRP3-abhängigen IL-1 β -Produktion zu, da der Inhibitor wenig Effekt auf die IL-1 β -Produktion hatte (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit der aktuellen Literatur, die dem Cathepsin-B-vermittelten Mechanismus der NLRP3-Aktivierung eine untergeordnete Rolle zuordnet, wie aus Versuchen mit Cathepsin-B-defizienten Makrophagen und durch die Entdeckung von Cathepsin Redundanzen hervorgeht (Dostert et al., 2009, Tschopp und Schroder 2010).

Eine kürzlich erschienene Forschungsarbeit zeigte, dass innerhalb aller getesteten NLRP3-Aktivatoren K^+ -Efflux, ob primär oder sekundär, der gemeinsame Nenner sei (Muñoz-Planillo et al., 2013).

Insgesamt zeigt sich, dass die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Ply abhängig ist von K^+ -Efflux sowie möglicherweise von der Bildung von ROS.

8.4 Die Bedeutung von Pneumolysin-Mutanten und verschiedenen Pneumokokken-Serotypen in der Aktivierung von NLRP3 und Ausblick

Insgesamt konnte für Serotyp 2-Pneumokokken gezeigt werden, dass Pneumolysin, welches vollständig exprimiert wird und hämolytische Eigenschaften hat, *in vitro* eine deutliche proinflammatorische Reaktion nach Infektion monozytärer muriner sowie humaner Zellen durch NLRP3-vermittelte IL-1 β -Produktion bewirkt. Wie eingangs darauf hingewiesen, ist nicht jede *S.pneumoniae*-Infektion durch einen Serotyp, der Poren-bildendes Ply exprimiert, verursacht. Das nicht-hämolytische Allel 5 Ply wird in einem Großteil der Serotyp 1- (z.B. ST306, ST228, ST617) und Serotyp 8- (v.a. ST53, ST578, ST835, ST1110, ST1722) Isolaten in Europa gefunden (Jefferies et al., 2007) und induziert keine IL-1 β -Produktion. Auch ganze ST306- und ST53-Pneumokokken vermitteln eine kaum messbare IL-1 β -Produktion. Außerdem exprimieren auch andere Pneumokokken-Serotypen, z.B. Serotyp 2 (ST74), 7F (ST191), 23F (ST40) und 27 (ST571) Ply-Varianten, die eine verminderte Poren-bildende Aktivität im Vergleich zu Allel 1-Ply z.B. aus Serotyp 2 D39 oder Serotyp 3 PN36, vorweisen (ebenda; Kirkham et al., 2006; Lock et al., 1996). Möglicherweise werden eben diese Bakterien im Vergleich zu Pneumokokken, die Poren-bildendes hämolytisch aktives Ply exprimieren weniger effizient durch Inflammasome erkannt. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit, unter anderem durch verminderte IL-1 β -Sekretion nach ST191-Infektion, unterstützt.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten *S. pneumoniae*-Stämme, ihrer exprimierten Ply-Varianten und ihrer Fähigkeit zur Inflammasom-Aktivierung, ist in Tabelle 8-1 dargestellt.

Tabelle 8-1: Pneumolysin und Inflammasom-Aktivität verschiedener Pneumokokken-Stämme, die in *in vitro*-Experimenten eingesetzt werden. Angabe der PLY-Allele vgl. Jefferies et al., 2007. Die Inflammasom-Aktivierung beschreibt die Fähigkeit der Bakterien, eine zelluläre IL-1 β -Produktion zu stimulieren. ++: starke Stimulation; +/-: schwache Aktivierung; -: keine Aktivierung (abgewandelt nach Witzenrath et al., 2011).

<i>S. pneumoniae</i> Stamm	PLY Variante	Inflammasom Aktivierung
D39	Allel 1	++
D39 Δ ply	-	-
D39plyD1-3	Trunktionsvariante	
D39plyD4	Trunktionsvariante	
D39plyD1-4	Allel 1	++
R6x	Allel 1	++
R6x Δ ply	-	-
Serotyp 1, ST217	Allel 1, 2	++
Serotyp 1, ST306	Allel 5	-
Serotyp 7F, ST191	Allel 10	-/+
Serotyp 8, ST53	Allel 5	-

Insgesamt gibt es deutliche Unterschiede in der Serotypen-Repräsentation nach Altersgruppen und Regionen (Hausdorff et al., 2005). Interessant ist dies für die vorliegende Arbeit aus verschiedenen Aspekten heraus:

Welche Bedeutung hat die Poren-bildende Funktion des Ply für die Pathogenfunktion? Und welche Rolle spielt sie bei der Erkennung der Pneumokokke als Pathogen durch den Wirt?

Wie in dieser Arbeit exemplarisch an Allel 1-Ply aus Serotyp 2 Pneumokokken im Vergleich zu Allel 5-Ply aus Serotyp 1 Pneumokokken gezeigt, unterscheiden sich sowohl die hämolytischen Eigenschaften als auch die Fähigkeit zur Induktion von IL-1 β . Die Poren-bildende Funktion des Ply kann als zweischneidiges Schwert betrachtet werden: Zum einen dient die Bindung an Cholesterol-haltige Membranen und die Porenbildung in diesen Membranen dem Zusammenbruch

von Barrierefunktionen. Andere Pathogene wie z.B. Listerien machen sich diesen Effekt direkt zu Nutze, indem sie der intrazellulären Vakuole, die sie sich selbst zu ihrer Vermehrung schaffen, Löcher zufügen, um anschließend im Zytosol wirken zu können (Meixenberger et al., 2010). Bei Pneumokokken als vorwiegend extrazellulärem Pathogen muss davon ausgegangen werden, dass die Poren-bildende Wirkung weniger direkt genutzt wird, aber beispielsweise zur Provokation des Zusammenbruchs von Epithelbarrieren dient (Littmann et al., 2009). Andere wichtige Effekte des Ply wurden bereits an anderer Stelle in der Diskussion dieser Arbeit erwähnt (Komplementaktivierung, sowie Komplementevasion etc.). In einem *Review* von Clarke und Weiser wird außerdem diskutiert, dass auch diese als streng extrazellulär geltenden Pathogene durchaus einen Weg in das Zellinnere finden und dieses als gesondertes Kompartiment zur Evasion der Wirtsimmunität nutzen können (Clarke und Weiser, 2011).

Zum anderen wurden gerade Pneumokokken-Serotypen, die ein nicht oder nur unvollständig Poren-bildendes Toxin exprimieren, gehäuft im Zusammenhang mit invasiven Pneumokokken-Infektionen (IPD) beschrieben (Jefferies et al., 2007). Zwar werden eben diese Serotypen seltener in nasopharyngealen Abstrichen als Zeichen der Kolonisierungsrate gefunden, dennoch zeigen epidemiologische Arbeiten, dass sie häufiger mit IPD assoziiert sind (Weinberger et al., 2010, Hausdorff et al., 2005). Sollte gerade die Poren-bildende Funktion über eine kontinuierliche lokale oder niedrighschwellige systemische IL-1 β und IL-18-Konzentration die Überwachung oder Invasion häufiger kolonisierender Pneumokokken-Serotypen wie den Serotyp 2 in Schach halten? Es ist anzunehmen, dass eben hierbei die differenzielle Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine zentrale Rolle spielt. Wahrscheinlich ist, dass Pneumokokken, die ein Poren-bildendes Ply exprimieren, eine sofortige und stark ausgeprägte Aktivierung verschiedener Erkennungsmechanismen des angeborenen Immunsystems provozieren. Hierdurch und auch über die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms werden sie im Invasionsprozess frühzeitig erkannt und sind somit seltener in bestimmten Kompartimenten vorzufinden sind. Daher ist es als Besonders anzusehen, einen Mechanismus der Wirtsabwehr durch ein pro-inflammatorisches Zytokin gefunden zu haben, das in Abhängigkeit dieses zentralen bakteriellen Toxins produziert wird. Im Weiteren bleibt abzuwarten, wie sich der Einsatz des PCV7-Impfstoffs, der seit 2006 von der STIKO für alle Kinder empfohlen wird, in Deutschland auswirkt. Zu den Effekten liegen in einigen Ländern bereits große Studien vor. Erschwert werden u.a. europaweite Vergleichsstudien durch uneinheitliche Erfassung von Pneumokokken-Erkrankungen und –Impfungen (Hanquet et al., 2010). Im Vergleich soll an dieser Stelle auf Studien aus den USA und Dänemark hingewiesen werden: In den USA existiert, neben aktuell einem 10- und neuerdings 13-valenten Konju-

gat-Impfstoff seit 2000 ein 7-valenter Impfstoff, für den innerhalb kurzer Zeit ein starker Rückgang von IPD durch Serotypen, die im Impfstoff vertreten sind, in geimpften Kindern gezeigt werden konnte (Whitney et al., 2003). Dennoch nehmen aktuell die Häufigkeiten von Serotypen in IPD zu, welche nicht in den Impfstoff einbezogen wurden (Weinberger et al., 2011). Dieses *serotype replacement* wird eine ständige und kostenintensive Weiterentwicklung des Pneumokokken-Impfstoffs notwendig machen. Eine aktuelle Studie zeigt die Halbierung der Auftretenshäufigkeit von IPD in einer dänischen Kohorte mit vereinzelt Fällen von IPD bei Impfungs-*non responders* bezogen auf den 7-valenten Impfstoff und bisher vollständigem IPD-Schutz bezogen auf den 13-valenten Impfstoff (Harboe et al., 2013).

Um eine ständige Neuanpassung des Impfstoffes und dadurch sowohl hohe entstehende Kosten als auch geographische Nachteile in Regionen, mit anderem Serotypen-Profil im Vergleich zu den Impfstoff-herstellenden Regionen, zu umgehen, wurde bereits vor längerer Zeit der Einsatz von hochkonservierten Proteinstrukturen aus Pneumokokken als Impf-Antigen vorgeschlagen. Unter Umständen würde sich hierfür gerade Ply eignen. Erste Versuche mit einem mutierten Ply (Trp-433→ Phe, als Ply Toxoid B bezeichnet), das lediglich 0.1% der hämolytischen Kapazitäten von Wildtyp-Ply aufweist, schützen in limitiertem Umfang vor invasiven *S. pneumoniae*-Infektionen (Paton et al., 1991, Alexander et al., 1994). Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen eine vielversprechende Protektion vor IPD bei Kombination von Ply-Impfung und nasopharyngealer Kolonisierung im Tierversuch (Neill et al., 2012). Dies ist im Zusammenhang mit den zuvor gezeigten Ergebnissen aus 7-3 von besonderem Interesse, da auch die hier verwendeten ST306-Pneumokokken und andere minimale residuelle hämolytische Kapazitäten aufweisen. Möglicherweise kann diese neuartige Form der Impfung vor eben diesen, in IPD gefundenen und dem Immunsystem über verminderte Aktivierung eventuell entweichende, Pneumokokken schützen.

Weitere Studien sind nötig, um die differenzielle Rolle von Pneumolysin und seine Effekte auf Wirts-Kolonisierung und –Invasion, insbesondere aber auch seine Effekte auf die angeborene Immunität näher zu beleuchten.

9 Literaturverzeichnis

Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, et al., (2013). cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*. 498. 380-4.

Albiger B, Dahlberg S, Sandgren A, et al. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defense against pneumococcal infection. *Cell Microbiol*. 9, 633-44

Alexander JE, Lock RA, Peeters CC, et al. (1994) Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 62, 5683-8.

Allen IC, Scull MA, Moore CB, et al. (2009). The NLRP3 inflammasome mediates *in vivo* innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. *Immunity*. 30(4), 556-65.

Allen IC, Wilson JE, Schneider M, et al. (2012). NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF- κ B signaling. *Immunity*. 36(5), 742-54.

Arlehamn CS, Pétrilli V, Gross O, Tschopp J, und Evans TJ. (2010). The role of potassium in inflammasome activation by bacteria. *J Biol Chem*. 285(14), 10508-18.

Arnould D, Soares F, Tattoli I, Castanier C, Philipott D, und Girardin S. (2009). An N-terminal addressing sequence targets NLRX1 to the mitochondrial matrix. *J Cell Sci*. 122(17), 3161-8.

Averette KM, Pratt MR, Yang Y, et al. (2009). Anthrax lethal toxin induced lysosomal membrane permeabilization and cytosolic cathepsin release is Nlrp1b/Nalp1b-dependent. *PLoS One*. 4, e7913.

Avery OT, Macleod CM, und McCarty M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med.*;79, 137-58.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol.* 183, 787-91.

Benton KA, Paton JC, und Briles DE. (1997). The hemolytic and complement-activating properties of pneumolysin do not contribute individually to virulence in a pneumococcal bacteremia model. *Microb Pathog.* 23(4), 201-9.

Berk SL, Gage KA, Holtsclaw-Berk SA, und Smith JK. (1985). Type 8 pneumococcal pneumonia: an outbreak on an oncology ward. *South Med J.* 78, 159-61.

Berrington WR, Iyer R, Wells RD, Smith KD, Skerrett SJ, und Hawn TR. (2010). NOD1 and NOD2 regulation of pulmonary innate immunity to *Legionella pneumophila*. *Eur J Immunol.* 40, 3519-27.

Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D, und Paton JC. (1989). Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 57(7), 2037-42.

Birtles A, McCarthy N, Sheppard CL et al. (2005). Multilocus sequence typing directly on DNA from clinical samples and a cultured isolate to investigate linked fatal pneumococcal disease in residents of a shelter for homeless men. *J Clin Microbiol.* 43, 2004-8.

BQS-Qualitätsreport 2007. ISBN 978-3-9-812-495-0-7.

Brooks MN, Rajaram MV, Azad AK, et al. (2011). NOD2 controls the nature of the inflammatory response and subsequent fate of *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis* BCG in human macrophages. *Cell Microbiol.* 13, 402-18.

Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, und Beall B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* 3(11): e168.

Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, et al. (2007). Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell*. 129, 45-56.

Brunette RL, Young JM, Whitley DG, Brodsky IE, Malik HS, und Stetson DB. (2012). Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *J Exp Med*. 209(11), 1969-83.

Bruyn GA, und van Furth R. (1991). Pneumococcal polysaccharide vaccines: indications, efficacy and recommendations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 11, 897-910.

Bruyn GA, Zegers BJ, van Furth R (1992) Mechanisms of host defense against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 14, 251–262.

Bulua AC, Simon A, Maddipati R, et al. (2011) Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *J Exp Med* 208(3). 519-533.

Bürckstümmer T, Baumann C, Blüml S, et al. (2009). An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. *Nat Immunol*. 10, 266-72.

Cain K, Langlais C, Sun XM, Brown DG, und Cohen GM. (2001). Physiological concentration of K⁺ inhibit cytochrome c-dependent formation of the apoptosome. *J Biol Chem*. 276(45), 41985-90.

Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M, Paton JC, Boulnois, GJ, Andrew PW, Mitchell TJ. (1995). The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 172, 119–123.

Carlsson F, Kim J, Dumitru C, et al. (2010). Host-detrimental role of Esx-1-mediated inflammasome activation in mycobacterial infection. *PLoS Pathog*. 6, e100895.

Case CL, Shin S, und Roy CR. (2009). Asc and Ipaf Inflammasomes direct distinct pathways for caspase-1 activation in response to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun*. 77, 1981-91.

Cassel SL, Eisenbarth SC, Iyer SS, et al. (2008). The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. *105*, 9035-40.

Choi YH, Jit M, Gay N, et al. (2011). 7-Valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: is it still beneficial despite high levels of serotype replacement? *PLoS One*. *6(10)*, e26190.

Chu J, Thomas LM, Watkins SC, Franchi L, Núñez G, und Salter RD. (2009). Cholesterol-dependent cytolysins induce rapid release of mature IL-1beta from murine macrophages in a NLRP3 inflammasome and cathepsin B-dependent manner.; *J Leukoc Biol*. *86(5)*, 1227-38.

Clarke TB, und Weiser JN. (2011). Intracellular sensors of extracellular bacteria. *Immunol Rev*. *243(1)*, 9-25.

Cockeran R, Anderson R, und Feldman C. (2002). The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Curr Opin Infect Dis*. *15*, 235-9.

Codolo G, Plotegher N, Pozzobon T, Brucale M, Tessari I, Bubacco L, und de Bernard M. (2013). Triggering of Inflammsome by Aggregated α -Synuclein, an Inflammatory Response in Synucleinopathies. *PLoS One*. *8(1)*, e55375.

Correa RG, Milutinovic S, und Reed JC. (2012). Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep*. *32*, 597-608.

Craven RR, Gao X, Allen IC, et al. (2009). *Staphylococcus aureus* alpha-hemolysin activates the NLRP3-inflammasome in human and mouse monocytic cells. *PLoS ONE* *4*, e7446.

Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura AL, Persechini PM, und Ojcius DM. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*. *282*, 2871-9.

- Dagan R, Givon-Lavi N, Zamir O, and Fraser D. (2003). Effect of a nonavalent conjugate vaccine on carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in day-care centers. *Pediatr Infect Dis J.* 22(6), 532-40.
- de Roux A, Cavalcanti M, Marcos MA, et al. (2006). Impact of alcohol abuse in the etiology and severity of community-acquired pneumonia. *Chest.* 5, 1219-25.
- Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, McCafferty DG, Yang SR, and Fowler VG Jr. (2009). Critical role of NOD2 in regulating the immune response to *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 77, 1376-82.
- Dessing MC, Hirst RA, de Vos AF, and van der Poll T. (2009). Role of Toll-like receptor 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One.* 4(11):e7993.
- Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 519-550.
- Dinarello CA, Renfer L, and Wolff SM. (1977). Human leukocytic pyrogen: purification and development of a radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(10), 4624-7.
- Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, and Tschopp J. (2008). Innate immune activation through Nalp3 inflammasome in sensing of asbestos and silica. *Science.* 320, 674-7.
- Duncan JA, Bergstralh DT, Wang Y, et al. (2007). Cryopyrin/NALP3 binds ATP/dATP, is an ATPase, and requires ATP binding to mediate inflammatory signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(19), 8041-6.
- Duncan JA, Gao X, Huang MT, et al. (2009). *Neisseria gonorrhoeae* activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. *J Immunol.* 182, 6460-9.

Dunstone MA, und Tweten RK. (2012). Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 22(3), 342-9.

Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, und Flavell RA. (2008). Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature.* 453, 1122-26.

Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell.* 145, 745-57.

Ewig S, Birkner N, Strauss R, et al. (2009). New perspectives on community-acquired pneumonia in 388406 patients. Results from a nationwide mandatory performance measurement programme in healthcare quality. *Thorax.* 64, 1062-1069.

Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, et al. (2011). Critical roles of ASC inflammasomes in Caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol.* 187, 4890-9.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Datta P, Wu J, und Alnemri ES. (2009). AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA. *Nature.* 458, 509-13.

Fink SL, Bergsbaken T, Cookson BT. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105, 4312-7.

Franchi L, Amer A, Body-Malapel M, et al. (2006). Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol.* 7, 576-82.

Franchi L, Warner N, Viani K, und Nuñez G. (2009). Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev.* 227(1), 106-28.

Geddes K, Rubino S, Streutker C, et al. (2010). Nod1 and Nod2 regulation of inflammation in the Salmonella colitis model. *Infect Immun.* 78, 5107-15.

Gillissen A, Jaworska M, Orth M, et al. (1997). N-acetylcystein augment cellular antioxidant defense in two distinctive ways. *Resp Med.* 91, 159-68.

Gonzalez MR, Bischofberger M, Pernot L, van der Goot FG, und Frêche B. (2007). Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cell Mol Life Sci.* 65, 493-507.

Gray BM, und Dillon HC Jr. (1986). Clinical and epidemiologic studies of pneumococcal infection in children. *Pediatr Infect Dis.* 2, 201-7

Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol.* 9, 857-65.

Hanquet G, Perrocheau A, Kissling E, et al. (2010). Surveillance of invasive pneumococcal disease in 30 EU countries: Towards a European system?. *Vaccine.* 28, 3920-8.

Harboe ZB, Thomsen RW, Riis A, et al. (2009). Pneumococcal serotypes and mortality following invasive pneumococcal disease: a population-based cohort study. *PLoS Med.* 6, e1000081.

Harboe ZB, Valentiner-Branth P, Ingels H et al. (2013). Pediatric invasive pneumococcal disease caused by vaccine serotypes following the introduction of conjugate vaccination in Denmark. *PLoS One.* 8(1), e51460.

Harder J, Franchi L, Muñoz-Planillo R, Park JH, Reimer T, und Núñez G. (2009). Activation of the Nlrp3 inflammasome by *Streptococcus pyogenes* requires streptolysin O and NF-kappa B activation but proceeds independently of TLR signaling and P2X7 receptor. *J Immunol.* 183, 5823-9.

Hausdorff WP, Feikin DR, und Klugman KP. (2005). Epidemiological difference among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis.* 5, 83-93.

Henrichsen J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 10, 2759-62.

Henriques-Normark B, und Tuomanen EI. (2013). The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Cold Spring Harb Perspect Med. 3(7): a010215.

Hoegen T, Tremel N, Klein M, et al. (2011). The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. J Immunol. 187(10), 5440-51.

Höffken G, Lorenz J, Kern W, et al. (2009). S3-guideline on ambulant acquired pneumonia and deep airway infections. Update 2009. Pneumologie. 63(10), e1-e68.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 284, 1313-18.

Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. Nature. 458, 514-8.

Hornung V, Bauerfeind F, Halle A, et al. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat Immunol. 9, 847-56.

Houldsworth S, Andrew PW, und Mitchell TJ. (1994). Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. Infect Immun. 62(4), 1501-3.

Hultgren O, Svensson L, Tarkowski A (2002) Critical role of signaling through IL-1 receptor for development of arthritis and sepsis during *Staphylococcus aureus* infection. J Immunol 168, 5207–5212.

Iyer SS, Pulskens WP, Sadler JJ, et al. (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. Proc Natl Acad Sci USA. 106, 20388-93.

Janeway CA Jr. und Medzhitov R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 20, 197-216.

Janeway C. *Janeway's Immunobiology.* 7th edition. New York, US. Garland Science, Taylor & Francis Group. 2008: 3-38.

Jefferies JM, Johnston CH, Kirkham LA, et al. (2007). Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis.* 196, 936-44.

Jones JW, Kayagaki N, Broz P, et al. (2010). Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 9771-6.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, und Andrew PW. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 4, 288-301.

Kadioglu A, Taylor S, Iannelli F, Pozzi G, Mitchell TJ, und Andrew PW. (2002). Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and difference in capsule type. *Infect Immun.* 70, 2886-90.

Kanneganti, TD, Lamkanfi, M, Kim, YG et al. (2007). Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity.* 26(4), 433-43.

Kawai T, und Akira S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 34, 637-50.

Keating SE, Baran M, und Bowie AG. (2011). Cytosolic DNA sensors regulation type I interferon induction. *Trends Immunol.* 32(12), 574-81.

Kerr AR, Paterson GK, Riboldi-Tunncliffe A, und Mitchell TJ. (2005). Innate immune defense against pneumococcal pneumonia requires pulmonary complement component C3.

Infect Immun. 73, 4245-52.

Keyel PA, Heid ME, Salter RD. (2011). Macrophage responses to bacterial toxins: a balance between activation and suppression. Immunol Res. 50(2-3), 118-23.

Kimaro Mlacha SZ, Romero-Steiner S, Hotopp JC, et al. (2013). Phenotypic, genomic, and transcriptional characterization of *Streptococcus pneumoniae* interacting with human pharyngeal cells. BMC Genomics. 14, 383.

Knapp S, Leemans JC, Florquin S, et al. (2003). Alveolar macrophages have a protective anti-inflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 167(2), 171-9.

Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Flavell RA, and Pfister HW. (2002). Role of Caspase-q in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. Ann Neurol. 51(3), 319-29.

Kofoed EM, and Vance RE. (2011). Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. Nature. 477(7366), 592-5.

Kool M, Petrill V, De Smedt T, et al. (2008). Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome. J.Immunol. 181(6), 3755-9.

Kirkham LA, Jefferies JM, Kerr AR, et al. (2006). Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. J Clin Microbiol. 44(1), 151-9.

Koppe U, Högner K, Doehn JM, et al. (2012). *Streptococcus pneumoniae* stimulates a STING- and IFN regulatory factor 3-dependent type I IFN production in macrophages, which regulates RANTES production in macrophages, cocultured alveolar epithelial cells, and mouse lungs. J Immunol. 188(2), 811-7.

Koppe U, Suttorp N, und Opitz B. (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. Cell Microbiol. 14(4), 460-6.

Lamkanfi M und Dixit V. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 137-61.

Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, et al. (2009). Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol.* 187(1), 61-70.

Le Bourhis L, Magalhaes JG, Selvanantham T, et al. (2009). Role of Nod1 in mucosal dendritic cells during Salmonella pathogenicity island 1-independent *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infect Immun.* 77, 4480-6.

Letiembre M, Echchannaoui H, Bachmann P, et al. (2005). Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun.* 73, 8397-401.

Littmann M, Albiger B, Frentzen A, Normark S, Henriques-Normark B, und Plant L. (2009). *Streptococcus pneumoniae* evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression. *EMBO Mol Med.* 1(4), 211-22.

Lock RA, Zhang QY, Berry AM, und Paton JC. (1996). Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Microb Pathog.* 44, 151-9.

Lysenko ES, Clarke TB, Shchepetov M, et al. (2007). Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog.* 3, e118.

Malley R, Henneke P, Morse SC, et al. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 1966-71.

Mariathasan S, Weiss DS, Newton J, et al. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature.* 440, 228-32

- Marrie TJ, Lau CY, Wheeler SL, et al. (2000). A controlled trial of a critical pathway for treatment of community-acquired pneumonia. CAPITAL Study Investigators. Community-acquired pneumonia intervention trial assessing levofloxacin. *JAMA*. 283, 749-755.
- Martinon F, Mayor A, und Tschopp J. (2009b). The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol*. 27, 229-65.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, und Tschopp J. (2006). Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature*. 440, 237-41.
- Mason DR, Beck PL, und Muruve DA. (2012). Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors and inflammasomes in the pathogenesis of non-microbial inflammation and diseases. *J Innate Immun*. 4(1), 16-30.
- Maus U, Srivastava M, Paton JC, et al. (2004). Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol*. 173, 1307-12.
- Matzinger P. (2012). The evolution of the danger theory. *Expert Rev Clin Immunol*. 8, 311-7.
- McNeela EA, Burke A, Neill DR, et al. (2011). Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. *PLoS Pathog*. 6, e1001191.
- Meixenberger K, Pache F, Eitel J, et al. (2010). *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol*. 184(2), 922-30
- Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, et al. (2010). Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 3076-80.
- Mitchell AM, und Mitchell TJ. (2010). *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. 16, 411-8.

Moynet DJ, und Tiraby GJ. (1980). Inhibition of transformation in *Streptococcus pneumoniae* by lysogeny. J Bacteriol. *141*(3), 1298-304.

Muñoz-Planillo R, Franchi L, Miller S, und Núñez G. (2009). A critical role for hemolysins and bacterial lipoproteins in *Staphylococcus aureus*-induced activation of the Nlrp3 inflammasome. J Immunol. *183*, 3942-8

Neill, DR, Smeaton S, Bangert M, und Kadioglu A. (2013). Nasopharyngeal carriage with *Streptococcus pneumoniae* augments the immunizing effect of pneumolysin toxoid B. J Allergy Clin Immunol. *131*(5), 1433-5.

Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, et al. (2009). Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages. Blood. *113*, 2324-35.

N'Guessan PD, Schmeck B, Abena Ayim, et al. (2005). *Streptococcus pneumoniae* R6x induced p38 MAPK and JNK mediated Caspase-dependent apoptosis in human endothelial cells. Thromb Haemost. *94*(2), 295-303.

Nurhonen M und Auranen K. (2014). Optimal Serotype composition of Pneumococcal conjugate vaccine under serotype replacement. PLoS Comput Biol *10*(2), e1003477.

Opitz B, Püschel A, Beermann W, et al. (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*, 484-90.

Opitz B, Püschel A, Schmeck B, et al. (2004). Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. J Biol Chem. *279*, 36426-32.

Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. (2010). Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. Am J Respir Crit Care Med. *181*, 1294-309.

Overturf GD. (2000). American Academy of Pediatrics. Committee on Infectious Diseases. Technical report: prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate and polysaccharide vaccines and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics*. 2 Pt 1, 367-76.

Pandey AK, Yang Y, Jiang Z, et al. (2009). NOD2, RIP2 and IRF5 play a critical role in the type I interferon response to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 5, e1000500.

Paton JC, Lock RA, Lee CJ, et al. (1991). Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun*. 59, 2297-304.

Perregaux D und Gabel CA. (1994). Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem*. 269(21), 15195-203.

Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor F, und Tschopp J. (2007). Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 14(9), 1583-9.

Pletz MW, von Baum H, van der Linden M, Rohde G, Schütte H, Suttorp N, Welte T. (2012). The burden of pneumococcal pneumonia- Experience of the German Competence Network CAPNETZ. *Pneumologie*. 66(08), 470-475.

Price KE, Greene NG, und Camilli A. (2012). Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 194(14), 3651-60.

Quin LR, Moore QC 3rd, McDaniel LS (2007) Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infect Immun* 75, 2067–2070.

Ramirez M, Severina E, und Tomasz A. (1999). A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. 181, 3618-25.

Ratner AJ, Hippe KR, Aquilar JL, Bender MH, Nelson AL, and Weiser JN. (2006). Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins. *J Biol Chem.* *281(18)*, 12994-8.

Ritchie ND, Mitchell TJ, und Evans TJ. (2012). What is different about serotype 1 pneumococci? *Future Microbiol.* *7(1)*, 33-46.

Rubins JB, Charboneau D, Paton JC, Mitchell TJ, Andrew PW, und Janoff EN. (1995). Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest.* *95*, 142-50.

Rubins JB, und Janoff EN. (1998). Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med.* *131*, 21-7.

Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, Andrew PW, und Saibil HR. (2005). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell.* *121*, 247-56.

Tosi MF. (2005). Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol.* *116*, 241-9.

Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M, et al. (2010). Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* *11*, 55-62.

Tschopp J, Schroder K. 2010. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signaling pathways on ROS production? *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 210–15

Turett GS, Blum S, und Telzak EE. (2001). Recurrent pneumococcal bacteremia: risk factors and outcomes. *Arch Intern Med.* *17*, 2141-4.

Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, et al. 2011. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* *474*, 385–89

Sauer JD, Pereyre S, Archer KA, et al. (2011). *Listeria monocytogenes* engineered to activate the Nlr4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. *108*, 12419-24.

Schmeck B, Huber S, Moog K, et al. (2006). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappa B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. *290*, L730-L737.

Schuetz P, Christ-Crain M, und Müller B. (2007). Biomarkers to improve diagnostic and prognostic accuracy in systemic infections. Curr Opin Crit Care. *13*(5), 578-85.

Schroder NW, Morath S, Alexander C, et al. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. J Biol Chem. *278*, 15587-94.

Sharp FA, Ruane D, Claass B, et al. (2009). Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A *106*, 870-5.

Shio MT, Eisenbarth SC, Savaria M, et al. (2009). Malaria hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. PLoS Pathog. *5*(8), e1000559.

Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, et al. (2008). Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. Infect Immun. *76*(4), 1547-57.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, und Buell G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). Science. *272*(5262), 735-8.

Szakmany T, Hauser B, Radermacher P. (2012). N-acetylcystein for sepsis and systemic inflammatory response in adults. Cochrane Database of Systematic Reviews. *9*, CD006616. DOI: 10.1002/14651858.

Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501–505.

Van der Linden M, Heeg C, Imöhl M, und Reinert RR. (2008). Annual report of the National Reference Centre for Streptococci, 2007. *International Journal of Medical Microbiology*. 298S2, RKP04(4).

Van der Poll T, und Opal SM. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*. 374, 1543-56.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 5, 1166-74.

von Moltke J, Ayres JS, Kofoed EM, Chavarria-Smith J, und Vance RE. (2013). Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu Rev Immunol*. 31, 73-106.

Vladimer GI, Marty-Roix R, Ghosh S, Weng D, und Lien E. (2013). Inflammasomes and host defenses against bacterial infections. *Curr Opin Microbiol*. 16(1), 23-31.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, und Dinarello CA. (1991). A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. *FASEB J*. 5(3), 338-43.

Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A, Bhakdi S. (1995). Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J*. 14, 1607-14.

Wang Z, Choi MK, Ban T, et al. (2008). Regulation of innate immune responses by DAI (DLM-1/ZBP1) and other DNA-sensing molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 5477-82.

Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, et al. (2010). NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *J Clin Invest*. 120, 1645-62.

Waterer G und Rello J. (2011). Why should we measure bacterial load when treating community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis.* 24(2), 137-41.

Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EA, et al. (2010). Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 51(6), 692-9.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. (2011). Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet.* 378, 1962-73.

Weiser JN, Austrian R, Sreenivasan PK, Masure HR. (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: Relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun.* 62, 2582-9.

Welte T, Suttorp N, und Marre R. (2004). CAPNETZ-community-acquired pneumonia competence network. *Infection.* 32, 234-8.

Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. (2003). Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med.* 348(18), 1737-46.

Willingham SB, Allen IC, Bergstralh DT, et al. (2009). NLRP3 (NALP3, Cryopyrin) facilitates in vivo caspase-1 activation, necrosis, and HMBG1 release via inflammasome-dependent and – independent pathways. *J Immunol.* 183, 2008-15.

Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, et al. (2007). Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe.* 2, 147-59.

Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, et al. (2006). Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med.* 34, 1947-54.

Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, et al. (2011). The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* *187*, 434-40.

Wu J, Sun L, Chen X, et al. (2013). Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* *339(6121)*, 826-30.

Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, und Golenbock D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* *163*, 1-5

Zhao Y, Yang J, Shi J, et al. (2011). The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature.* *477(7366)*, 596-600.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Florence Pache, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Differentielle Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Pneumolysin selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Florence Pache hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Meixenberger K, Pache F, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan P, Witzenrath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol.* 2010.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Publikation 2: Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2011.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschul-
lehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

11 Lebenslauf

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

12 Publikationsliste

1. Meixenberger K, **Pache F**, Eitel J, Schmeck B, Hippenstiel S, Slevogt H, N'Guessan P, Witzentrath M, Netea MG, Chakraborty T, Suttorp N, Opitz B. *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol.* 2010.

2. Witzentrath M*, **Pache F***, Lorenz D*, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B*. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2011.

3. Bosmann M, Patel VR, Russkamp NF, **Pache F**, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA. MyD88-dependent production of IL-17F is modulated by the anaphylatoxin C5a via the Akt signaling pathway. *FASEB J.* 2011.

4. Bosmann M, Strobl B, Kichler N, Rigler D, Grailer JJ, **Pache F**, Murray PJ, Müller M, Ward PA. Tyrosine kinase 2 promotes sepsis-associated lethality by facilitating production of interleukin 27.. *J Leukoc Biol.* 2014.

In Revision

5. Hertwig L, Stürner KH, Borisow N, **Pache F**, Behrens J, Seeger B, Asselborn N, Romero S, Ruprecht K, Infante Duarte C*, Paul F*. Functionality of neutrophils in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis optica. *Multiple sclerosis journal.*

13 Danksagung

Meine Danksagung wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.