

Aus dem  
Charité Centrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie  
Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie  
Direktor: Professor Dr. med. N. Suttorp

## **Habilitationsschrift**

# EXTRA- UND INTRAZELLULÄRE MUSTERERKENNENDE REZEPTOREN IN DER ANGEBORENEN IMMUNANTWORT

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Bastian Opitz  
geboren am 13.2.1976 in Berlin

Eingereicht: 16.09.2008

Dekanin: Professor Dr. Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Professor Dr. Stefan Bauer

2. Gutachter: Professor Dr. Robert Bals

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Das angeborene Immunsystem.....	7
1.1.1 Mustererkennende Rezeptoren.....	8
<b>2 Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Eigene Ergebnisse .....</b>	<b>17</b>
3.1 Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die Erkennung von <i>Staphylococcus aureus</i> - und <i>Bacillus subtilis</i> -Lipoteichonsäuren sowie von <i>Treponema</i> -Glykolipiden.....	17
3.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i> aktiviert TLR1/2-, Rac1- und NF- $\kappa$ B-abhängig eine IL-8 Produktion in Lungenepithelzellen. ....	19
3.3 Erkennung von internalisierten Pneumokokken durch NOD2 .....	21
3.4 $\beta$ -PIX und Rac1 vermitteln eine Membranrekrutierung und eine Negativregulation von NOD2 .....	23
3.5 <i>Moraxella catarrhalis</i> wird in Lungenepithelzellen über einen “trigger-like” Mechanismus internalisiert und aktiviert eine TLR2- und zum Teil NOD1-abhängige angeborene Immunantwort .....	25
3.6 NOD1 vermittelt eine Endothelzellaktivierung durch <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> .....	26
3.7 Die Bedeutung von NOD1 und p38 MAPK für die IL-8-Produktion in <i>Listeria monocytogenes</i> -infizierten Endothelzellen.....	27
3.8 Die IFN $\beta$ -Produktion von Influenza A-Virus-infizierten Lungenepithelzellen ist abhängig von RIG-I sowie dem viralen NS1-Protein.....	29
3.9 Die Bedeutung von IPS-1, IRF3 und IFN $\beta$ für die Infektion von Lungenepithelzellen mit <i>Legionella pneumophila</i> .....	31
3.10 Intrazelluläre Bakterien und zytosolische DNA aktivieren IFN $\beta$ -Antworten in humanen Wirtszellen ohne Beteiligung von ZBP1 (DLM-1/DAI).....	32
3.11 Die Bedeutung von NAIP und Ipaf für die Legionellen-Infektion von humanen Wirtszellen.....	34
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1 Die Bedeutung extrazellulärer und intrazelluläre PRRs in verschiedenen Wirtszellen für die inflammatorische Genregulation und die Initiierung einer Immunantwort .....	36

4.2	<i>Erkennung von intrazellulären Bakterien und Induktion von Typ I IFNs</i> .....	39
4.3	<i>Die Bedeutung intrazellulärer PRRs für die Aktivierung von intrazellulären angeborenen Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Bakterien</i> .....	41
4.4	<i>Ausblick</i> .....	42
	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>44</b>
	<b>Summary</b> .....	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>47</b>
5.1	<i>Literaturverzeichnis der eigenen Publikationen</i> .....	47
5.2	<i>Literaturverzeichnis aller Autoren</i> .....	48
	<b>Danksagung</b> .....	<b>60</b>
	<b>Eidstattliche Erklärung</b> .....	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ASC	„apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD”
ATP	Adenosintriphosphat
BIR	„baculovirus inhibitor of apoptosis repeat”
Birc	„baculoviral IAP repeat-containing“
CARD	„caspase recruitment domain”
CFU	„colony forming units“
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CLR	„C-type lectin receptor”, C-Typ Lektin Rezeptor
COX	„cyclooxygenase”
DAMP	„danger-associated molecular pattern”, Gefahr-assoziiertes molekulares Muster
ds	doppelsträngig
ERK	„extracellular regulated-signal kinase”
FADD	„Fas-associated death domain“
FAK	„focal adhesion kinase”
FCS	„fetal calve serum”
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HAEC	„human aortic endothelial cell”, humane aortale Endothelzellen
HMGB1	„high mobility group box 1”
HUVEC	„human umbilical vein endothelial cell”, humane Umbilikalvenenendothelzellen
IDO	„indolamin-2,3-dioxygenase”
IFN	Interferon
IFNAR	„IFN $\alpha/\beta$ receptor”
IL-1R	IL-1 Rezeptor

I $\kappa$ B	„inhibitory- $\kappa$ B“
IKK	„inhibitory- $\kappa$ B kinase“
iNOs	„inducible nitric oxide synthase“
I $\rho$ af	„IL-1 $\beta$ converting enzyme (caspase-1) activating factor“
IPS-1	„IFN $\beta$ promoter stimulator 1“
IRAK	„IL-1R-associated kinase“
IRF	„interferon-regulatory factor“
IRG	„immunity-related GTPase“
ISG	„IFN-stimulated gene“
JNK	„c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase“
LBP	„LPS-binding protein“
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	„leucine rich repeat“
MAMP	„microbe-associated molecular pattern“, Mikroben-assoziiertes molekulares Muster
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
MBL	„mannan-binding lectin“
MDA5	„melanoma differentiation-associated gene 5“
MDP	Muramyl-dipeptid
MHC II	„major histocompatibility complex II“, Haupthistokompatibilitätskomplex II
MOI	„multiplicity of infection“
MyD88	„myeloid differentiation factor 88“
NAIP	„neuronal apoptosis inhibitory protein“
Nalp	„NOD-, LRR- and PYD-domain containing protein“
NF- $\kappa$ B	„nuclear factor $\kappa$ B“
NLR	„NOD-like receptor“, NOD-like Rezeptor
NLRX1	„NOD-like receptor X1“

NO	„nitric oxide“
NOD	„nucleotide-binding oligomerization domain“
NS1	„non-structural protein 1“
PAMP	„pathogen-associated molecular pattern“, Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PI3K	„phosphatidylinositol 3 kinase“
PIX	„p21-activated kinase [Pak]-interacting exchange factor“
PRR	„pattern recognition receptor“, mustererkennender Rezeptor
PYD	„pyrin domain“
RIG-I	„retinoic acid inducible gene-I“
Rip	„receptor interacting protein“
RLR	„RIG-like receptor“, RIG-like Rezeptor
RNAi	„RNA interference“
si	„small interfering“
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
TAB	„TAK1-binding protein“
TAK	„transforming growth factor $\beta$ activating kinase“
TBK	„TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase 1“
TIR	„Toll/IL-1R“
TLR	„Toll-like receptor“, Toll-like Rezeptor
TRAF	„tumor necrosis factor receptor-associated factor“
ZBP-1	„Z-DNA-binding protein 1“

# 1 Einleitung

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen mit Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Bei höheren Vertebraten wird die angeborene Immunantwort („innate immunity“) von der erworbenen Immunität („adaptive immunity“) unterschieden (Janeway, Jr., 1989). Das erworbene Immunsystem bildete sich vor ca. 450 Millionen Jahren aus. Es erlaubt die Wiedererkennung von Pathogenen bei darauffolgenden Infektionen und bot damit einen Selektionsvorteil. Die phylogenetisch ältere angeborene Immunität, von der Formen in allen mehrzelligen Organismen und Pflanzen zu finden sind, blieb jedoch erhalten (Hoffmann *et al.*, 1999). Die angeborene Immunität spielt auch bei höheren Vertebraten eine Schlüsselrolle in der initialen Infektionsabwehr und steuert die darauffolgende erworbene Immunantwort. Obwohl die letzten 10 Jahre wesentliche Fortschritte im Verständnis des angeborenen Immunsystems erbachten, blieben viele Mechanismen, z.B. zur Erkennung und Abwehr intrazellulärer Mikroorganismen, noch unvollständig verstanden.

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem erkennt und bekämpft eindringende Pathogene sofort. Abhängig vom Ort des Pathogen-Wirtkontaktes und der Art der Mikroorganismus werden die Krankheitserreger schon oberflächlich von Epithelzellen oder ortsansässigen Makrophagen und dendritischen Zellen erkannt (z.B. *S. pneumoniae* in den normalerweise sterilen unteren Atemwegen) und/oder werden zum Teil erst nach Invasion bzw. Überwindung der Epithelbarriere von Epithelzellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen detektiert (z.B. *Shigella flexneri* in dem mit Kommensalen besiedelten Darm) (Akira *et al.*, 2006; Meylan *et al.*, 2006; Opitz *et al.*, 2007c; Opitz *et al.*, 2007a; Sansonetti, 2004). Darauf folgend werden extrazelluläre Mikroorganismen z.B. durch sofort produzierte antimikrobielle Peptide bekämpft (Hancock and Sahl, 2006) oder (z.T. abhängig vom Komplementsystem) phagozytiert (Blander and Medzhitov, 2006a). Intrazelluläre Mikroorganismen werden u.a. durch zellautonome, intrazelluläre angeborene Abwehrmechanismen bekämpft (Radtke and O’Riordan, 2006). Darüber hinaus werden inflammatorische Zytokine, Interferone und Chemokine von Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Epithel- und ggf. Endothelzellen (z.B. nach Eindringen der Pathogene in das Gefäßsystem) produziert. Diese Mediatoren sind an der Regulation der angeborenen intrazellulären Resistenzmechanismen sowie an der Produktion von antimikrobiellen Peptiden beteiligt und steuern eine Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und anderen Immunzellen, die zur weiteren angeborenen Immunantwort beitragen. Diese Reaktionen können ausreichen, um eine Ausbreitung der Infektion zu verhindern. Anderenfalls steuern insbesondere die dendritischen Zellen durch Antigenpräsentation auf Haupthistokompatibilitätsantigenen („major histocompatibility complex II“, MHC II), durch die Expression kostimulierender Moleküle sowie durch die Sekretion weiterer inflammatorischer Mediatoren eine verzögert einsetzende adaptive Immunantwort (Hoebe *et al.*, 2004; Iwasaki and Medzhitov, 2004). Im Folgenden soll insbesondere auf die initiale Erkennung der Mikroorganismen durch den Wirt genauer eingegangen werden.

### 1.1.1 Mustererkennende Rezeptoren

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfolgt z.B. nach Erkennung von Mikroorganismen durch keimbahnkodierte Rezeptoren. Einerseits kodiert nur eine Minderzahl der auf ca. 23.000-26.000 geschätzten Gene des menschlichen Genoms Proteine des Immunsystems (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Andererseits ist die Gruppe der mikrobiellen Pathogene sehr heterogen und weist eine hohe Mutationsrate auf. Charles Janeway entwickelte das Konzept der Erkennung von hoch konservierten, mikrobiellen Molekülen, den Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), durch eine begrenzte Anzahl von mustererkennenden Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) (Janeway, Jr., 1989). Das Prinzip der Pathogenerkennung des angeborenen Immunsystems unterscheidet sich somit grundsätzlich von der Aktivierung des erworbenen Immunsystems, bei dem durch somatisches Genrearrangement der Antigenrezeptoren eine Erkennung von Myriaden von verschiedenen Antigenen erfolgen kann.

Das Konzept von Janeway besitzt weiterhin fast uneingeschränkte Gültigkeit, auch wenn heutzutage davon ausgegangen wird, dass nicht ausschließlich Pathogen-assoziierte Moleküle eine angeborene Immunreaktion hervorrufen können. So können auch Moleküle von nicht-pathogenen Mikroorganismen durch PRRs erkannt werden. Deshalb hat sich alternativ zum Ausdruck PAMP auch die Bezeichnung MAMP (microbe-associated molecular pattern) etabliert. Darüber hinaus scheinen einige endogene Moleküle, welche bei Entzündungsreaktionen oder anderen pathologischen Bedingungen freigesetzt werden (sogenannte Gefahr-assoziierte molekulare Muster, danger-associated molecular patterns, DAMPs), ebenfalls von PRRs erkannt zu werden. Beispiele für PAMPs/MAMPs sind bakterielle Zellwandbestandteile, wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäuren, Peptidoglykane und bakterielle Lipopeptide, mikrobielle Nukleinsäuren sowie bakterielles Flagellin, während (freigesetzte) endogene Nukleinsäuren, ATP, Mrp8, Mrp14 und HMGB1 zu den DAMPs gezählt werden können (Akira *et al.*, 2006; Meylan *et al.*, 2006).

Die Pathogenerkennung erfolgt durch lösliche, membranständige oder intrazelluläre PRRs: Zu den löslichen PRRs gehören z.B. das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP) und das Mannan-bindende Lektin (MBL). Membranständige PRRs umfassen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-type Lektin Rezeptoren (CLRs). Zu den erst kürzlich identifizierten intrazellulären PRRs gehören die NOD-like Rezeptoren (NLRs), die RIG-like Rezeptoren (RLRs) sowie (möglicherweise) das Z-DNA-bindende Protein 1 (ZBP1, auch DLM-1 oder DAI genannt) (Akira *et al.*, 2006; Beutler *et al.*, 2007; Fritz *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007b; Meylan *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2006; Takaoka *et al.*, 2007; Yoneyama and Fujita, 2007; Zweigner *et al.*, 2006). Diese PRRs steuern viele der oben beschriebenen angeborenen Abwehrmechanismen. Lösliche PRRs können z.B. eine bessere Erkennung von PAMPs durch membranständige PRRs oder eine Komplementaktivierung vermitteln. Viele membranständige und zytosolische PRRs aktivieren hingegen Signalkaskaden und (I) eine nachfolgende Transkription von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, antimikrobiellen Peptiden und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen, (II) eine Expression von Typ I IFNs und IFN-abhängigen Genen, und (III) eine post-translationelle Zytokinenregulation. Etwas weniger im Mittelpunkt der Forschung der letzten Jahre stand die Bedeutung der PRRs für die Steuerung eines programmierten Zelltods (IV), von Phagozytose (V), einer Phagosomenmaturierung (VI), von Antigenpräsentation auf MHC II-Molekülen (VII) sowie von zellautonomen angeborenen Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Mikroorganismen (VIII). So existieren deutliche Hinweise darauf, dass diese zellulären Prozesse ebenfalls durch einige transmembranäre und intrazelluläre PRRs aktiviert zu werden scheinen (siehe unten).



### 1.1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Die TLRs sind evolutionär konserviert und finden sich wahrscheinlich in allen mehrzelligen Organismen. Sie sind benannt nach dem *Toll*-Protein (*dToll*), welches erstmalig in *Drosophila melanogaster* als ein für die dorso-ventrale Polarisation der Ontogenese entscheidendes Gen identifiziert wurde (Anderson *et al.*, 1985). Gay und Keith entdeckten Sequenzhomologien zwischen den zytoplasmatischen Domänen von *dToll* und des humanen Interleukin-1 Rezeptors (IL-1R) (Gay and Keith, 1991). Über diese intrazellulären Toll-IL-1R (TIR)-Domänen aktivieren der IL-1-Rezeptor sowie das *dToll*-Protein Signaltransduktionswege, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Nukleären Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-Familie führen (Lemaitre *et al.*, 1996). NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren nehmen Schlüsselrollen in der Regulation von inflammatorischen Genen ein (Ghosh and Karin, 2002). Die Bedeutung von *dToll* und verwandten Proteinen für die angeborene Immunantwort in *Drosophila* war damit erstmalig erkannt und beschrieben.

Medzhitov *et al.* fanden 1997 das erste humane *dToll*-Homolog (Medzhitov *et al.*, 1997), welches später als Toll-like-Rezeptor (TLR)4 benannt wurde. Sie zeigten, dass konstitutiv-aktive TLR4-Mutanten NF- $\kappa$ B-abhängige Gene für verschiedene Zytokine und kostimulierende Moleküle aktivierten und wiesen so auf deren Bedeutung für die angeborene Immunität im Menschen hin. Inzwischen sind 10 TLRs im Menschen identifiziert worden. TLRs sind transmembranäre Proteine, welche an der Zelloberfläche (TLR1, -2, -4-6, -10) oder in endosomalen Membranen (TLR3, -7-9) lokalisiert sind (Abb. 1). Sie besitzen Leucin-reiche Domänen („leucin-rich repeats“), welche nach extrazellulär oder intraendosomal gewandt sind und der Ligandenerkennung dienen. Ausserdem besitzen sie die intrazellulären TIR-Domänen (Akira and Takeda, 2004a; Beutler *et al.*, 2007).

Für die meisten TLRs mit Ausnahme von TLR10 konnten Liganden identifiziert werden: So erkennt TLR2 zusammen mit TLR1 oder TLR6 u.a. bakterielle tri- oder diazetylierte Lipopeptide sowie das Zymosan von Hefen (Aliprantis *et al.*, 1999; Schwandner *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002; Underhill *et al.*, 1999a; Underhill *et al.*, 1999b). TLR3 und TLR7/8 detektieren virale doppelsträngige (ds) oder einzelsträngige (ss, single stranded) RNA (Alexopoulou *et al.*, 2001; Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004), TLR4 ist der Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien (Poltorak *et al.*, 1998) und erkennt wahrscheinlich auch einige virale Proteine sowie möglicherweise endogene Faktoren, wie „heat shock“-Proteine und Fibrinogen (Beutler, 2007). TLR5 erkennt extrazelluläres bakterielles Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001), und TLR9 virale und bakterielle CpG-DNA (Hemmi *et al.*, 2000). Darüber hinaus fungieren u.a. die Moleküle CD14 und CD36 als Ko-Rezeptoren für TLR4 und/oder TLR3 und TLR2 (Hoebe *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 1990). Im Unterschied zum guten Verständnis der Aktivatoren vieler TLRs blieb die Frage der Erkennung von Lipoteichonsäuren (LTAs) und verwandten Glykolipiden lange Zeit nicht vollständig geklärt (siehe unten).

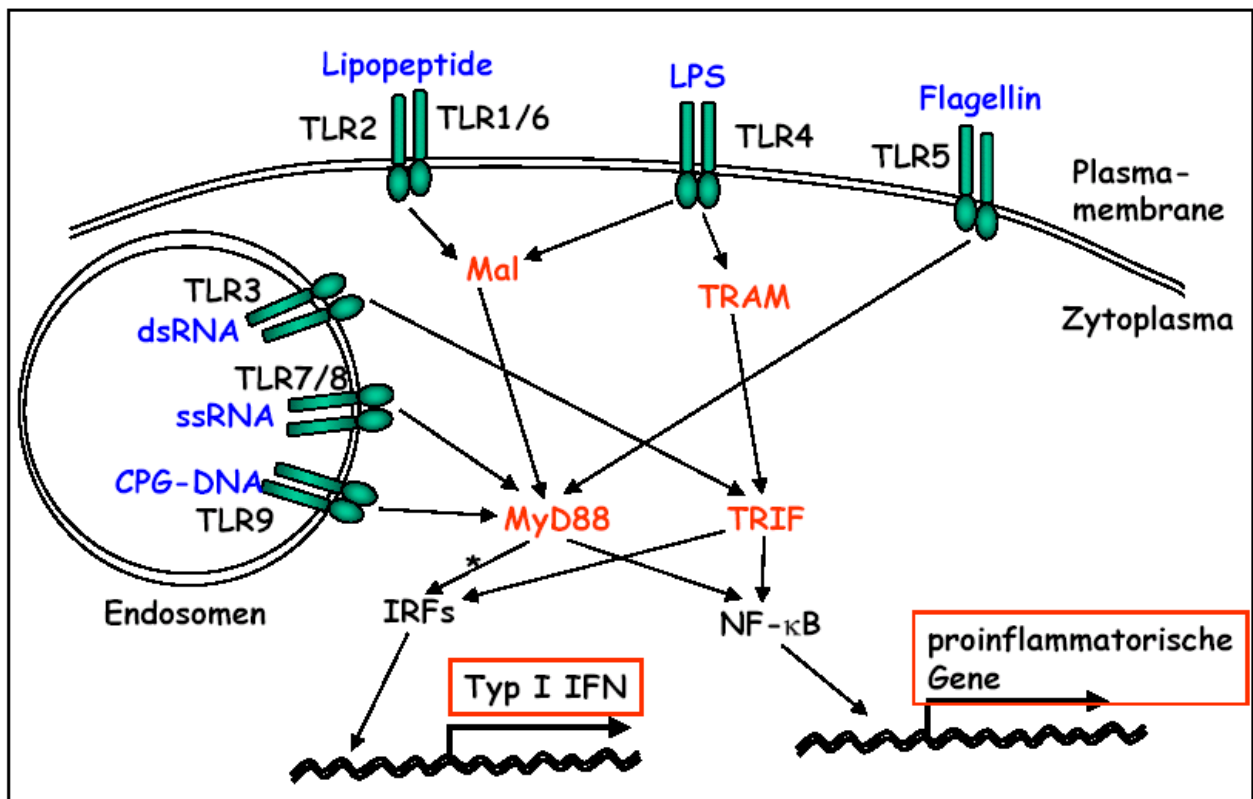


Abb. 1: Überblick über die 10 humanen TLRs. \*Die MyD88-abhängige IRF(5/7)-Aktivierung scheint nur in den TLR7-9-stimulierten Signalwegen funktionell zu sein.

Die TLR-aktivierte Signaltransduktion hängt von der Rekrutierung der vier Adaptermoleküle MyD88, Mal, TRIF und TRAM ab (Akira and Takeda, 2004b; O'Neill and Bowie, 2007). Alle TLRs mit Ausnahme von TLR3 aktivieren eine MyD88-abhängige Signalkaskade, an der die Signalmoleküle IRAK1/4, TRAF6, TAK1 und IKK $\beta$ / $\gamma$  beteiligt sind. Sie mündet in einer NF- $\kappa$ B-abhängigen, inflammatorischen Genexpression. Darüber hinaus werden verschiedene „mitogen-associated protein kinases“ (MAPKs), wie z.B. p38, ERK und JNK, aktiviert. Im Gegensatz zur NF- $\kappa$ B- und MAPK-Aktivierung induzieren nur einige TLRs zusätzlich eine von den IRF-Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF3 und IRF7) abhängige Expression von Typ I Interferonen (IFN) und nachfolgend von IFN-abhängigen Genen (siehe unten): So aktivieren TLR3 und TLR4 über die Moleküle TRIF, TRAF3, TBK1/IKKi die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7. TLR7-9 steuern die Typ I IFN-Expression über eine MyD88-IRAK1/4-TRAF6-IKK $\alpha$ -IRF7/5-Signalkaskade (Akira and Takeda, 2004b; O'Neill and Bowie, 2007). Kürzlich wurde mit SARM ein fünftes TIR-Domänen enthaltendes Adaptermolekül identifiziert, welches die TRIF-abhängige Signaltransduktion negativ zu regulieren scheint (Carty *et al.*, 2006).

Insgesamt regulieren die TLRs neben der Expression von NF- $\kappa$ B- und IRF-IFN $\alpha$ / $\beta$ -abhängigen Genen noch weitere Aktivitäten. So scheinen die TLRs (1.) Autophagie steuern zu können, einen zellulären Homöostase-/Abwehrmechanismus bei dem Teile des Zytoplasma, intrazelluläre Organellen oder Pathogene von einer charakteristischen Doppelmembran-Vakuole umschlossen und dem Lysosomen zugeführt werden (Sanjuan *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007). Darüber hinaus kann unter bestimmten Umständen die TLR-Aktivierung zu (2.) verschiedene Arten von programmierten Zelltod (Aliprantis *et al.*, 1999; Aliprantis *et al.*, 2000; Salaun *et al.*, 2007) und (3.) möglicherweise zu einer Phagosomenmaturierung (Blander and Medzhitov, 2004; Yates and Russell, 2005)

sowie (4.) zu MHC-abhängigen Antigenpräsentationen (Blander and Medzhitov, 2006b; West *et al.*, 2004) beitragen. Zusammengenommen spielen die TLRs eine Schlüsselrolle in der Immunantwort gegenüber unterschiedlichen Pathogenen.

### 1.1.1.2 NOD-like Rezeptoren

Während die große Bedeutung der TLRs für die (angeborene) Immunantwort als gesichert galt und weiter gilt, deuteten verschiedene Beobachtungen auf die Existenz und wichtige Funktion intrazellulär lokalisierter PRRs hin. So zeigten Studien von Dana Philpott/Stephen Girardin, dass nur invasive *S. flexneri*, nicht aber nicht-invasive Shigellen, eine NF- $\kappa$ B-abhängige IL-8-Produktion in Epithelzellen auslösten (Philpott *et al.*, 2000), und dass diese Wirtszellantwort abhängig von dem intrazellulären PRR NOD1 war (Girardin *et al.*, 2001). Inzwischen sind 22 NLRs in der Maus bzw. im Menschen identifiziert, und zum Teil funktionell charakterisiert worden (Abb. 2).

NLRs weisen Strukturähnlichkeiten mit einer Untergruppe der R-Proteine („resistance proteins“) der Pflanzen auf. Sie bestehen aus zentralen „nucleotide-binding oligomerization“ (NOD)-Domänen, C-terminalen LRR-Domänen, welche wahrscheinlich der Ligandenerkennung dienen, sowie aus N-terminalen Effektor bindenden Domänen (Fritz *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007b; Ting *et al.*, 2006). Diese Effektor-Domänen dienen der Bindung von Signalmolekülen und der Aktivierung von Signalkaskaden. Da unterschiedliche NLR-Untergruppen entweder z.B. CARDs (caspase recruitment domains), PYDs (pyrin domains) oder BIRs (baculovirus inhibitor of apoptosis repeats) als Effektor-Domänen exprimieren, aktivieren unterschiedliche NLRs auch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und nachfolgend unterschiedliche Wirtszellantworten.

Zu den zuerst identifizierten und am besten charakterisierten NLRs gehören NOD1 und NOD2 (Bertin *et al.*, 1999; Hugot *et al.*, 2001; Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001a; Ogura *et al.*, 2001b). Beide Moleküle exprimieren eine CARD-Domäne und erkennen intrazellulär bakterielles Peptidoglykan. Während NOD1 durch *meso*-Diaminopimelinsäure enthaltende Peptidoglykanfragmente aktiviert wird, welche v.a. (aber nicht ausschließlich) in Gram-negativen Bakterien vorkommen, erkennt NOD2 das Muramyldipeptid (MDP) MurNAc-L-Ala-D-isoGln, welches in allen Peptidoglykanen enthalten ist (Chamaillard *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003a; Girardin *et al.*, 2003b; Inohara *et al.*, 2003). Sowohl NOD1 als auch NOD2 aktivieren (1.) über die Kinase Rip2 den I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK) und nachfolgend NF- $\kappa$ B sowie (2.) über das Adaptermolekül CARD9 die JNK MAPK (Chin *et al.*, 2002; Hsu *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2002). NF- $\kappa$ B und MAPK steuern nachfolgend die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Peptiden sowie von Chemokinen, wie z.B. IL-8. Zusätzlich zu diesen inflammatorischen Kaskaden scheinen NOD1 und NOD2, unter bestimmten Umständen, abhängig von Caspase-8 und Caspase-9, Apoptose induzieren zu können (Da Silva *et al.*, 2007; Inohara *et al.*, 1999). Während also die NOD1/2-aktivierenden PAMPs und einige NOD1/2-stimulierten Hauptsignaltransduktionen charakterisiert wurden, blieb die Bedeutung von NOD1 und NOD2 für die Infektion von verschiedenen Wirtszellen mit intakten Bakterien sowie weitere Aspekte der Signaltransduktion weiterhin wenig verstanden.

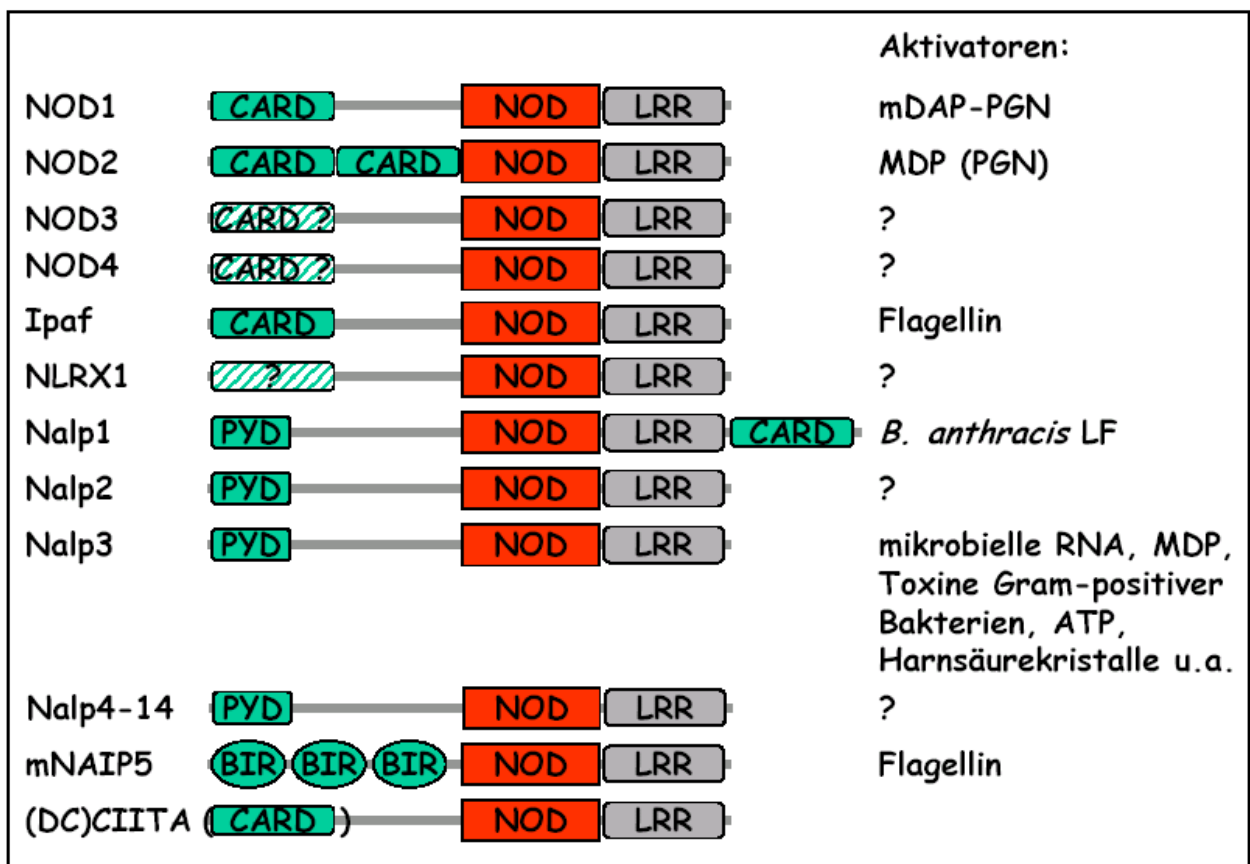


Abb. 2: Überblick über die Struktur der 22 humanen NLRs und ihre Aktivatoren (soweit bekannt). LT, Letalitäts-Faktor; mDAP, *meso*-Diaminopimelinsäure; PGN, Peptidoglykan

Ein zusätzliches CARD enthaltendes NLR-Molekül ist Ipaf (CARD12, CLAN). Es konnte gezeigt werden, dass mIpaf intrazellulär und unabhängig von TLR5 Salmonellen- und Legionellen-Flagellin erkennt (Amer *et al.*, 2006; Franchi *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). Andere Studien zeigten zudem auch eine von Ipaf abhängige Wirtszellaktivierung durch nicht-flagellierte Shigellen (Suzuki *et al.*, 2007) sowie durch LPS und Peptidoglykan (Damiano *et al.*, 2004). Das deutet darauf hin, dass Ipaf möglicherweise nicht im wörtlichen Sinne einen PRR selbst darstellt, sondern als nachgeschaltetes Adaptermolekül eines noch zu identifizierenden PRRs fungiert. Die Aktivierung von Ipaf in Mauszellen führt wahrscheinlich unter Beteiligung von ASC zu einer Caspase-1-abhängigen Prozessierung von pro-IL-1 $\beta$  und zu einer Sekretion von reifem IL-1 $\beta$  (Franchi *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). mIpaf kann zudem (ASC-unabhängig) einen Caspase-1-abhängigen programmierten inflammatorischen Zelltod (Pyroptosis) aktivieren (Suzuki *et al.*, 2007; Zamboni *et al.*, 2006), und möglicherweise Autophagie inhibieren (Schmid and Munz, 2007; Suzuki *et al.*, 2007). Außerdem wurde beschrieben, dass mIpaf und Caspase-1 eine Phagosomenreife und nachfolgend ein lysosomales Abtöten von intraphagosomalen *Legionella* in Mauszellen stimulieren kann (Amer *et al.*, 2006).

Ein weiteres wichtiges NLR-Molekül für die angeborene intrazelluläre Abwehr von *L. pneumophila* in Mausmakrophagen ist das BIR-Domänen enthaltende mNAIP5 (Birc1e): In Mäusen entscheiden verschiedene NAIP5/Birc1e-Allele, ob Makrophagen eine intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* erlauben oder behindern, und ob die Maus (moderat) empfänglich oder resistent gegenüber einer Legionellen-Infektion ist (Diez

*et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2003). In resistenten Mausstämmen scheint ein funktionelles NAIP5 die Erkennung von Legionellen-Flagellin und eine Restriktion der Legionellen-Vermehrung zu vermitteln (Derre and Isberg, 2004; Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006; Zamboni *et al.*, 2006). Als zugrundeliegende Mechanismen werden ein von der Caspase-1 abhängiger Zelltod (Pyroptose) (Molofsky *et al.*, 2006b; Zamboni *et al.*, 2006), Einflüsse von NAIP5 auf die Maturierung des Legionellen enthaltenen Phagoendosoms (Fortier *et al.*, 2007) sowie Autophagie (Amer and Swanson, 2005) diskutiert. Im Gegensatz zur Resistenz der meisten Mausstämme gegenüber einer Legionellen-Infektion unterstützen humane Makrophagen und Lungenepithelzellen eine intrazelluläre *L. pneumophila*-Vermehrung. Menschen können zudem das grippeartige Pontiac-Fieber oder schwere Pneumonien (Legionnaires-Krankheit) nach einer Legionellen-Infektion entwickeln. Diese Unterschiede in der Empfänglichkeit von Maus und Mensch warf die Frage auf, ob humane, zu murinem NAIP5 und Ipaf orthologe Proteine ebenfalls in der Lage sind, die intrazelluläre Legionellenreplikation zu hemmen.

Die 14 Mitglieder der Nalp-Untergruppe der NLRs sind durch PYD-Domänen charakterisiert. Nalp1-3 und wahrscheinlich auch noch weitere Nalps bilden zusammen mit ASC und der Caspase-1 Inflammasome genannte Multiproteinkomplexe (Martinon *et al.*, 2002). Sie reagieren auf unterschiedliche PAMPs und DAMPs: So scheint das Nalp1-Inflammasom durch MDP und den *B. anthracis*-Letalitäts-Faktor aktiviert zu werden (Boyden and Dietrich, 2006; Faustin *et al.*, 2007). Das Nalp3 (Cryopyrin)-Inflammasom vermittelt eine Caspase-1-Aktivierung und nachfolgende IL-1 $\beta$ -Sekretion z.B. nach Stimulation mit bakterieller RNA, MDP, LPS, Gicht-assoziierten Harnsäurekristallen, ATP und bakteriellen Toxinen sowie bei einer *S. aureus*-Infektion (Kanneganti *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007a; Mariathasan *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2004; Martinon *et al.*, 2006). Ähnlich wie für Ipaf diskutiert, gilt auch für die Nalps, dass ihre Aktivierung durch die sehr unterschiedlichen PAMPs und DAMPs auf eine Adaptermolekül-Funktion und weniger auf eine Rezeptor-Funktion hindeutet. Die Nalp3-Inflammasom-Aktivierung durch mikrobielle Produkte und ATP wurde allerdings als TLR-unabhängig beschrieben (Kanneganti *et al.*, 2007a). Nalp1- und Nalp3-Stimulationen scheinen hingegen von einem Anstieg der intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration abzuhängen, welche entweder durch Bindung von ATP an den P2X<sub>7</sub>-Rezeptor oder direkt durch Porenbildung infolge bakterieller Toxine hervorgerufen werden kann. Die Nalp3-Aktivierung durch bakterielle Moleküle plus ATP scheint außerdem von der nachfolgenden Passage der Bakterienkomponenten durch große Pannexin-1-abhängige Poren sowie von SGT und Hsp90 abzuhängen (Kanneganti *et al.*, 2007a; Mayor *et al.*, 2007). Die Aktivatoren und Funktionen vieler weiterer Nalps ist bisher nicht untersucht worden.

Zusätzlich zu den oben erwähnten CARD-, BIR- oder PYD-Domänen enthaltenen NLRs wurde kürzlich das NLR-Molekül NLRX1 (auch NOD9 genannt) beschrieben, welches eine putative Mitochondrienlokalisationssequenz anstatt der bekannten Effektor-domänen zu exprimieren scheint (Moore *et al.*, 2008; Tattoli *et al.*, 2008). Während potentielle Liganden oder Aktivatoren von NLRX1 noch nicht bekannt sind, scheint NLRX1 zum Einen die IFN $\alpha/\beta$ -Wirtszellantworten auf Virusinfektionen negativ zu regulieren und zum Anderen die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) in Bakterien-infizierten Zellen zu steuern.

Zusammengefasst weisen verschiedene Studien zu den NLRs klar auf die Existenz eines TLR-unabhängigen, intrazellulären Erkennungssystems von PAMPs und DAMPs hin. Andererseits blieben und bleiben wichtige Aspekte der NLR-Funktionen, insbesondere ihre Bedeutung für Infektion von verschiedenen humanen Wirtszellen mit intakten Bakterien, noch unzureichend verstanden.

### 1.1.1.3 RIG-like Rezeptoren

Die kürzlich identifizierten RNA-Helikasen RIG-I (retinoic acid inducible gene-I) und MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) können als weitere PRR-Familie klassifiziert werden (nachfolgend als RIG-like Rezeptoren (RLRs) bezeichnet) (Andrejeva *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004). Beide Moleküle bestehen aus einer DexD/H-Box-RNA-Helikase-Domäne zur "Ligandenerkennung" sowie aus zwei CARDS, welche die Signaltransduktionen vermitteln. Beide Proteine erkennen virale 5'-phosphorilierte ssRNA bzw. dsRNA im Wirtszellzytosol (Andrejeva *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2006; Pichlmair *et al.*, 2006; Yoneyama *et al.*, 2004). Aktuelle Publikationen zeigen aber auch, dass RIG-I und MDA5 auf unterschiedliche Virusspezies reagieren können (Kato *et al.*, 2006). Die deutlich abgeschwächten Immunreaktionen auf Virusinfektionen von RIG-I- und MDA5-defizienten Mäusen *in vivo* zeigen zudem die wichtigen Funktionen von RIG-I- bzw. MDA5-abhängigen angeborenen Immunreaktionen für die weitere Steuerung der adaptiven Immunität und die Viruseradikation (Kato *et al.*, 2006).

Sowohl RIG-I als auch MDA5 rekrutieren das Adaptermolekül IPS-1 (auch MAVS, VISA oder Cardif genannt), um zwei intrazelluläre Hauptsignalkaskaden zu aktivieren (Kawai *et al.*, 2005; Meylan *et al.*, 2005; Seth *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2005). Erstens wird eine Expression von Typ I IFNs und IFN-abhängigen Genen über die Signalmoleküle TRAF3 und TBK1/IKKi und die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 induziert. Zweitens wird eine NF- $\kappa$ B-abhängige Genexpression durch die Aktivierung/Rekrutierung von Rip1, FADD, des IKK-Komplex und schließlich von NF- $\kappa$ B gesteuert (Abb. 3).

Im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 exprimiert das dritte RLR-Familienmitglied Lgp2 keine CARD-Domänen und scheint daher nicht in der Lage zu sein, intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren (Rothenfusser *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2005). Initiale *in vitro*-Studien deuteten auf eine negative Regulation von RIG-I und MDA5 durch Lgp2 hin, entweder durch kompetitive Sequestrierung von dsRNA und/oder durch Bindung von Signalmolekülen der RIG-I/MDA5-Signalwege (Komuro and Horvath, 2006; Rothenfusser *et al.*, 2005; Yoneyama *et al.*, 2005). Darauf folgende *in vivo*-Studien in Lgp2-knock-out-Mäusen unterstützen die Annahme einer negativen Regulation von RIG-I durch Lgp2, deuteten aber auf eine positive Regulation der MDA5-abhängigen Signaltransduktion durch Lgp2 hin (Venkataraman *et al.*, 2007). Zusätzlich scheinen RIG-I und möglicherweise MDA5 durch die Ubiquitin Ligase RNF125 negativ reguliert zu werden (Arimoto *et al.*, 2007). Die Aktivierung von MDA5 (nicht aber von RIG-I) wird außerdem durch die Dihydroxyacetonkinase kontrolliert (Diao *et al.*, 2007).

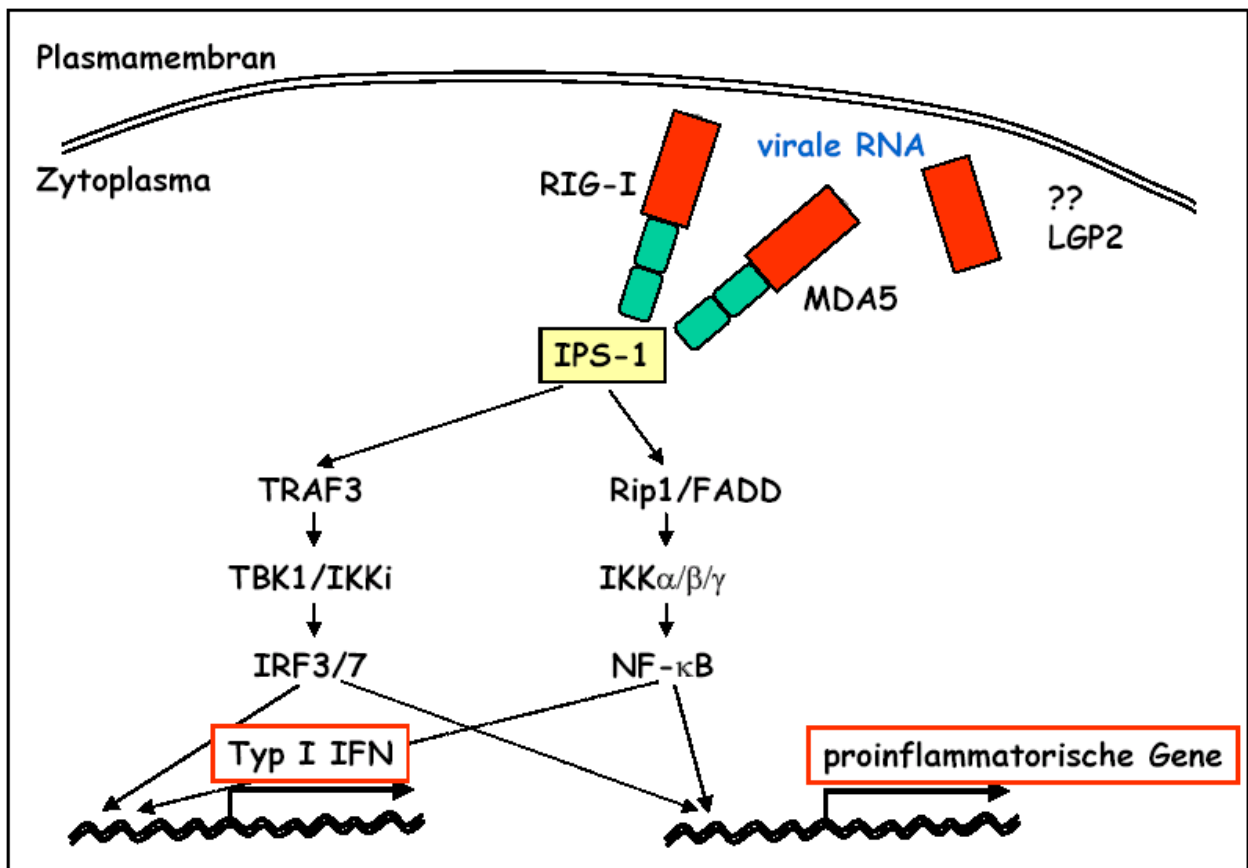


Abb. 3: Überblick über die RLRs und ihre Signalkaskaden.

Zusammengefasst besteht mit den RLRs eine weitere Familie von PRRs, welche wichtige Funktionen in der angeborenen Immunantwort auf Virusinfektionen übernehmen.

Insgesamt wurden in den letzten Jahren zwar große Fortschritte im Verständnis der Pathogenerkennung erzielt, jedoch bestanden/bestehen insbesondere zur intrazellulären Erkennung von intakten Pathogenen in klassischen Immunzellen (z.B. Makrophagen) und nicht-klassischen Immunzellen (wie Lungenepithelzellen und Endothelzellen) sowie zu den davon regulierten Signalkaskaden und zellulären Prozessen weiterhin große Wissenslücken. Mit den im Folgenden aufgeführten Arbeiten soll ein Beitrag zur Beantwortung einiger offenen Fragen geleistet werden.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Das angeborene Immunsystem spielt eine zentrale Rolle für die Verteidigung des Wirtes gegen eindringende Krankheitserreger. Es vermittelt die initiale Erkennung der Pathogene, steuert erste Abwehrmechanismen und kontrolliert die nachfolgend einsetzende erworbene Immunantwort. In den letzten ca. 10 Jahren wurden mit den TLRs, NLRs und RLRs verschiedenartige Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) identifiziert, die mikrobielle Moleküle (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) entweder extrazellulär oder intrazellulär in der Wirtszelle erkennen können. Die Zielsetzung der Arbeit war es, die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Erkennung von isolierten PAMPs, wie z.B. Lipoteichonsäuren, sowie von Infektionen mit intakten, extrazellulären und intrazellulären Pathogenen in unterschiedlichen Wirtszellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die Signaltransduktionskaskaden einiger PRRs sowie der Einfluss der PRRs auf intrazelluläre Resistenzmechanismen weiterführend charakterisiert werden.



### 3 Eigene Ergebnisse

#### 3.1 Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die Erkennung von *Staphylococcus aureus*- und *Bacillus subtilis*-Lipoteichonsäuren sowie von *Treponema*-Glykolipiden

**Opitz B**, Schröder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zähringer U, Hartung T, Göbel UB, Schumann RR. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem.* 2001;276:22041-7.

Die transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen hoch konservierte mikrobielle Moleküle, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) und bakterielle Lipopeptide. Während LPS zu einer TLR4-abhängigen Wirtszellaktivierung führt und Lipopeptide von TLR2 erkannt werden, blieb die genaue Identität des Rezeptors für Lipoteichonsäuren (LTA) und für verwandten Glykolipide ungeklärt. Um die Bedeutung von TLR2 und TLR4 für die Erkennung dieser bakteriellen Moleküle zu ermitteln, haben wir verschiedene TLR2-negative Zelllinien, TLR4-defiziente C3H/HeJ-Mausmakrophagen und hemmende TLR4/MD2-Antikörper verwendet sowie TLR-Überexpressionsstudien durchgeführt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Glykolipide von *Treponema maltophilum* und *Treponema brennaborensis* sowie hoch-aufgereinigte LTA von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* TLR2-abhängig NF-κB sowie eine Zytokinproduktion aktivierten. Die *T. brennaborensis*-Glykolipide wurden darüber hinaus auch von TLR4 erkannt. Eine Fraktionierung dieser Glykolipide durch Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie und nachfolgende Zellstimulationsexperimente zeigten zwei Aktivitätsmaxima, eins mit TLR2- und das zweite mit TLR4-Aktivität. In Überexpressionsexperimenten mit dominant-negativen Mutanten fanden wir, dass sowohl die *Treponema*-Glykolipide als auch die *S. aureus*- und *B. subtilis*-LTAs eine MyD88- und NIK-abhängige Signaltransduktion aktivierten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse die Wichtigkeit von TLR2 für die LTA- und *Treponema*-Glykolipid-stimulierten Wirtszellantworten.

Während somit die wichtige Bedeutung von TLR2 für die Erkennung von bakteriellen Lipoteichonsäuren und verwandten Glykolipiden bestimmt wurde, sollten nachfolgende Untersuchungen die Rolle von TLR2 sowie von den möglichen Korezeptoren TLR1 und TLR6 für die Wirtszellantwort auf intakte Bakterien am Beispiel der Pneumokokken charakterisieren.

### 3.2 *Streptococcus pneumoniae* aktiviert TLR1/2-, Rac1- und NF- $\kappa$ B-abhängig eine IL-8 Produktion in Lungenepithelzellen.

Schmeck B, Huber S, Moog K, Zahlten J, Hocke AC, **Opitz B**, Hammerschmidt S, Mitchell TJ, Kracht M, Rosseau S, Suttorp N, Hippenstiel S. Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Amer J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290:L730-L737.

*Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger von ambulant erworbenen Pneumonien. Respiratorische Epithelzellen gehören zu den ersten Zellen, welche mit eindringenden Pneumokokken in Kontakt kommen und spielen somit eine wichtige Rolle in der primären angeborenen Immunantwort auf eine Pneumokokkeninfektion. In dieser Studie haben wir die Bedeutung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie von Rho-GTPasen bei der Interaktion von Epithelzellen mit *S. pneumoniae* untersucht.

Wir konnten zeigen, dass *S. pneumoniae*-infizierte Bronchialepithelzellen (BEAS-2B) IL-8 produzierten. Eine spezifische Inhibition der Rho-GTPase Rac1 durch den chemischen Inhibitor Nsc23766 oder durch eine dominant-negative Rac1-Mutante führte zu einer deutlich reduzierten Chemokinsekretion. Die Rac1-Hemmung bewirkte zudem eine verminderte Rekrutierung der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65, nicht aber die Rekrutierung des AP-1-Moleküls c-Jun an den IL-8-Promotor. Die durch Pneumokokken induzierte IL-8-Sekretion bzw. NF- $\kappa$ B-Aktivierung war außerdem von dem TLR-Adaptermolekül MyD88, der Phosphatidylinositol 3 (PI3)-Kinase sowie von der Rho-GTPase cdc42 abhängig. Wir fanden eine Expressionsteigerung von TLR1 und TLR2, nicht aber von TLR4 und TLR6 in Pneumokokken-infizierten Bronchialepithelzellen. Überexpressionsexperimente zeigten eine synergistische Erkennung von *S. pneumoniae* und nachfolgende NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TLR1 und 2. TLR4, TLR6, LBP (LPS-binding protein) und CD14 schienen die Epithelzellaktivierung durch Pneumokokkeninfektion nicht zu beeinflussen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass *S. pneumoniae* durch TLR1 und TLR2 auf humanen Epithelzellen erkannt wird und eine Phosphatidylinositol 3-Kinase- sowie Rho-GTPasen-abhängige Rekrutierung von NF- $\kappa$ B an den IL-8-Promotor stimuliert.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TLR2 zusammen mit TLR1 eine Erkennung von Pneumokokken vermitteln kann, sollte im Folgenden die Bedeutung der intrazellulären Rezeptormoleküle NOD1 und NOD2 für die Wirtszellantwort auf Pneumokokken untersucht werden.

### 3.3 Erkennung von internalisierten Pneumokokken durch NOD2

**Opitz B**, Püschel A, Schmeck B, Hocke AC, Rosseau S, Hammerschmidt S, Schumann RR, Suttorp N, Hippenstiel S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem*. 2004;279:36426-32.

*Streptococcus pneumoniae* ist der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (community-acquired pneumonia) sowie ein häufiger Erreger von bakteriellen Meningitiden. Die Gram-positiven Pneumokokken replizieren extrazellulär, sind aber in der Lage transient z.B. Epithel- und Endothelzellen zu invadieren. Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen hoch konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster von Mikroorganismen einschließlich der Pneumokokken. Zusätzlich zu den relativ gut untersuchten transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLRs) wurden kürzlich neuartige mustererkennende Rezeptoren, die zytosolisch lokalisierten Moleküle „nucleotide-binding oligomerization domain 1“ (NOD1)/CARD4 und NOD2/CARD15 als Rezeptoren für bakterielles Zellwandpeptidoglykan identifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, dass NOD-Proteine an der Erkennung von intrazellulären Pneumokokken beteiligt sind.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass *S. pneumoniae* HEK293-Zellen invadierte. In Überexpressionsexperimenten vermittelte NOD2 eine durch *S. pneumoniae* stimulierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Im Gegensatz zur Infektion mit lebenden Pneumokokken, führte eine Behandlung der Wirtszellen mit inaktivierten Bakterien nur dann zu einer NOD2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung, wenn die inaktivierten Pneumokokken in die Zellen eingebracht wurden. Überexpressionsversuche mit dominant-negativen Mutanten und RNA-Interferenz-Experimente zeigten, dass IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase) an der NOD2-abhängigen Signalkaskade beteiligt war. Darüber hinaus hemmten auch dominant-negative Mutanten von Rip-2 (receptor-interacting protein 2), IRAK2, TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6), NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase), TAB2 (transforming growth factor-beta-activated kinase-binding protein 2) und TAK1 (transforming growth factor-beta-activated kinase 1) die NOD2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Eine *S. pneumoniae*-Infektion führte sowohl im C57BL/6-Mauslungengewebe *in vivo* sowie in BEAS-2B-Bronchialepithelzellen *in vitro* zu einer NOD1- und NOD2-Expressionssteigerung.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von NOD2 an der Erkennung von *S. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem hin. An der durch NOD2 vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung bei Pneumokokken-Infektionen sind Rip2 sowie Moleküle der TLR-Signalkaskade beteiligt.

Die vorangegangenen Studien konnten zeigen, dass intakte Bakterien sowohl durch TLR2 als auch durch NOD2 erkannt werden können und dass Rac1 eine wichtige Bedeutung für die TLR2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung hat. In der folgenden Arbeit sollte untersucht werden, in wie weit Rac1 auch eine Rolle für die Regulation der NOD2-aktivierten Signaltransduktion spielt.

### 3.4 $\beta$ -PIX und Rac1 vermitteln eine Membranrekrutierung und eine Negativregulation von NOD2

Eitel J, Krüll M, Hocke AC, N'Guessan PD, Zahlten J, Schmeck B, Slevogt H, Hippenstiel S, Suttorp N, **O-pitz B**.  $\beta$ -PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol.* 2008;181:2664-71.

Das NOD-like Rezeptormolekül NOD2 fungiert als ein zytosolischer mustererkennender Rezeptor für das Peptidoglykanfragment Muramyldipeptid (MDP), während der transmembranäre Toll-like Rezeptor (TLR)-2 bakterielle Lipopeptide an der Wirtszelloberfläche erkennt. RhoA-GTPasen sind an vielfältigen zellulären Prozessen einschließlich der TLR2-Signalkaskade beteiligt.

In dieser Studie fanden wir eine Aktivierung der RhoA-GTPase Rac1 nach NOD2-Stimulation durch MDP in THP-1-Zellen und primären humanen Monozyten. Eine Rac1-Hemmung durch spezifische chemische Inhibitoren oder durch siRNA, und eine Beeinträchtigung des Aktinzytoskeletts führten zu einer verstärkten MDP-stimulierten IL-8-Produktion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung, während die TLR2-abhängige Zellaktivierung durch Rac1-Inhibition gehemmt wurde.  $\beta$ -PIX schien an der negativen Regulation von NOD2 beteiligt zu sein. So bewirkte spezifische  $\beta$ -PIX-siRNA auch eine Verstärkung der NOD2-vermittelten, nicht aber der TLR2-abhängigen, IL-8-Produktion. Darüber hinaus zeigten Koimmunpräzipitationsexperimente eine Interaktion von NOD2 mit  $\beta$ -PIX und Rac1 nach MDP-Stimulation. Die Inhibition von  $\beta$ -PIX oder Rac1 führte zu einer verminderten Membranrekrutierung von NOD2 und hemmte die Interaktion von NOD2 mit seinem an der Membran lokalisierten negativen Regulator Erbin.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse darauf hin, dass  $\beta$ -PIX und Rac1 die Lokalisation von NOD2 in der Wirtszelle beeinflussen und dadurch NOD2 negativ regulieren. Die negativ regulierende Funktion von Rac1 im NOD2-Signalweg steht im Gegensatz zu der positiv regulierenden Funktion von Rac1 im TLR2-Signalweg.

Nachdem die Funktion und Signalkaskade von NOD2 weiterführend untersucht wurde, sollte im Folgenden die Bedeutung von NOD1 für Wirtszellantwort von Epithelzellen und Endothelzellen auf verschiedene bakterielle Infektion untersucht werden. Hierfür wurden Infektionsmodelle mit den hauptsächlich (aber nicht ausschliesslich) extrazellulär vorkommenden Moraxellen sowie mit den fakultativ intrazellulären Bakterien *C. pneumophila* und *L. monozytogenes* verwendet.



### 3.5 *Moraxella catarrhalis* wird in Lungenepithelzellen über einen “trigger-like” Mechanismus internalisiert und aktiviert eine TLR2- und zum Teil NOD1-abhängige angeborene Immunantwort

Slevogt H, Seybold J, Tiwari KN, Hocke A, Jonat C, Dietel S, Hippenstiel S, Singer BB, Bachmann S, Suttorp N, **Opitz B**. *Moraxella catarrhalis* is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol.* 2007;9:694-707.

*Moraxella catarrhalis* ist ein Hauptverursacher von bakteriellen Exazerbationen bei Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD). *M. catarrhalis* wird als ein extrazelluläres Bakterium kategorisiert. Ob eine potentielle Invasion von respiratorischen Epithelzellen durch die Moraxellen erfolgt, wurde bisher nicht untersucht.

In Elektronen- und Konfokalmikroskopieaufnahmen konnten wir eine Invasion von *M. catarrhalis* in Bronchialepithelzellen (BEAS-2B), Typ II-Alveolarepithelzellen (A549) und primären Epithelzellen der kleinen Atemwege (SAEC) zeigen. Die Invasion der Moraxellen war abhängig von zellulärem Mikrofilament sowie von der bakteriellen Vitalität. Sie war durch die Formierung von Lamellipodia und durch den Einschluss der Bakterien in Makropinosomen gekennzeichnet. Diese Charakteristika sind typisch für einen sogenannten “trigger-like“-Mechanismus der Invasion von Bakterien in Wirtszellen. Darüber hinaus fanden wir eine Expression von TLR2 sowie von NOD1 in den untersuchten Lungenepithelzellen. Eine Hemmung der TLR2- und der NOD1-Expression durch spezifische siRNA führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8-Produktion in den durch *M. catarrhalis* infizierten Alveolarepithelzellen. Überexpressionsexperimente in HEK293-Zellen bestätigten die Bedeutung von TLR2 und NOD1 für die Erkennung von *M. catarrhalis*.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Invasion von *M. catarrhalis* in Lungenepithelzellen zu einer Kolonisierung und Infektion des Respirationstraktes beitragen könnte. Respiratorischen Epithelzellen können mit Hilfe von transmembranärem TLR2 sowie von intrazellulärem NOD1 eine Moraxellen-Infektion erkennen.

### 3.6 NOD1 vermittelt eine Endothelzellaktivierung durch *Chlamydomphila pneumoniae*

**Opitz B**, Förster S, Hocke AC, Maass M, Schmeck B, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüll M. NOD1 mediated endothelial cell activation by *C. pneumoniae*. *Circ. Res.* 2005;96:319-26.

Seroepidemiologische und tierexperimentelle Studien sowie der Nachweis von vitalen Bakterien in atherosklerotische Plaques unterstützen die Hypothese, dass Infektionen mit *Chlamydomphila pneumoniae* zur Pathogenese der Atherosklerose und der koronaren Herzkrankheit beitragen. Eindringende Pathogene, einschließlich von Chlamydien, werden durch den Wirt erkannt und lösen eine angeborene Immunantwort aus. In dieser Studie wurde die Rolle der kürzlich identifizierten zytosolisch lokalisierten NOD-like Rezeptoren (NLR) in der Erkennung der obligat intrazellulären *C. pneumophila* durch Endothelzellen untersucht.

Unsere Beobachtung, dass vitale, nicht aber hitzeinaktivierte Chlamydien Endothelzellen aktivierten, deutete auf eine Erkennung von invadierten nicht aber von extrazellulären *C. pneumophila* durch die Endothelzellen hin. Endothelzellen exprimierten das NLR-Molekül NOD1. Die Hemmung der NOD1-Expression mittels RNA-Interferenz reduzierte die IL-8-Produktion in den mit *C. pneumoniae* infizierten Endothelzellen. In HEK293-Zellen führte die Überexpression von NOD1 oder NOD2 zu einer verstärkten *C. pneumoniae*-stimulierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Hitzeinaktivierte Chlamydien aktivierten nur dann NOD1- oder NOD2-abhängig NF- $\kappa$ B, wenn sie in die Wirtszellen eingebracht wurden, nicht aber wenn sie extrazellulär zu den HEK293-Zellen gegeben wurden. Im Gegensatz dazu reagierten TLR2-transfizierte HEK293-Zellen auch auf extrazelluläre hitzeinaktivierte Chlamydien.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass NOD1 und NOD2 grundsätzlich eine angeborene Immunantwort auf eine Chlamydieninfektion vermitteln können. In Endothelzellen scheint NOD1 eine dominante Bedeutung für die Erkennung von *C. pneumophila* zu haben.

### 3.7 Die Bedeutung von NOD1 und p38 MAPK für die IL-8-Produktion in *Listeria monocytogenes*-infizierten Endothelzellen

**Opitz B**, Püschel A, Beermann W, Hocke AC, Förster S, Schmeck B, van Laak V, Chakraborty T, Suttrop N, Hippenstiel S. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a NOD1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol.* 2006;176:484-90.

Die NOD-like Rezeptormoleküle NOD1 und NOD2 fungieren als intrazelluläre mustererkennende Rezeptoren zur Erkennung von bakteriellen Peptidoglykanfragmenten. Um die Bedeutung von NOD1 und NOD2 für die intrazelluläre Erkennung von lebenden Bakterien weiter zu untersuchen, verwendeten wir *Listeria monocytogenes* als ein Modellorganismus für Studien der (angeborenen) Immunantwort auf intrazelluläre Bakterien. Während Wildtyp-*L. monocytogenes* im Wirtszytosol replizieren, verbleiben nicht-pathogene *L. innocua* oder Internalin B- oder Listeriolysin O-defiziente *L. monocytogenes*-Mutanten extrazellulär bzw. bleiben im Phagoendosomen der Wirtszelle gefangen.

Wir fanden, dass eine Infektion mit Wildtype-*L. monocytogenes*, nicht aber mit Listeriolysin O- oder Internalin B-negativen *L. monocytogenes*-Mutanten oder mit *L. innocua* eine IL-8-Produktion in HUVEC-Endothelzellen hervorrief. RNA-Interferenz- und NOD1-Überexpressionsexperimente zeigten, dass NOD1 die *L. monocytogenes*-induzierte IL-8-Sekretion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermittelte. NOD1-siRNA hemmte zudem die *L. monocytogenes*-vermittelte Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs in den Endothelzellen, und NOD1-Überexpression verstärkte die Listerien-induzierte p38-Aktivierung. Außerdem fanden wir, dass eine Inhibition von p38 die Listerien-stimulierte IL-8-Produktion hemmte.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass *L. monocytogenes* NOD1-abhängig p38 MAPK sowie NF- $\kappa$ B aktiviert und nachfolgend die IL-8-Produktion in Endothelzellen reguliert. NOD1 scheint somit eine wichtige Bedeutung für die angeborene Immunantwort der Endothelzellen auf eine Infektion mit intrazellulären Bakterien zu besitzen.

Nachdem die Bedeutung der intrazellulären NLRs für die Epithelzell- bzw. Endothelzell-Bakterien-Interaktion aufgezeigt werden konnte, sollte die folgende Studie die Rolle der intrazellulären RLRs für die Wirtszellantwort von Lungenepithelzellen auf eine Influenza A-Virusinfektion untersuchen.

### 3.8 Die IFN $\beta$ -Produktion von Influenza A-Virus-infizierten Lungenepithelzellen ist abhängig von RIG-I sowie dem viralen NS1-Protein

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

Influenza A-Viren sind Erreger von sich epidemisch bzw. pandemisch ausbreitenden, respiratorischen Infektionen, die zum Teil von hoher Mortalität gekennzeichnet sind. Eines der Hauptvirulenzfaktoren von Influenza A-Viren ist das „non-structural protein 1“ (NS1), mit dem die Viren die Wirts-IFN-Antwort unterdrücken. Respiratorische Epithelzellen sind die primären Zielzellen von Influenza-Viren. Der mustererkennende Rezeptor, welcher die Viren in diesen Zellen erkennt und die IFN-Antwort vermittelt, wurde bisher nicht genau charakterisiert. Die zytosolisch lokalisierten RIG-like Rezeptormoleküle RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) und MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5) stellten Kandidaten für den Influenza A-Virus-erkennenden Rezeptor in Lungenepithelzellen dar.

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass eine Infektion mit NS1-defizienten Viren, nicht aber mit Wildtyp-Viren eine IFN $\beta$ -Produktion in Lungenepithelzellen bewirkte, und dass eine Infektion mit NS1-defizienten Viren zu einer Expressionssteigerung von RIG-I und MDA5 in den Lungenepithelzellen führte. In RNA-Interferenz- und Überexpressionsexperimenten fanden wir, dass RIG-I, das Adaptermolekül IPS-1 (IFN $\beta$  promoter stimulator 1) und der Transkriptionsfaktor IRF3 (interferon-regulated factor 3) die Influenza A-Virus-induzierte IFN $\beta$ -Produktion vermittelten. NS1-Überexpressionsexperimente wiesen zudem auf eine Hemmung des RIG-I-Signalwegs durch das virale NS1-Protein hin.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, die wichtige Bedeutung die RIG-I, IPS-1 und IRF3 für die angeborene Immunantwort der Lungenepithelzellen auf eine Influenza A-Virusinfektion haben.

Die große Bedeutung der Typ I IFNs für Virusinfektion ist vor mehr als 50 Jahren erkannt worden. Demgegenüber ist die Rolle dieser Zytokine für bakterielle Infektionen bisher weitestgehend unverstanden. Die folgenden zwei Studien haben die Bedeutung der Typ I IFNs für bakterielle Infektion am Beispiel der Legionelleninfektion sowie den Mechanismus der IFN $\beta$ -Induktion in diesen Wirtszellen untersucht.

### 3.9 Die Bedeutung von IPS-1, IRF3 und IFN $\beta$ für die Infektion von Lungenepithelzellen mit *Legionella pneumophila*

**Opitz B**, Vinzing M, van Laak V, Schmeck B, Heine G, Gunther S, Preissner R, Slevogt H, N'Guessan PD, Eitel J, Goldmann T, Flieger A, Suttorp N, Hippenstiel S. *Legionella pneumophila* induced IFN $\beta$  in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3 which also control bacterial replication. *J Biol Chem*. 2006;281:36173-9.

*Legionella pneumophila* ist ein Gram-negatives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, welches schwere Pneumonien im Menschen (Legionnaires Krankheit) verursacht. Typ I IFNs wurden bisher mit der antiviralen Immunität in Verbindung gebracht. Aktuelle Studien deuten zudem auf eine Bedeutung dieser Zytokine für die Immunantwort auf (intrazelluläre) Bakterien hin.

Unsere Ergebnisse zeigen eine IFN $\beta$ -Expression in Lungenepithelzellen, welche mit Wildtyp-*L. pneumophila* oder Flagellin-defizienten Legionellen infiziert waren. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit *L. pneumophila*, denen ein funktioneller Typ IV-Sekretionsapparat (Dot/Icm) fehlte oder die Stimulation mit hitzeinaktivierten Legionellen zu keiner IFN $\beta$ -Expression in human Lungenepithelzellen. Die Wildtyp-*L. pneumophila*-Infektion aktivierte eine Kerntranslokation der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- $\kappa$ B-p65 und eine Bindung dieser Faktoren an den endogenen IFN $\beta$ -Promotor. RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente zeigten, dass IRF3 sowie das CARD-Domänen-enthaltende Adaptermolekül IPS-1 (interferon-beta promoter stimulator 1) die *L. pneumophila*-induzierte IFN $\beta$ -Expression vermittelten. Im Gegensatz dazu schienen die CARD-exprimierenden Moleküle RIG-I (retinoic acid-inducible protein I), MDA5 (melanoma differentiation-associated gene 5), NOD27 (nucleotide-binding oligomerization domain protein 27), und ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) nicht an der Legionellen-aktivierten IFN $\beta$ -Expression beteiligt zu sein. In unseren Experimenten beobachteten wir zudem eine verstärkte Replikation von *L. pneumophila* in humanen Lungenepithelzellen, wenn die IPS-1- oder IRF3-Expressionen mittels siRNA gehemmt wurden. Diese verminderte „Resistenz“ von IPS-1- und IRF3-„knockdown“-Zellen gegenüber Legionellen ließ sich durch die Behandlung der Epithelzellen mit rekombinanten IFN $\beta$  rückgängig machen.

Zusammengefasst wird *L. pneumophila* in Lungenepithelzellen über einen noch zu identifizierenden, putativ zytosolischen PRR erkannt, welcher über IPS-1 und IRF3 die IFN $\beta$ -Expression induziert. Die Ergebnisse deuten ferner an, dass dieser Signalweg und das nachfolgend endogen produzierte IFN die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen in den untersuchten Lungenepithelzellen –im Sinne eines angeborenen intrazellulären Abwehrmechanismus- negativ kontrollieren.

### 3.10 Intrazelluläre Bakterien und zytosolische DNA aktivieren IFN $\beta$ -Antworten in humanen Wirtszellen ohne Beteiligung von ZBP1 (DLM-1/DAI)

Lippmann J, Rothenburg S, Deigendesch N, Eitel J, Meixenberger K, van Laak V, Slevogt H, N'Guessan PD, Hippenstiel S, Chakraborty T, Flieger A, Suttorp N, **Opitz B**. Intracellular bacteria or cytosolic DNA activate IFN $\beta$  responses in human cells without requiring ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol.* 2008;10:2579-88.

Das angeborene Immunsystem erkennt Mikroorganismen mit Hilfe von mustererkennenden Rezeptoren (PRR) einschließlich der Toll-like Rezeptoren (TLRs), NOD-like Rezeptoren (NLRs) und RIG-like Rezeptoren (RLRs). Ein Schlüsselprozess der angeborenen Immunantwort, welcher nur durch einige TLRs sowie durch die RLRs aktiviert werden kann, ist die Induktion einer Typ I IFN (IFN $\alpha/\beta$ )-Produktion. Darüber hinaus aktivieren intrazelluläre Bakterien sowie eine zytosolische Stimulation mit DNA die Produktion von Typ I IFNs unabhängig von den TLRs, (den meisten) NLRs sowie den RLRs. Eine kürzlich publizierte Studie legte nahe, dass ZBP1/DAI den lang gesuchten zytosolischen PRR repräsentiert, welcher eine IFN $\alpha/\beta$ -Expression auf eine zytosolische DNA-Stimulation (und möglicherweise auf intrazelluläre Bakterien) hin in Mauszellen vermittelt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Infektionen mit *Legionella pneumophila* sowie eine intrazelluläre Stimulation mit synthetischer poly(dA-dT)-DNA, nicht aber mit poly(dG-dC)-DNA, eine Expression von IFN $\beta$ , von „full-length“ ZBP1 und der Haupt-Splicevariante ohne der ersten Z $\alpha$ -Domäne (ZBP1 $\Delta$ Z $\alpha$ ) induzieren. Eine Überexpression von ZBP1 oder von ZBP1 $\Delta$ Z $\alpha$  hatte nur einen schwach verstärkenden Effekt auf die poly(dA-dT)-stimulierte IFN $\beta$ -Reportergenaktivierung in HEK293-Zellen. Die ektope Expression von ZBP1 oder ZBP1 $\Delta$ Z $\alpha$  hatte keinen Einfluss auf die *L. pneumophila*- oder poly(dA-dT)-stimulierte IFN $\beta$ -Produktion in A549-Zellen. Eine Transfektion mit ZBP1-siRNA schwächte die verzögerte IFN $\beta$ -Induktion nach poly(dA-dT)-Stimulation in Maus-L929-Fibroblasten ab. Demgegenüber hatten verschiedene siRNAs, welche differenziell die Expression der beiden humanen Haupt-ZBP1-Varianten inhibierten, keinen Einfluss auf die durch poly(dA-dT)-Stimulation oder Bakterieninfektion induzierten IFN $\beta$ -Expressionen in verschiedenen humanen Wirtszellen. Im Gegensatz dazu supprimierte eine IRF3-siRNA die durch Bakterien oder DNA aktivierte IFN $\beta$ -Expression.

Zusammengefasst ergaben unsere Ergebnisse, dass intrazelluläre Bakterien bzw. zytosolische DNA eine IFN $\beta$ -Expression in humanen Wirtszellen ohne essentielle Beteiligung von ZBP1 aktivieren.



Die vorangegangenen Studien deuten darauf hin, dass endogen produziertes IFN $\beta$  einen zellautonomen angeborenen Resistenzmechanismus der Wirtszellen gegen eine Legionelleninfektion vermitteln kann. In der nachfolgenden Studie wurde ein zweiter zellautonomer Abwehrmechanismus der Wirtszelle untersucht.

### 3.11 Die Bedeutung von NAIP und Ipaf für die Legionellen-Infektion von humanen Wirtszellen

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

Bei Mäusen entscheiden verschiedene Allele des *NAIP5/Birc1e*-Gens über Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber einer Infektion mit *L. pneumophila*. mNAIP5 gehört zur NOD-like Rezeptor (NLR)-Familie. Funktionelles mNAIP5 erkennt alleine oder zusammen mit dem weiteren NLR-Molekül mIpaf das Legionellen-Flagellin. In der Folge wird eine Resistenz gegenüber Legionellen in Makrophagen und - davon abhängig – im Mausgesamtorganismus vermittelt. Im Gegensatz zu Zellen der meisten Mausstämme unterstützen humane Makrophagen und Lungenepithelzellen eine Replikation von *L. pneumophila*. Zudem können Menschen schwere Pneumonien (Legionnaires Krankheit) nach Legionellen-Infektion entwickeln. Die Bedeutung von humanen Orthologen zu mNAIP5/mBirc1e und mIpaf für die *L. pneumophila*-Infektion wurde bisher nicht untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigen eine verstärkte Replikation von Flagellin-defizienten Legionellen in THP-1-Zellen, primären Makrophagen blutmonozytären Ursprungs, primären Alveolarmakrophagen und A549-Lungenepithelzellen im Vergleich zu Wildtyp-*L. pneumophila*. Während das mNAIP5-Ortholog hNAIP sowohl in den untersuchten Makrophagen als auch in den Epithelzellen exprimiert wurde, war hIpaf nur in den Makrophagen nachzuweisen. Wildtyp-Legionellen vermehrten sich verstärkt in den verschiedenen Makrophagen, in denen die hNAIP- oder hIpaf-Expression mittels siRNA gehemmt wurde bzw. in den hNAIP-„knockdown“-Lungenepithelzellen im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen. Demgegenüber führte die Überexpression von hNAIP oder hIpaf zu einer verminderten Bakterienreplikation. Im Gegensatz zu der Wachstumsbeeinflussung von Wildtyp-*L. pneumophila* hatte die Expressionshemmung von hNAIP oder hIpaf nur wenig Einfluß auf die (verstärkte) Vermehrung der Flagellin-defizienten Legionellen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass hNAIP und hIpaf eine angeborene intrazelluläre Abwehr gegenüber begeißelten Legionellen in humanen Wirtszellen vermitteln können.

## 4 Diskussion

Die im Ergebnisteil aufgeführten Arbeiten geben Hinweise auf die wichtige Bedeutung von transmembranären und intrazellulären „pattern recognition receptors“ (PRRs) für die angeborene Immunantwort von unterschiedlichen Wirtszellen, wie z.B. Lungenepithelzellen, Endothelzellen oder Makrophagen, auf verschiedene Bakterien- und Virusinfektionen. So konnte gezeigt werden, dass die vorrangig (aber nicht ausschließlich) extrazellulären Bakterien *S. pneumoniae* und *M. catarrhalis* sowie die bakteriellen Zellwandbestandteile LTA und Glykolipide durch transmembranäres TLR2 (z.T. in Kooperation mit TLR1) erkannt werden (Opitz *et al.*, 2001; Schmeck *et al.*, 2006; Slevogt *et al.*, 2007). Daneben fanden wir erstmalig eine Invasion von *M. catarrhalis* in Lungenepithelzellen, welche Charakteristika des „trigger-like“-Invasionsmechanismus aufwies (Slevogt *et al.*, 2007). Intrazelluläre Moraxellen und Pneumokokken, welche ebenfalls Lungenepithelzellen invadieren können, werden von den intrazellulären PRRs NOD2 bzw. NOD1 detektiert (Opitz *et al.*, 2004; Slevogt *et al.*, 2007). Klassisch intrazelluläre Mikroorganismen, wie *C. pneumophila*, *L. monocytogenes*, *L. pneumophila* sowie Influenza A-Viren, werden vorrangig von den intrazellulären PRRs NOD1, NAIP, Ipaf, einem noch unbekanntem IFN-induzierenden PRR bzw. von RIG-I erkannt, während ZBP1 keine essentielle Bedeutung für die Wirtszellantwort auf Legionellen, Listerien oder zytosolische DNA zu haben scheint (Lippmann *et al.*, 2008; Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006b; Opitz *et al.*, 2006a; Opitz *et al.*, 2007b; Vinzing *et al.*, 2008).

Nach der Ligandenerkennung aktivieren die unterschiedlichen PRRs charakteristische Signalkaskaden. Während viele TLRs, einschließlich von TLR2, abhängig vom Adaptermolekül MyD88 den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B aktivieren (Opitz *et al.*, 2001; Schmeck *et al.*, 2006), wird die NOD1- und NOD2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung über die Adapterkinase Rip2 vermittelt. Darüber hinaus scheinen z.B. die Signalmoleküle IRAK und TAK1 sowohl an der TLR- als auch an der NOD2-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt zu sein (Opitz *et al.*, 2004). Demgegenüber werden die TLR(2)- und die NOD2-Signalkaskaden durch Rac1 gegenläufig beeinflusst. So konnten wir zeigen, dass Rac1 und die PI3-Kinase die TLR2-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung positiv regulieren (Schmeck *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu bewirkt Rac1 zusammen mit  $\beta$ -PIX eine negative Feinabstimmung der NOD2-Signaltransduktion über die Regulation der NOD2-Membranrekrutierung und der Interaktion von NOD2 mit seinem negativen Regulator Erbin (Eitel *et al.*, 2008). Genauso wie die TLRs ist NOD1 (und NOD2) in der Lage, MAPKs, wie z.B. die p38 MAPK, zu aktivieren (Opitz *et al.*, 2006a). Die alleinige Stimulation von NOD1 oder NOD2 führt aber, im Gegensatz zur Stimulation einiger TLRs und der RLRs, nicht zu einer IRF3-Aktivierung und zu einer nachfolgenden Typ I IFN-Expression (Opitz *et al.*, 2006a). Die RIG-I-abhängige Aktivierung einer IRF3-abhängigen IFN $\beta$ -Expression in Influenza A-Virus-infizierten Lungenepithelzellen ist abhängig von dem RIG-I/MDA5-Adaptermolekül IPS-1 (Opitz *et al.*, 2007b). Unsere Ergebnisse einer von IPS-1 und IRF3 abhängigen aber z.B. von RIG-I, MDA5, und ZBP1 unabhängigen IFN $\beta$ -Induktion in Legionellen-infizierten Lungenepithelzellen zusammen mit publizierten Studien (siehe unten) deuten zudem auf die Existenz eines neuartigen, zytosolischen, IFN $\beta$ -induzierenden, Legionellen-erkennenden PRR hin (Opitz *et al.*, 2006b).

Die verschiedenen PRRs aktivieren, z.T. abhängig von den erwähnten Signalkaskaden, verschiedenartige Prozesse. So wird (1.) eine Transkription von NF- $\kappa$ B-abhängigen inflammatorischen Mediatoren (wie z.B. IL-8) durch die TLRs, NOD1/2 sowie die RLRs aktiviert (Opitz *et al.*, 2001; Opitz *et al.*, 2004; Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006a; Opitz *et al.*, 2007b; Schmeck *et al.*, 2006; Slevogt *et al.*, 2007), (2.) die Transkription von IRF3-abhängigen

Typ I IFNs und die nachfolgende Induktion von IFN-stimulierten Genen durch die RLRs, durch einige TLRs, sowie durch den putativ zytosolischen, Legionellen-erkennenden PRRs gesteuert (Lippmann *et al.*, 2008; Opitz *et al.*, 2006b; Opitz *et al.*, 2007b) sowie (3.) angeborene intrazelluläre Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Mikroorganismen (wie z.B. Legionellen) durch NAIP, Ipaf bzw. durch den zytosolischen, Legionellen-erkennenden, IFN-induzierenden PRR aktiviert (Opitz *et al.*, 2006b; Vinzing *et al.*, 2008).

Bedenkt man die große Bedeutung dieser durch die PRRs regulierten zellulären Prozesse für die angeborene (und erworbene) Abwehr, so ist es nicht verwunderlich, dass verschiedene Pathogene Mechanismen besitzen, mit deren Hilfe sie der Erkennung durch die PRRs entgehen oder die durch die PRRs regulierten Signalkaskaden/Prozesse hemmen können. Ein Beispiel hierfür ist die Hemmung der RIG-I-abhängigen IFN $\beta$ -Produktion durch das NS1-Protein der Influenza A-Viren (Opitz *et al.*, 2007b). Im Folgenden sollen einzelne Aspekte und „offene Fragen“ der Pathogen-Erkennung durch die PRRs und davon regulierten Prozesse eingehender diskutiert werden.

#### **4.1 Die Bedeutung extrazellulärer und intrazelluläre PRRs in verschiedenen Wirtszellen für die inflammatorische Genregulation und die Initiierung einer Immunantwort**

Die genauen Expressionsmuster vieler PRRs in verschiedenen Körperzellen und die davon abhängende (differenzielle) Funktion unterschiedlicher Körperzellen bei Infektionen ist bisher, insbesondere *in vivo*, nur wenig untersucht. Grundsätzlich kann man jedoch davon ausgehen, dass unterschiedliche Zellen unterschiedliche PRRs in verschiedenen Mengen exprimieren und damit z.T. differenziert auf die Interaktion/Infektion mit Mikroorganismen reagieren können. So zeigen z.B. humane Monozyten und Makrophagen eine starke Expression von TLRs (z.B. TLR1, -2, -4, -5, -8) auf ihrer Zelloberfläche bzw. in den Endosomen (McCoy and O'Neill, 2008) sowie von verschiedenen NLRs (z.B. NOD1, NOD2, NAIP und Ipaf) (Inohara *et al.*, 1999; Ogura *et al.*, 2001b; Vinzing *et al.*, 2008) im Zytosol. Diese Zellen können somit sowohl auf extrazelluläre als auch auf intrazelluläre Mikroorganismen reagieren. Demgegenüber ist beschrieben, dass Darmepithelzellen, welche ständig einer Vielzahl von kommensalen Bakterien ausgesetzt sind, kaum TLRs auf ihrer apikalen Zelloberfläche exprimieren (Sansonetti, 2004). Diese Zellen reagieren auf extrazelluläre (kommensale) Bakterien nicht mit einer inflammatorischen Antwort, wohingegen invasive (pathogene) Bakterien u.a. durch NLRs erkannt werden. Die intrazelluläre Erkennung invasiver Bakterien oder bakterieller Produkte bewirkt nachfolgend eine transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation inflammatorische Gene in diesen und anderen Zellen der Mukosa.

Die Lunge hat, wie der Darm, eine große, mit Epithelzellen ausgekleidete Oberfläche zur äußeren Umwelt. Im Gegensatz zum Darm enthalten die unteren Luftwege normalerweise aber keine oder kaum Mikroorganismen. Ebenfalls im Unterschied zu Darmepithelzellen exprimieren verschiedene Lungenepithelzellen neben den NLRs (z.B. NOD1, NOD2, NAIP) und den RLRs (RIG-I und MDA5) auch viele funktionelle TLRs (z.B. TLR1, -2, -3, -6, -9) (Opitz *et al.*, 2007c). In ähnlicher Weise kommen auch Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen kaum mit Mikroorganismen in Kontakt und exprimieren ebenfalls sowohl TLRs als auch NLRs und RLRs (Opitz *et al.*, 2007a). Während insgesamt die (angeborene) Immunantwort im Darm und die Bedeutung der Darmmukosa hierfür schon relativ gut untersucht worden sind (auch wenn bei weitem noch nicht vollständig

verstanden), so ist die (angeborene) Immunantwort z.B. im Respirationstrakt und die Bedeutung der verschiedenen ortständigen Zellen hierfür noch weit weniger gut charakterisiert. Es erscheint fraglich, ob das Konzept, dass eine Infektion im Darmepithel im Wesentlichen durch die NLRs erkannt wird, auch z.B. für das Lungeneithel oder das Endothel angewandt werden kann.

Bedenkt man, (1.) dass Lungeneithelzellen, Alveolarmakrophagen oder Endothelzellen TLRs und NLRs exprimieren, (2.) dass extrazelluläre Bakterien u.a. über Toxine (z.B. das Pneumolysin von *S. pneumoniae*) oder Sekretionsapparate (z.B. das Typ III-Sekretionssystem von *Pseudomonas aeruginosa*) verfügen, deren Existenz bzw. deren Substrate potentiell durch NLRs erkannt werden können (Shoma *et al.*, 2008; Travassos *et al.*, 2005), dass (3.) intrazelluläre Bakterien z.T. auch extrazellulär vorkommen, (4.) dass NOD1/NOD2 synergistisch mit den TLRs NF- $\kappa$ B-abhängige Gene induzieren können (Fritz *et al.*, 2005; van Heel *et al.*, 2005) und (5.) dass z.B. die Produktion von reifem IL-1 $\beta$  sowohl TLR- als auch NLR-Signale erforderlich macht (Fritz *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2002), so erscheint ein Modell, in dem TLRs und NLRs oftmals gemeinsam Infektionen der Lunge oder des Endothels erkennen, am ehesten wahrscheinlich. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigen die hier dargestellten Arbeiten, dass z.B. *S. pneumoniae* und *M. catarrhalis* sowohl durch NLRs als auch durch TLRs in Epithelzellen erkannt werden (Opitz *et al.*, 2004; Schmeck *et al.*, 2006; Slevogt *et al.*, 2007). Andererseits scheinen Endothelzellen, welche wenig TLR2 exprimieren, v.a. NLR-abhängig Listerien und Chlamydien zu detektieren (Opitz *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006a), obwohl Untersuchungen zur Bedeutung von anderen endothelialen TLRs für die Erkennung von *C. pneumoniae* und *L. monocytogenes* noch ausstehen.

Grundsätzlich können also verschiedene Körperzellen, wie z.B. Makrophagen, (Lungen-)Epithelzellen oder Endothelzellen, sowohl TLR- als auch NLR-vermittelt, auf verschiedene Mikroorganismen reagieren. Hieraus ergibt sich jedoch die Frage, welche Bedeutung insbesondere den nicht-hämatopoetischen Zellen (Epithel-, Endothelzellen) für die Initiierung einer erfolgreichen angeborenen und erworbenen Immunantwort *in vivo* zukommt. Interessant in diesem Zusammenhang sind u.a. *in vivo*-Studien, in denen NF- $\kappa$ B im Bronchialepithel in der Maus durch adenovirale Überexpression aktiviert oder durch dominant-negatives NF- $\kappa$ B gehemmt wurde. Die Autoren dieser Studie beobachteten eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, welche von der Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs im Lungeneithel abhängig war (Sadikot *et al.*, 2006). Es wurde ferner gezeigt, dass die Immunabwehr gegen *P. aeruginosa*, einschließlich der bakteriellen Eradikation, von der NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Lungeneithel abhing (Sadikot *et al.*, 2003).

Bedenkt man die TLR- und NOD1/NOD2-abhängige Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Lungeneithelzellen (Opitz *et al.*, 2007c; Opitz *et al.*, 2004; Schmeck *et al.*, 2006; Slevogt *et al.*, 2007), ergibt sich daraus die große Bedeutung dieser PRRs für die Immunabwehr respiratorischer Infektionen. Kürzlich konnte beispielsweise in einem Koinfektionsmodell gezeigt werden, dass die NOD1-abhängige Erkennung von *H. influenzae* eine Neutrophilen- und Komplement-abhängige Eradikation einer *S. pneumoniae*-Besiedlung der respiratorischen Mukosa bewirkte (Lysenko *et al.*, 2007).

Aktuelle Studie erbrachten darüber hinaus Hinweise auf eine Bedeutung von NOD1 und NOD2 in hämatopoetischen Antigenpräsentierenden Zellen sowie in nicht-hämatopoetischen Wirtszellen (z.B. Epithel- und Endothelzellen) für die Aktivierung und Regulation auch der adaptiven Immunantwort (Fritz *et al.*, 2007; van Beelen *et al.*, 2007). So wurde gezeigt, dass eine differentielle Stimulation von NOD1/2 und/oder der TLRs unterschiedliche T-Zellantworten (Th1, Th2, Th17) aktivieren konnte. Experimente, in denen Knochenmark von Wildtyp-Mäusen in NOD1-defiziente Mäuse transplantiert bzw. Knochenmark von NOD1-defizienten Mäusen in Wildtyp-

Mäuse transplantiert wurden, ergaben, dass NOD1 ausserhalb der hämatopoetischen Zellen eine wichtige Bedeutung für die Aktivierung der adaptiven Immunantwort hatte (Fritz *et al.*, 2007).

Im Gegensatz zur oftmals kooperativen Erkennung vieler Bakterien durch TLRs und NLRs innerhalb einer Wirtszelle und zur nachfolgenden synergistischen inflammatorischen Genexpression scheinen verschiedene Körperzellen Virusinfektionen entweder (ausschliesslich?) TLR-abhängig oder v.a. RLR-abhängig zu detektieren. So erkennen plasmazytoide DCs (pDCs) Viren/virale Einzelstrang-RNA durch endosomal lokalisierte TLR7 und TLR8, unabhängig von einer viralen Vermehrung (Diebold *et al.*, 2004;Lund *et al.*, 2004). Demgegenüber scheinen die meisten anderen Körperzellen, einschließlich von Lungenepithelzellen, Alveolarmakrophagen und konventionellen DCs (cDCs), nur dann auf eine Virusinfektion zu reagieren, wenn eine Virusvermehrung stattfindet und virale RNA durch die zytosolisch lokalisierten PRRs RIG-I oder MDA5 erkannt werden kann (Andrejeva *et al.*, 2004;Kato *et al.*, 2006;Kumagai *et al.*, 2007;Opitz *et al.*, 2007b;Yoneyama *et al.*, 2004). Die Beobachtung, dass viele Viren über Mechanismen zur Hemmung bzw. Umgehung der RLR-Signalwege in den Wirtszellen im Sinne von Pathogenitätsfaktoren verfügen (ein Beispiel hierfür ist das NS1-Protein von Influenza A-Viren), unterstreicht die große Bedeutung dieser Detektionsmechanismen für die Immunantwort auf unterschiedliche Viren (Meylan *et al.*, 2005;Opitz *et al.*, 2007b).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die pDCs die vorherrschenden Produzenten von antiviral-wirkendem IFN $\alpha$ / $\beta$  während einer Virusinfektion *in vivo* sind. Jetzt scheinen aktuelle Ergebnisse diese Sichtweise teilweise zu revidieren. Im Modell einer intranasalen Newcastle Disease-Virus-Infektion einer „knock-in-Maus“, welche GFP unter der Kontrolle eines IFN $\alpha$ -Promoters exprimiert, zeigte sich, dass nicht die Viruserkennung durch TLR7 in den pDC, sondern durch RIG-I in den Alveolarmakrophagen den größten Anteil der IFN $\alpha$ -Produktion bewirkte (Kumagai *et al.*, 2007). Darüber hinaus führte eine Depletierung der Alveolarmakrophagen zu einer verminderten initialen Viruseliminierung in der Lunge. Im Gegensatz dazu war die IFN $\alpha$ -Produktion während einer systemischen Virusinfektion sowohl abhängig von den TLRs in pDCs als auch von den RLRs in Makrophagen und cDCs (Kumagai *et al.*, 2007).

Darüber hinaus zeigte eine kürzlich veröffentlichte Studie auch die wichtige Bedeutung des Lungenepithels für die Immunantwort auf eine Virusinfektion *in vivo* (Shornick *et al.*, 2008). So zeigten transgene Mäuse mit einem Defekt im Typ I IFN-Signalweg in nicht aus Knochenmarkszellen abgeleiteten Wirtszellen (sehr wahrscheinlich Lungenepithelzellen), eine im Vergleich zu Mäusen mit Knochenmark-spezifischem knock-out erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Virusinfektion. Somit scheinen RLRs in Lungenepithelzellen und anderen nicht-klassischen Immunzellen wahrscheinlich ebenfalls eine große Bedeutung für die Abwehrmechanismen gegenüber Viren zu haben, obwohl weiterführende *in vivo*-Untersuchungen zur Unterstützung dieser Hypothese dringend notwendig erscheinen.

Zusammengefasst ergeben sich eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung von extrazellulären und intrazellulären PRRs sowohl in den klassischen Immunzellen als auch in den Epithel- und Endothelzellen an der Regulation einer inflammatorischen Genexpression und Steuerung der weiteren angeborenen und adaptiven Immunantwort.

## 4.2 Erkennung von intrazellulären Bakterien und Induktion von Typ I IFNs

IFN $\alpha$  und - $\beta$  wurden ursprünglich als humorale Faktoren identifiziert, welche einen antiviralen Status in Wirtszellen vermitteln können (Isaacs and Lindenmann, 1957). Es ist bekannt, dass die RLRs sowie einige TLRs (TLR3, -4, -7, -8, -9) eine Signalkaskade aktivieren, die in der IRF3/7-abhängigen Expression von Typ I IFNs münden kann. Im Gegensatz dazu scheinen die meisten bisher untersuchten NLRs nicht in der Lage zu sein, IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expressionen zu steuern. Eine Ausnahme stellt das neu entdeckte NLRX1-Protein da, welches RLR-abhängige IFN $\alpha$ / $\beta$ -Induktionen negativ zu regulieren scheint (Moore *et al.*, 2008). Produzierte Typ I IFNs binden (z.B. auto- oder parakrin) an den IFN $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor (IFNAR) und aktivieren über Janus-Kinasen und STAT-Transkriptionsfaktoren die Expression von sogenannten IFN-stimulierten Genen (ISGs), von denen viele antivirale (und möglicherweise auch antibakterielle) Aktivitäten besitzen (Levy and Darnell, Jr., 2002).

Zusätzlich zu ihrer Bedeutung für virale Infektionen zeigten verschiedene, kürzlich veröffentlichte Studien die wichtige Rolle der Typ I IFNs bei verschiedenen bakteriellen Infektionen (*S. pneumoniae*, *L. monozytogenes*, *M. tuberculosis*, Gruppe B Streptokokken) *in vivo* (Auerbuch *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2004; Mancuso *et al.*, 2007; O'Connell *et al.*, 2004; Stanley *et al.*, 2007). Einige Bakterien aktivieren IFN-Antworten möglicherweise über TLR4 und/oder über TLR9. Darüber hinaus erbrachten verschiedene Arbeiten der letzten Jahre eindeutige Hinweise für die Existenz von zytosolischen PRRs, die in der Lage sind, IFN $\alpha$ / $\beta$ -Expressionen in Bakterien-infizierten Zellen zu aktivieren. So zeigten u.a. Dan Portnoy und Kollegen im Jahr 2002, dass eine Infektion mit zytosolisch lokalisierten Wildtype-*L. monozytogenes*, nicht jedoch mit vakuolär oder extrazellulär verbleibenden Listerien, eine IFN $\beta$ -Wirtszellantwort hervorrief (O'Riordan *et al.*, 2002; Stockinger *et al.*, 2002). Eigene Arbeiten sowie Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten zudem, dass auch die vakuolär replizierenden Bakterien *L. pneumophila* und *M. tuberculosis* eine IFN $\beta$ -Expression aktivieren konnten (Opitz *et al.*, 2006b; Remoli *et al.*, 2002; Stanley *et al.*, 2007; Stetson and Medzhitov, 2006). Diese Aktivierung der IFN $\beta$ -Produktion war abhängig von dem Typ IV-Sekretionssystem der Legionellen (Dot/Icm) (Opitz *et al.*, 2006b; Stetson and Medzhitov, 2006) bzw. von dem alternativem Sekretionssystem ESX-1 der Mykobakterien, welche die Fähigkeit zu besitzen scheinen, bakterielle Moleküle in das Wirtszellzytosol zu translozieren (Stanley *et al.*, 2007).

Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass während einer *L. monozytogenes*-Infektion verschiedene Genexpressionsprofile aktiviert werden: eine TLR-abhängige Genexpression (252 Gene), welche durch extrazelluläre und vakuolär gefangende Listerien gesteuert wurde, sowie eine TLR-unabhängige Genexpression, die ausschließlich durch zytosolische Listerien angeregt wurde (80 Gene) (Leber *et al.*, 2008; McCaffrey *et al.*, 2004). Diese TLR-unabhängige, zytosolisch aktivierte transkriptionelle Antwort war abhängig von dem Transkriptionsfaktor IRF3 sowie zumeist von der Produktion von IFN $\beta$  und der autokrinen/parakrinen Bindung des IFN $\beta$  an den IFN $\alpha$ / $\beta$ -Rezeptor. Die überwiegende Zahl der zytosolisch aktivierten Genen waren somit ISGs. In ähnlicher Weise waren die meisten durch Mykobakterien ESX-1-abhängig induzierten Gene bekannte ISGs (Stanley *et al.*, 2007).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mikrobielle, Vertebraten- oder synthetische DNA auch eine Typ I IFN-Expression und insgesamt eine identische transkriptionelle Antwort hervorrief, wenn sie in das Wirtszellzytosol eingebracht worden war (Ishii *et al.*, 2006; Leber *et al.*, 2008; Okabe *et al.*, 2005; Stetson and Medzhitov, 2006). Dieser Befund, zusammen mit Untersuchungen an Listerien und dem Wissen, dass der Legionellen Typ

IV-Sekretionsapparat in der Lage ist, Legionellen-DNA zu translozieren (Segal *et al.*, 1998; Vogel *et al.*, 1998), führte zu der Vermutung, dass bakterielle DNA während einer bakteriellen Infektion im Wirtszellzytosol detektiert wird und Typ I IFNs induziert (Leber *et al.*, 2008; Stetson and Medzhitov, 2006).

Die durch Listerien, Mykobakterien oder zytosolische DNA hervorgerufene IFN $\beta$ -Produktion war abhängig von den Wirtszellmolekülen TBK1 und IRF3, jedoch unabhängig von den TLRs sowie von NOD1, NOD2 und dem NOD1/NOD2-Adapter Rip2 (Ishii *et al.*, 2006; Leber *et al.*, 2008; McCaffrey *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2005; O'Riordan *et al.*, 2002; Okabe *et al.*, 2005; Opitz *et al.*, 2006a; Stanley *et al.*, 2007; Stetson and Medzhitov, 2006; Stockinger *et al.*, 2002; Stockinger *et al.*, 2004). Eigene Arbeiten zeigten zudem, dass RIG-I, MDA5 und andere CARD-enhaltende Wirtszellmoleküle keine Bedeutung für die Typ I IFN-Antwort auf eine *L. pneumophila*-Infektion oder zytosolische DNA-Stimulation hatten, während IPS-1 an diesem Signalweg beteiligt zu sein schien (Opitz *et al.*, 2006b). Die Ergebnisse einer Beteiligung von IPS-1 an der Typ I IFN-Antwort auf zytosolische DNA-Stimulation in humanen Wirtszellen werden unterstützt durch zusätzliche Untersuchungen mit Hilfe von weiteren IPS-1-siRNAs sowie mit der HCV NS3/4A-Protease, welche IPS-1 prozessiert (Cheng *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu war der Signalweg in Mauszellen, welcher eine IFN $\beta$ -Induktion bei einer Listerien-Infektion oder nach einer zytosolischen DNA-Stimulation vermittelt, IPS-1-unabhängig (Soulat *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2006) oder nur teilweise von IPS-1 abhängig (Kumar *et al.*, 2006). Somit scheinen Unterschiede zwischen Maus und Mensch in diesem Signalweg zu existieren.

Die Identität des PRRs, welcher zytosolische DNA bzw. intrazelluläre Bakterien erkennt und Type I IFN-Antworten vermittelt, blieb weiterhin ungeklärt. Eine aktuelle Studie von Taniguchi und Kollegen legte nahe, dass ZBP1 einen intrazellulären PRR darstellt, der zytosolische DNA erkennt und TBK1- und IRF3-abhängig eine IFN $\alpha/\beta$ -Antwort aktiviert (Takaoka *et al.*, 2007). Die unter 3.10 dargestellten Ergebnisse einer Hemmung der späten DNA-stimulierten IFN $\beta$ -Expression in Maus-L929-Fibroblasten durch ZBP1-siRNA unterstützen dieser Hypothese. Im Gegensatz dazu scheint die IFN $\beta$ -Antwort in den untersuchten humanen Wirtszellen unabhängig von ZBP1 zu verlaufen. So zeigen unsere Überexpressionsversuche sowie unsere knock-down-Versuche unter Verwendung von verschiedenen ZBP1-spezifischen siRNAs in unterschiedlichen humanen Zelllinien, dass ZBP1 keine essentielle Bedeutung für die IFN $\beta$ -Antwort auf *L. pneumophila*- und *L. monocytogenes*-Infektionen oder zytosolische DNA-Stimulation hat (Lippmann *et al.*, 2008). Die Ergebnisse einer nicht essentiellen Bedeutung von ZBP1 für die IFN $\beta$ -Induktion nach DNA-Stimulation in unterschiedlichen Wirtszellen werden zudem unterstützt durch eine kürzlich erschienene Arbeit von Akira und Kollegen. In dieser Arbeit wurde eine unbeeinflusste IFN $\beta$ -Antwort auf eine zytosolische DNA-Stimulation von ZBP1-knock-out-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Maus-Zellen gezeigt (Ishii *et al.*, 2008).

Zusammengefasst bestehen eindeutige Hinweise auf einen TLR-, RLR und NOD1/2-unabhängigen Signalweg, welcher eine Typ I IFN-Antwort auf die zytosolische Erkennung von bakteriellen Bestandteilen bzw. von DNA vermittelt. Während IPS-1, TBK1 und IRF3 diese Signalkaskade in humanen Wirtszellen vermitteln, ist die Identität des vorgeschaltet gelegenen PRRs weiterhin ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.



### 4.3 Die Bedeutung intrazellulärer PRRs für die Aktivierung von intrazellulären angeborenen Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Bakterien

Neben der transkriptionellen und posttranslationalen Regulation von inflammatorischen Genen und von Typ I IFNs scheinen einige zytosolische PRRs auch zellautonome angeborene Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Pathogenen zu steuern. So zeigen die hier dargestellten Ergebnisse zum Einen eine intrazelluläre Erkennung von Legionellen-Flagellin sowie eine hiervon abhängige negative Beeinflussung der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* durch NAIP und Ipaf in verschiedenen humanen Zelllinien und primären Zellen (Vinzing *et al.*, 2008). Zum Anderen konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Erkennung von Legionellen zu einer IFN $\beta$ -abhängigen Restriktion der Legionellen-Replikation führt (Opitz *et al.*, 2006b). Die Mechanismen dieser beiden intrazellulären Abwehrprozesse gegenüber Legionellen (und wahrscheinlich anderen intrazellulären Bakterien) sind bisher nicht vollständig bzw. überhaupt nicht aufgeklärt worden.

In den meisten Mausstämmen vermittelt ein funktionelles *NAIP5*-Allel eine Resistenz gegenüber einer Legionellen-Infektion, während A/J-Mäuse, die ein nicht-funktionelles *mNAIP5* exprimieren, empfänglich gegenüber einer *L. pneumophila*-Infektion sind (Diez *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2003). Diese Beobachtung unterstreicht die große Bedeutung von angeborenen zellautonomen Abwehrmechanismen für die Immunantwort gegenüber intrazellulären Bakterien und der davon abhängenden Empfänglichkeit des Gesamtorganismus gegenüber intrazellulären Pathogenen. Obwohl zumindest manche Menschen im Gegensatz zu den meisten Mausstämmen empfänglich gegenüber einer *L. pneumophila*-Infektion sind und entweder das grippeartige Pontiac-Fieber oder schwere Pneumonien (Legionnaires-Krankheit) entwickeln können, zeigen die hier dargestellten Ergebnisse, dass auch in humanen Zellen die *mNAIP5*- bzw. *mIpaf*-Orthologe *hNAIP* und *hIpaf* eine zellautonome Abwehr gegenüber Legionellen vermitteln. So führte eine siRNA-abhängige Expressionshemmung von NAIP oder Ipaf in humanen Wirtszellen zu einer vermehrten Replikation der Legionellen, wohingegen die Überexpression von NAIP oder Ipaf das Legionellenwachstum negativ beeinflusste (Vinzing *et al.*, 2008). Somit scheint humanes NAIP bzw. Ipaf zwar eine intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* nicht komplett unterdrücken jedoch negativ kontrollieren zu können. *hNAIP* bzw. *hIpaf* scheinen hierbei, genauso wie *mNAIP5* und *mIpaf*, Legionellen-Flagellin im Wirtszellzytosol zu erkennen. Ob diese Erkennung direkt oder indirekt über vorgeschaltete Moleküle erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt.

Zu den zugrundeliegenden Mechanismen der nachfolgenden Legionellenreplikationshemmung von *mNAIP5* und *mIpaf* existieren bisher z.T. widersprüchliche Erklärungsansätze. So wurden bisher ein Caspase-1-abhängiger Zelltod (Pyroptose) (Molofsky *et al.*, 2006b; Zamboni *et al.*, 2006), ein Einfluß von NAIP5 und Ipaf auf die Maturation des Legionellen-enthaltenen Phagoendosoms (Amer *et al.*, 2006; Fortier *et al.*, 2007) sowie Autophagie-Prozesse (Amer and Swanson, 2005; Swanson and Molofsky, 2005) in diesem Zusammenhang diskutiert. Während initiale Studien zudem eine Bedeutung von *mIpaf* für die *mNAIP5*-abhängige Bakterienrestriktion nahe legten (Zamboni *et al.*, 2006), deuten die hier dargestellten eigenen Ergebnisse zu *hNAIP* und *hIpaf* (Vinzing *et al.*, 2008) sowie eine aktuelle Studie zu *mNAIP5* und *mIpaf* an (Lamkanfi *et al.*, 2007), dass es sich um zwei voneinander unabhängig funktionierende zellautonome Abwehrmechanismen handelt.

Bedenkt man die große Bedeutung der verschiedenen *mNAIP5*-Allele für die Resistenz oder Empfänglichkeit von Mäusen gegenüber Legionellen-Infektionen, so ergibt sich zudem die Frage, ob Polymorphismen im NAIP-

und/oder Ipaf-Gen der Menschen existieren und möglicherweise die Empfänglichkeit gegenüber einer *L. pneumophila*-Infektion sowie deren Krankheitsverlauf (Pontiac Fieber versus Legionnaires Krankheit) beeinflussen.

Ein weiterer, NAIP/Ipaf-unabhängiger, angeborener intrazellulärer Abwehrmechanismus gegenüber *L. pneumophila* scheint durch autokrin/parakrin produziertes IFN $\beta$  vermittelt zu werden. Die eigenen Arbeiten legen ein Modell nahe, in dem intrazelluläre Legionellen bzw. Typ IV-Sekretionsapparat-abhängig sezernierte Legionellen-Moleküle (möglicherweise Legionellen-DNA) im Wirtszellzytosol detektiert werden (Opitz *et al.*, 2006b). Nachfolgend kommt es zu einer IPS-1- und IRF3-abhängigen Produktion von IFN $\beta$ , welches autokrin/parakrin über den IFN $\alpha/\beta$ -Rezeptor, wahrscheinlich über den JAK/STAT-Signalweg, einen teilweise antibakteriellen Status der Wirtszelle bewirken. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der sich *L. pneumophila* besser in IFAR-knock-out-Mauszellen vermehrte, unterstützt diese Hypothese (Coers *et al.*, 2007). Über die zugrundeliegenden Mechanismen der Resistenz-beeinflussenden Wirkung von IFN $\beta$  kann hingegen momentan nur spekuliert werden: So könnten pro-apoptotische Effekte der Typ I Interferone (Carrero *et al.*, 2004; Stockinger *et al.*, 2002), die IFN $\beta$ -abhängige NO-Produktion (Diefenbach *et al.*, 1998; Freudenberg *et al.*, 2002), eine IFN $\beta$ -abhängige Expression vonIDO, Sp110b oder p47-GTPasen (Beatty *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2005; Taylor, 2007) oder ein IFN $\beta$ -regulierter Caspase-1-abhängiger Zelltod (Henry *et al.*, 2007) hierbei eine Rolle spielen.

Insgesamt existieren mit den NAIP-, Ipaf und Typ I IFN-abhängigen sowie anderen hier nicht aufgeführten Prozessen verschiedene angeborene intrazelluläre Abwehrmechanismen. Diese Systeme wirken der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila* und vermutlich von anderen Bakterien in humanen Zellen entgegen und beeinflussen somit wahrscheinlich die Empfänglichkeit des Gesamtorganismus gegenüber Pathogenen.

## 4.4 Ausblick

Die hier aufgeführten Forschungsarbeiten konnten einige Aspekte der extra- und intrazellulären Erkennung von verschiedenen Pathogenen in unterschiedlichen humanen Wirtszellen sowie hiervon aktivierte Genregulationsprozesse und intrazelluläre Abwehrmechanismen gegenüber intrazellulären Bakterien weiter aufklären. Aus diesen Untersuchungen und aus Studien anderer Arbeitsgruppen ergeben sich jedoch weiterführende Fragestellungen.

So sollten zukünftige Forschungsprojekte, welche zum Teil in unserer Arbeitsgruppe bereits bearbeitet werden, u.a. den Mechanismus mit dem Wirtszellen eine IFN $\alpha/\beta$ -Antwort auf Infektionen mit intrazellulären Bakterien bzw. auf Stimulation mit zytoplasmischer DNA generieren weiter aufklären. Hierbei ist insbesondere die Identität des putativ zytoplasmischen, DNA-erkennenden PRRs zu ermitteln. Zweitens bedürfen die Mechanismen der NAIP-, Ipaf und IFN $\beta$ -abhängigen intrazellulären Abwehrsysteme weiterer Aufklärung. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, die Bedeutung der verschiedenen extra- und v.a. intrazellulären PRRs sowie der Typ I IFNs, z.B. in Legionellen- bzw. Pneumokokken-Infektionsmodellen *in vivo*, zu untersuchen. Bedenkt man (a) die kürzlich gezeigte Modulation von unterschiedlichen Th-Zell-Antworten (Th1, Th2, Th17) durch differentielle Aktivierung der TLRs und NOD1/NOD2 (Fritz *et al.*, 2007; van Heel *et al.*, 2005), (b) die Notwendigkeit von (wahrscheinlich NLR-Inflammasom-abhängig reguliertem) IL-1 $\beta$  für die Generierung von (humanen) Th17-Lymphozyten (Wilson *et al.*, 2007), und (c) die große Bedeutung der Th1-Zellen für die adaptive Immunantwort

gegenüber intrazellulären Bakterien (Abbas *et al.*, 1996; Mosmann and Coffman, 1989) sowie der IL-17- und IL-22-produzierenden Th17-Zellen für die (mukosale) Abwehr v.a. extrazellulärer Bakterien (Aujla *et al.*, 2008; Happel *et al.*, 2005), so sollten zukünftige Untersuchungen auch die Rolle der NLRs für die Aktivierung und Regulation der angeborenen Immunität (z.B. gegenüber *S. pneumoniae* und *L. pneumophila* im Respirations-trakt) adressieren. Schließlich wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit durch Genpolymorphismen bedingte Variationen in einem oder mehreren der hier besprochenen angeborenen Abwehrmechanismen eine Bedeutung für die Empfänglichkeit gegenüber der Legionellen-Infektion und anderen bakteriellen Infektionskrankheiten im Menschen haben.

Bedenkt man einerseits die ständige Zunahme von Resistenzen in der antimikrobiellen Therapie und andererseits die inzwischen anerkannte wichtige Bedeutung von genetischen Faktoren für die Empfänglichkeit von Individuen gegenüber Infektionskrankheiten (Quintana-Murci *et al.*, 2007), so erscheint die weitere Erforschung von (angeborenen) Immunmechanismen sowohl für die Risikoabschätzung und Prophylaxe von Infektionen sowie für die Entwicklung neuartiger Therapiestrategien von großem Interesse.

## Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Instanz zur Abwehr einer Infektion dar. Es erkennt eindringende Pathogene mit Hilfe von keimbahnkodierten mustererkennenden Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs). Hierzu gehören die relativ gut untersuchten, transmembranären Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die kürzlich entdeckten, intrazellulär lokalisierten NOD-like Rezeptoren (NLRs), RIG-like Rezeptoren (RLRs) sowie möglicherweise das Z-DNA-bindende Protein (ZBP1/DAI). PRRs erkennen hoch konservierte mikrobielle Moleküle, sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs). Die TLRs, NLRs, RLRs und möglicherweise ZBP1 regulieren nach Aktivierung z.B. eine NF- $\kappa$ B-abhängige und/oder IRF-abhängige Genexpression, steuern posttranskriptionelle Regulationsmechanismen und/oder aktivieren angeborene intrazelluläre Resistenzmechanismen gegenüber intrazellulären Mikroorganismen. Die Zielsetzung der Arbeit war es, die Bedeutung dieser Rezeptoren für die Erkennung von isolierten PAMPs, wie z.B. Lipoteichonsäuren, sowie von Infektionen mit intakten, extrazellulären und intrazellulären Pathogenen in unterschiedlichen Wirtszellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollten die Signaltransduktionskaskaden einiger PRRs sowie der Einfluss der PRRs auf intrazelluläre Resistenzmechanismen weiterführend charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass hoch aufgereinigte Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* sowie verwandte Glykolipide von *Treponema brennaborensis* und *T. maltophilum* spezifisch TLR2 aktivieren. In Lungenepithelzellen wird *Streptococcus pneumoniae* von TLR2 und TLR1 erkannt und induziert eine NF- $\kappa$ B-regulierte Genexpression. Invasive Pneumokokken können darüber hinaus auch durch das intrazelluläre NLR-Molekül NOD2 detektiert werden. Während Rip2, IRAK1, TAK1 und TAB2 positiv zur NOD2-abhängigen NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen, wurde NOD2 durch  $\beta$ -PIX und Rac1 negativ reguliert. Hierbei vermittelten  $\beta$ -PIX und Rac1 eine Translokation von NOD2 an den an der Plasmamembran lokalisierten negativen NOD2-Regulator Erbin. *Moraxella catarrhalis*, dessen Invasion in Lungenepithelzellen hier erstmals gezeigt werden konnte, wurde von diesen Wirtszellen über TLR2- und teilweise über NOD1 erkannt. Die obligat bzw. fakultativ intrazellulären Bakterien *Chlamydomphila pneumoniae* und *Listeria monocytogenes*, nicht aber extrazelluläre *L. innocua*, wurden v.a. durch NOD1 in Endothelzellen erkannt. Sie aktivierten NOD1-, NF- $\kappa$ B- und p38-abhängig eine IL-8-Produktion.

Im Gegensatz zur v.a. NF- $\kappa$ B-regulierten IL-8-Produktion bei bakteriellen Infektionen war die IFN $\beta$ -Produktion in Influenza A-Virus-infizierten Lungenepithelzellen abhängig von dem RLR-Molekül RIG-I, von dem Adaptermolekül IPS-1 sowie von dem Transkriptionsfaktor IRF3. Andererseits exprimierten Influenzaviren das NS1-Protein, welches die Produktion des antiviral wirkenden IFN $\beta$ , wahrscheinlich über die Bindung und Hemmung von RIG-I/IPS-1, unterdrückte. Mit *Legionella pneumophila* infizierte Lungenepithelzellen produzierten RLR-, NOD1/2-, TLR-, und ZBP1-unabhängig, aber IPS-1- und IRF3-abhängig ebenfalls IFN $\beta$ . Dieser IPS-1-IRF3-Signalweg bzw. die hierdurch gesteuerte IFN $\beta$ -Produktion sowie dazugegebenes IFN $\beta$  bewirkten eine Restriktion der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila*. Ein zweiter, IFN $\beta$ -unabhängiger, intrazellulärer Resistenzmechanismus gegenüber *L. pneumophila* in Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen wurde durch die NLR-Moleküle NAIP und Ipaf nach Erkennung von Legionellen-Flagellin gesteuert.

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Wirtszellen, wie z.B. Lungenepithelzellen, Endothelzellen und Makrophagen, über transmembranäre und zytosolische PRRs verfügen, mit denen sie extrazelluläre und intrazelluläre Pathogene erkennen können. Diese Pathogenerkennung steuert nachfolgend sowohl eine differenzierte inflammatorische Genexpression als auch zellautonome angeborene Abwehrmechanismen gegenüber eindringenden Pathogenen.

## Summary

The innate immune system represents the principal sensor of infections in multicellular organisms. It recognizes invading pathogens by using germ-line encoded pattern recognition receptors (PRRs) such as the well examined, transmembrane Toll-like receptors (TLRs), as well as the recently found intracellular NOD-like receptors (NLRs) and RIG-like receptors (RLRs). PRRs detect highly conserved microbial molecules, the so-called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), and might also mediate responses to some endogenous danger-associated molecular patterns (DAMPs). Recognition of pathogens by TLRs, NLRs, RLRs and perhaps ZBP1 activates either a NF- $\kappa$ B-dependent and/or IRF-dependent gene expression, mediates posttranscriptional gene regulation and/or activates innate intracellular resistance mechanisms against intracellular microbes.

Here we showed that purified lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, related glycolipids from *Treponema brennaborensis* and *T. maltophilum*, as well as *Streptococcus pneumoniae* were recognized by TLR2 or TLR1/2, respectively, and activated a NF- $\kappa$ B-dependent gene expression. Invasive pneumococci were additionally detected by the NLR molecule NOD2 which led to NF- $\kappa$ B activation. While Rip2, IRAK1, TAK1 and TAB2 positively contributed to the NOD2-dependent NF- $\kappa$ B activation,  $\beta$ -PIX and Rac1 were involved in negative regulation of NOD2 by mediating NOD2's trafficking to its negative regulator Erbin at the plasma membrane. *Moraxella catarrhalis*, which was for the first time shown to invade lung epithelial cells, was detected by lung epithelial TLR2 and -to a lesser extent- by NOD1. The obligate or facultative intracellular bacteria *Chlamydomphila pneumoniae* and *Listeria monocytogenes*, respectively, but not the extracellular *L. innocua* were detected by NOD1 in endothelial cells and activated a NF- $\kappa$ B- and p38-dependent IL-8 production.

In contrast to the primarily NF- $\kappa$ B-regulated IL-8 production in bacterial infections, the IFN $\beta$  production in influenza A virus-infected lung epithelial cells was dependent on the RLR molecule RIG-I, the adapter IPS-1 as well as the transcription factor IRF3. In addition, we showed that the viral NS1 protein was capable of inhibiting the RIG-I-induced signaling, a mechanism which corresponded to the observation that only NS1-deficient but not the wild-type virus induced high-level production of IFN $\beta$ . *Legionella pneumophila*-infected lung epithelial cells produced a RLR-, NOD1/2-, TLR-, and ZBP1-independent, but IPS-1- and IRF3-dependent IFN $\beta$  expression. The IPS-1-IRF3 signaling leading to IFN $\beta$  production or added IFN $\beta$  led to *Legionella* growth restriction within lung epithelial cells. A second, IFN $\beta$ -independent intracellular innate resistance mechanism to *L. pneumophila* in lung epithelial cells and alveolar macrophages was mediated by the NLRs NAIP and Ipaf which detected *Legionella* flagellin.

Overall, host cells including lung epithelial and endothelial cells as well as macrophages were equipped with transmembrane and cytosolic PRRs which detect extracellular and intracellular pathogens, and which mediate a differentiated inflammatory gene expression as well as cell-autonomous innate defense to invading pathogens.

## 5 Literaturverzeichnis

### 5.1 Literaturverzeichnis der eigenen Publikationen

Eitel, J., Krull, M., Hocke, A. C., N'guessan, P. D., Zahlten, J., Schmeck, B., Slevogt, H., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and **Opitz, B.** (2008) Beta-PIX and Rac1 GTPase mediate trafficking and negative regulation of NOD2. *J Immunol* **181**: 2664-2671.

Lippmann, J., Rothenburg, S, Deigendesch, N, Eitel, J., Meixenberger, K, van, Laak, V, Slevogt, H, N'guessan, P. D., Hippenstiel, S, Chakraborty, T., Flieger, A., Suttorp, N., and **Opitz, B.** (2008) IFN $\beta$  responses induced by intracellular bacteria or cytosolic DNA in different human cells do not require ZBP1 (DLM-1/DAI). *Cell Microbiol* **10**:2579-88.

**Opitz, B.**, Forster, S., Hocke, A. C., Maass, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Krull, M. (18-2-2005) Nod1-mediated endothelial cell activation by Chlamydomphila pneumoniae. *Circ Res* **96**: 319-326.

**Opitz, B.**, Hippenstiel, S., Eitel, J., and Suttorp, N. (2007a) Extra- and intracellular innate immune recognition in endothelial cells. *Thromb Haemost* **98**: 319-326.

**Opitz, B.**, Puschel, A., Beermann, W., Hocke, A. C., Forster, S., Schmeck, B., van, Laak, V, Chakraborty, T., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006a) Listeria monocytogenes activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol* **176**: 484-490.

**Opitz, B.**, Puschel, A., Schmeck, B., Hocke, A. C., Rosseau, S., Hammerschmidt, S., Schumann, R. R., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2004) Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized Streptococcus pneumoniae. *J Biol Chem* **279**: 36426-36432.

**Opitz, B.**, Rejaibi, A., Dauber, B., Eckhard, J., Vinzing, M., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Suttorp, N., and Wolff, T. (2007b) IFN $\beta$  induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein. *Cell Microbiol* **9**: 930-938.

**Opitz, B.**, Schroder, N. W., Spreitzer, I., Michelsen, K. S., Kirschning, C. J., Hallatschek, W., Zahringer, U., Hartung, T., Gobel, U. B., and Schumann, R. R. (2001) Toll-like receptor-2 mediates Treponema glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J Biol Chem* **276**: 22041-22047.

**Opitz, B.**, Hippenstiel, S., and Suttorp, N. (2007c) Intracellular pattern recognition: a second sentinel system. In *Mechanisms of Pulmonary Innate Immunity*. Taggart, C. and Greene, C. (eds.) Research Signpost Publishers. [in press]

**Opitz, B.**, Vinzing, M., van, Laak, V, Schmeck, B., Heine, G., Gunther, S., Preissner, R., Slevogt, H., N'guessan, P. D., Eitel, J., Goldmann, T., Flieger, A., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006b) Legionella pneumophila induces IFN $\beta$  in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J Biol Chem* **281**: 36173-36179.

Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A. C., **Opitz, B.**, Hammerschmidt, S., Mitchell, T. J., Kracht, M., Rosseau, S., Suttorp, N., and Hippenstiel, S. (2006) Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF-kappaB-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L730-L737.

Slevogt, H., Seybold, J., Tiwari, K. N., Hocke, A. C., Jonat, C., Dietel, S., Hippenstiel, S., Singer, B. B., Bachmann, S., Suttorp, N., and **Opitz, B.** (2007) Moraxella catarrhalis is internalized in respiratory epithelial cells by a trigger-like mechanism and initiates a TLR2- and partly NOD1-dependent inflammatory immune response. *Cell Microbiol* **9**: 694-707.

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

## 5.2 Literaturverzeichnis aller Autoren

Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787-793.

Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **4**: 499-511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**: 783-801.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**: 732-738.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* **285**: 736-739.

Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Weiss, D. S., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (2000) The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *EMBO J* **19**: 3325-3336.

Amer, A., Franchi, L., Kanneganti, T. D., Body-Malapel, M., Ozoren, N., Brady, G., Meshinchi, S., Jagirdar, R., Gewirtz, A., Akira, S., and Nunez, G. (2006) Regulation of Legionella phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J Biol Chem* **281**: 35217-35223.

Amer, A. O. and Swanson, M. S. (2005) Autophagy is an immediate macrophage response to Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **7**: 765-778.

Anderson, K. V., Jurgens, G., and Nusslein-Volhard, C. (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* **42**: 779-789.

Andrejeva, J., Childs, K. S., Young, D. F., Carlos, T. S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R. E. (2004) The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 17264-17269.

Arimoto, K., Takahashi, H., Hishiki, T., Konishi, H., Fujita, T., and Shimotohno, K. (2007) Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 7500-7505.

Auerbuch, V., Brockstedt, D. G., Meyer-Morse, N., O'Riordan, M., and Portnoy, D. A. (2004) Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to Listeria monocytogenes. *J Exp Med* **200**: 527-533.

Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y., and Kolls, J. K. (2008) IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med*. **14**:275-81.

Beatty, W. L., Belanger, T. A., Desai, A. A., Morrison, R. P., and Byrne, G. I. (1994) Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun* **62**: 3705-3711.



- Bertin, J., Nir, W. J., Fischer, C. M., Tayber, O. V., Errada, P. R., Grant, J. R., Keilty, J. J., Gosselin, M. L., Robison, K. E., Wong, G. H., Glucksmann, M. A., and DiStefano, P. S. (1999) Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 12955-12958.
- Beutler, B. (2007) Neo-ligands for innate immune receptors and the etiology of sterile inflammatory disease. *Immunol Rev* **220**: 113-128.
- Beutler, B., Du, X., and Xia, Y. (2007) Precis on forward genetics in mice. *Nat Immunol* **8**: 659-664.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**: 1014-1018.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2006a) On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol* **7**: 1029-1035.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. (2006b) Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**: 808-812.
- Boyden, E. D. and Dietrich, W. F. (2006) Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin. *Nat Genet* **38**: 240-244.
- Carrero, J. A., Calderon, B., and Unanue, E. R. (2004) Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. *J Exp Med* **200**: 535-540.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N., and Bowie, A. G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7**: 1074-1081.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M. A., Foster, S. J., Mak, T. W., Nunez, G., and Inohara, N. (2003) An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* **4**: 702-707.
- Cheng, G., Zhong, J., Chung, J., and Chisari, F. V. (2007) Double-stranded DNA and double-stranded RNA induce a common antiviral signaling pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9035-9040.
- Chin, A. I., Dempsey, P. W., Bruhn, K., Miller, J. F., Xu, Y., and Cheng, G. (2002) Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature* **416**: 190-194.
- Coers, J., Vance, R. E., Fontana, M. F., and Dietrich, W. F. (2007) Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol* **9**: 2344-2357.
- Da Silva, Correia J., Miranda, Y., Leonard, N., and Ulevitch, R. J. (2007) The subunit CSN6 of the COP9 signalosome is cleaved during apoptosis. *J Biol Chem* **282**: 12557-12565.
- Damiano, J. S., Newman, R. M., and Reed, J. C. (2004) Multiple roles of CLAN (caspase-associated recruitment domain, leucine-rich repeat, and NAIP CIIA HET-E, and TP1-containing protein) in the mammalian innate immune response. *J Immunol* **173**: 6338-6345.
- Derre, I. and Isberg, R. R. (2004) Macrophages from mice with the restrictive Lgn1 allele exhibit multifactorial resistance to *Legionella pneumophila*. *Infect Immun* **72**: 6221-6229.

- Diao, F., Li, S., Tian, Y., Zhang, M., Xu, L. G., Zhang, Y., Wang, R. P., Chen, D., Zhai, Z., Zhong, B., Tien, P., and Shu, H. B. (2007) Negative regulation of MDA5- but not RIG-I-mediated innate antiviral signaling by the dihydroxyacetone kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11706-11711.
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**: 1529-1531.
- Diefenbach, A., Schindler, H., Donhauser, N., Lorenz, E., Laskay, T., MacMicking, J., Rollinghoff, M., Gresser, I., and Bogdan, C. (1998) Type 1 interferon (IFN $\alpha$ / $\beta$ ) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* **8**: 77-87.
- Diez, E., Lee, S. H., Gauthier, S., Yaraghi, Z., Tremblay, M., Vidal, S., and Gros, P. (2003) Birc1e is the gene within the Lgn1 locus associated with resistance to Legionella pneumophila. *Nat Genet* **33**: 55-60.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I., and Reed, J. C. (2007) Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation. *Mol Cell* **25**: 713-724.
- Fortier, A., de Chastellier, C., Balor, S., and Gros, P. (2007) Birc1e/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by Legionella pneumophila. *Cell Microbiol* **9**: 910-923.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenaabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., and Nunez, G. (2006) Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1 $\beta$  in salmonella-infected macrophages. *Nat Immunol* **7**: 576-582.
- Freudenberg, M. A., Merlin, T., Kalis, C., Chvatchko, Y., Stubig, H., and Galanos, C. (2002) Cutting edge: a murine, IL-12-independent pathway of IFN- $\gamma$  induction by gram-negative bacteria based on STAT4 activation by Type I IFN and IL-18 signaling. *J Immunol* **169**: 1665-1668.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., and Girardin, S. E. (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* **7**: 1250-1257.
- Fritz, J. H., Girardin, S. E., Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D., Caroff, M., Cavaillon, J. M., Philpott, D. J., and Adib-Conquy, M. (2005) Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and. *Eur J Immunol* **35**: 2459-2470.
- Fritz, J. H., le Bourhis, L., Sellge, G., Magalhaes, J. G., Fsihi, H., Kufer, T. A., Collins, C., Viala, J., Ferrero, R. L., Girardin, S. E., and Philpott, D. J. (2007) Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity* **26**: 445-459.
- Gay, N. J. and Keith, F. J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* **351**: 355-356.
- Ghosh, S. and Karin, M. (2002) Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* **109**: S81-S96.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A., Antignac, A., Jehanno, M., Viala, J., Tedin, K., Taha, M. K., Labigne, A., Zahringer, U., Coyle, A. J., DiStefano, P. S., Bertin, J., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2003a) Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* **300**: 1584-1587.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., and Sansonetti, P. J. (2003b) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.
- Girardin, S. E., Tournibize, R., Mavris, M., Page, A. L., Li, X., Stark, G. R., Bertin, J., DiStefano, P. S., Yaniv, M., Sansonetti, P. J., and Philpott, D. J. (2001) CARD4/Nod1 mediates NF- $\kappa$ B and JNK activation by invasive Shigella flexneri. *EMBO Rep* **2**: 736-742.

- Hancock, R. E. and Sahl, H. G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**: 1551-1557.
- Happel, K. I., Dubin, P. J., Zheng, M., Ghilardi, N., Lockhart, C., Quinton, L. J., Odden, A. R., Shellito, J. E., Bagby, G. J., Nelson, S., and Kolls, J. K. (19-9-2005) Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J Exp Med* **202**: 761-769.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**: 1526-1529.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740-745.
- Henry, T., Brotcke, A., Weiss, D. S., Thompson, L. J., and Monack, D. M. (2007) Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *J Exp Med* **204**: 987-994.
- Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zahringer, U., and Beutler, B. (2005) CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* **433**: 523-527.
- Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004) The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* **5**: 971-974.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K. K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G. (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314**: 994-997.
- Hsu, Y. M., Zhang, Y., You, Y., Wang, D., Li, H., Duramad, O., Qin, X. F., Dong, C., and Lin, X. (2007) The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**: 198-205.
- Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M., and Thomas, G. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999) Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**: 14560-14567.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., and Nunez, G. (2003) Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* **278**: 5509-5512.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957) Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **147**: 258-267.

- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., Sato, S., Yamamoto, M., Uematsu, S., Kawai, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006) A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* **7**: 40-48.
- Ishii, K. J., Kawagoe, T., Koyama, S., Matsui, K., Kumar, H., Kawai, T., Uematsu, S., Takeuchi, O., Takeshita, F., Coban, C., and Akira, S. (2008) TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* **451**: 725-729.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* **5**: 987-995.
- Janeway, C. A., Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., Kim, Y. G., Chen, G., Park, J. H., Franchi, L., Vandenabeele, P., and Nunez, G. (2007a) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity* **26**: 433-443.
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., and Nunez, G. (2007b) Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity* **27**: 549-559.
- Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., Akira, S., and Nunez, G. (2006) Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. *Nature* **440**: 233-236.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C. S., Reis e Sousa, Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441**: 101-105.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005) IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* **6**: 981-988.
- Kobayashi, K., Inohara, N., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Nunez, G., Janeway, C. A., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2002) RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature* **416**: 194-199.
- Komuro, A. and Horvath, C. M. (2006) RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol* **80**: 12332-12342.
- Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., Aozasa, K., Kawai, T., and Akira, S. (2007) Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity* **27**: 240-252.
- Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K. J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2006) Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *J Exp Med* **203**: 1795-1803.
- Lamkanfi, M., Amer, A., Kanneganti, T. D., Munoz-Planillo, R., Chen, G., Vandenabeele, P., Fortier, A., Gros, P., and Nunez, G. (2007) The Nod-like receptor family member Nalp5/Birc1e restricts *Legionella pneumophila* growth independently of caspase-1 activation. *J Immunol* **178**: 8022-8027.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine,

R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Raymond, C., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la, Bastide M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nord-siek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., and Chen, Y. J. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921.

Leber, J. H., Crimmins, G. T., Raghavan, S., Meyer-Morse, N. P., Cox, J. S., and Portnoy, D. A. (2008) Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathog* **4**: e6.

Lee, H. K., Dunzendorfer, S., Soldau, K., and Tobias, P. S. (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* **24**: 153-163.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., and Hoffmann, J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**: 973-983.

Levy, D. E. and Darnell, J. E., Jr. (2002) Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 651-662.

Lund, J. M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N. C., Gale, N. W., Iwasaki, A., and Flavell, R. A. (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5598-5603.

Lysenko, E. S., Clarke, T. B., Shchepetov, M., Ratner, A. J., Roper, D. I., Dowson, C. G., and Weiser, J. N. (2007) Nod1 signaling overcomes resistance of *S. pneumoniae* to opsonophagocytic killing. *PLoS Pathog* **3**: e118.

Mancuso, G., Midiri, A., Biondo, C., Beninati, C., Zummo, S., Galbo, R., Tomasello, F., Gambuzza, M., Macri, G., Ruggeri, A., Leanderson, T., and Teti, G. (2007) Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. *J Immunol* **178**: 3126-3133.

Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., and Dixit, V. M. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature* **430**: 213-218.

- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., and Dixit, V. M. (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**: 228-232.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E., and Tschopp, J. (2004) Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome. *Curr Biol* **14**: 1929-1934.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**: 417-426.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A., and Tschopp, J. (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**: 237-241.
- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V., and Tschopp, J. (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol* **8**: 497-503.
- McCaffrey, R. L., Fawcett, P., O'Riordan, M., Lee, K. D., Havell, E. A., Brown, P. O., and Portnoy, D. A. (2004) A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11386-11391.
- McCoy, C. E. and O'Neill, L. A. (2008) The role of toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci* **13**: 62-70.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397.
- Meylan, E., Curran, J., Hofmann, K., Moradpour, D., Binder, M., Bartenschlager, R., and Tschopp, J. (2005) Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* **437**: 1167-1172.
- Meylan, E., Tschopp, J., and Karin, M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* **442**: 39-44.
- Miao, E. A., Alpuche-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I., and Aderem, A. (2006) Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat Immunol* **7**: 569-575.
- Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K., and Swanson, M. S. (2006) Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J Exp Med* **203**: 1093-1104.
- Moore, C. B., Bergstralh, D. T., Duncan, J. A., Lei, Y., Morrison, T. E., Zimmermann, A. G., Accavitti-Loper, M. A., Madden, V. J., Sun, L., Ye, Z., Lich, J. D., Heise, M. T., Chen, Z., and Ting, J. P. (2008) NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* **451**: 573-577.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
- O'Connell, R. M., Saha, S. K., Vaidya, S. A., Bruhn, K. W., Miranda, G. A., Zarnegar, B., Perry, A. K., Nguyen, B. O., Lane, T. F., Taniguchi, T., Miller, J. F., and Cheng, G. (2004) Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* **200**: 437-445.
- O'Connell, R. M., Vaidya, S. A., Perry, A. K., Saha, S. K., Dempsey, P. W., and Cheng, G. (2005) Immune activation of type I IFNs by *Listeria monocytogenes* occurs independently of TLR4, TLR2, and receptor interacting protein 2 but involves TNFR-associated NF kappa B kinase-binding kinase 1. *J Immunol* **174**: 1602-1607.

- O'Neill, L. A. and Bowie, A. G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**: 353-364.
- O'Riordan, M., Yi, C. H., Gonzales, R., Lee, K. D., and Portnoy, D. A. (2002) Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13861-13866.
- Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G., and Cho, J. H. (2001a) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 603-606.
- Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F., Yamaoka, S., and Nunez, G. (2001b) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**: 4812-4818.
- Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T., and Nagata, S. (2005) Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J Exp Med* **202**: 1333-1339.
- Pan, H., Yan, B. S., Rojas, M., Shebzukhov, Y. V., Zhou, H., Kobzik, L., Higgins, D. E., Daly, M. J., Bloom, B. R., and Kramnik, I. (2005) Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* **434**: 767-772.
- Philpott, D. J., Yamaoka, S., Israel, A., and Sansonetti, P. J. (2000) Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* **165**: 903-914.
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Naslund, T. I., Liljestrom, P., Weber, F., and Reis e Sousa (2006) RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**: 997-1001.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088.
- Quintana-Murci, L., Alcais, A., Abel, L., and Casanova, J. L. (2007) Immunology in natura: clinical, epidemiological and evolutionary genetics of infectious diseases. *Nat Immunol* **8**: 1165-1171.
- Radtke, A. L. and O'Riordan, M. X. (2006) Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol* **8**: 1720-1729.
- Remoli, M. E., Giacomini, E., Lutfalla, G., Dondi, E., Orefici, G., Battistini, A., Uze, G., Pellegrini, S., and Coccia, E. M. (2002) Selective expression of type I IFN genes in human dendritic cells infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **169**: 366-374.
- Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F., and Vance, R. E. (2006) Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS Pathog* **2**: e18.
- Robinson, M. J., Sancho, D., Slack, E. C., LeibundGut-Landmann, S., and Reis e Sousa (2006) Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol* **7**: 1258-1265.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K. A. (2005) The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* **175**: 5260-5268.
- Sadikot, R. T., Han, W., Everhart, M. B., Zoia, O., Peebles, R. S., Jansen, E. D., Yull, F. E., Christman, J. W., and Blackwell, T. S. (2003) Selective I kappa B kinase expression in airway epithelium generates neutrophilic lung inflammation. *J Immunol* **170**: 1091-1098.

- Sadikot, R. T., Zeng, H., Joo, M., Everhart, M. B., Sherrill, T. P., Li, B., Cheng, D. S., Yull, F. E., Christman, J. W., and Blackwell, T. S. (2006) Targeted immunomodulation of the NF-kappaB pathway in airway epithelium impacts host defense against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol* **176**: 4923-4930.
- Salaun, B., Romero, P., and Lebecque, S. (2007) Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur J Immunol* **37**: 3311-3318.
- Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., and Green, D. R. (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**: 1253-1257.
- Sansonetti, P. J. (2004) War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* **4**: 953-964.
- Schmid, D. and Munz, C. (2007) Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* **27**: 11-21.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* **274**: 17406-17409.
- Segal, G., Purcell, M., and Shuman, H. A. (1998) Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1669-1674.
- Seth, R. B., Sun, L., Ea, C. K., and Chen, Z. J. (2005) Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* **122**: 669-682.
- Shoma, S., Tsuchiya, K., Kawamura, I., Nomura, T., Hara, H., Uchiyama, R., Daim, S., and Mitsuyama, M. (2008) Critical involvement of pneumolysin in production of IL-1 {alpha} and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect Immun.* **76**:1547-57.
- Shornick, L. P., Wells, A. G., Zhang, Y., Patel, A. C., Huang, G., Takami, K., Sosa, M., Shukla, N. A., Agapov, E., and Holtzman, M. J. (2008) Airway Epithelial versus Immune Cell Stat1 Function for Innate Defense against Respiratory Viral Infection. *J Immunol* **180**: 3319-3328.
- Soulat, D., Bauch, A., Stockinger, S., Superti-Furga, G., and Decker, T. (2006) Cytoplasmic *Listeria monocytogenes* stimulates IFN-beta synthesis without requiring the adapter protein MAVS. *FEBS Lett* **580**: 2341-2346.
- Stanley, S. A., Johndrow, J. E., Manzanillo, P., and Cox, J. S. (2007) The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. *J Immunol* **178**: 3143-3152.
- Stetson, D. B. and Medzhitov, R. (2006) Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* **24**: 93-103.
- Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L., Steinborn, R., Kolbe, T., Unger, H., Chakraborty, T., Levy, D. E., Muller, M., and Decker, T. (2002) Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* **169**: 6522-6529.
- Stockinger, S., Reutterer, B., Schaljo, B., Schellack, C., Brunner, S., Materna, T., Yamamoto, M., Akira, S., Taniguchi, T., Murray, P. J., Muller, M., and Decker, T. (2004) IFN regulatory factor 3-dependent induction of type I IFNs by intracellular bacteria is mediated by a TLR- and Nod2-independent mechanism. *J Immunol* **173**: 7416-7425.
- Sun, Q., Sun, L., Liu, H. H., Chen, X., Seth, R. B., Forman, J., and Chen, Z. J. (2006) The specific and essential role of MAVS in antiviral innate immune responses. *Immunity* **24**: 633-642.



- Suzuki, T., Franchi, L., Toma, C., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Inohara, N., Sasakawa, C., and Nunez, G. (2007) Differential Regulation of Caspase-1 Activation, Pyroptosis, and Autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-Infected Macrophages. *PLoS Pathog* **3**: e111.
- Swanson, M. S. and Molofsky, A. B. (2005) Autophagy and inflammatory cell death, partners of innate immunity. *Autophagy* **1**: 174-176.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., and Taniguchi, T. (2007) DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* **448**: 501-505.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001) Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* **13**: 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002) Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* **169**: 10-14.
- Tattoli, I., Carneiro, L. A., Jehanno, M., Magalhaes, J. G., Shu, Y., Philpott, D. J., Arnoult, D., and Girardin, S. E. (2008) NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF-kappaB and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production. *EMBO Rep* **9**: 293-300.
- Taylor, G. A. (2007) IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell Microbiol* **9**: 1099-1107.
- Ting, J. P., Kastner, D. L., and Hoffman, H. M. (2006) CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* **6**: 183-195.
- Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Girardin, S. E., Boneca, I. G., Lemos, R., Bozza, M. T., Domingues, R. C., Coyle, A. J., Bertin, J., Philpott, D. J., and Plotkowski, M. C. (2005) Nod1 participates in the innate immune response to Pseudomonas aeruginosa. *J Biol Chem* **280**: 36714-36718.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999a) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* **401**: 811-815.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Smith, K. D., and Aderem, A. (1999b) Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14459-14463.
- van Beelen, A. J., Zelinkova, Z., Taanman-Kueter, E. W., Muller, F. J., Hommes, D. W., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L., and de Jong, E. C. (2007) Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity* **27**: 660-669.
- van Heel, D. A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K., Foxwell, B. M., Mengin-Lecreulx, D., and Playford, R. J. (2005) Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol* **35**: 2471-2476.
- Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G. N. (2007) Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* **178**: 6444-6455.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts,

R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di, Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferreira, S., Garg, N., Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., and Nodell, M. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351.

Vogel, J. P., Andrews, H. L., Wong, S. K., and Isberg, R. R. (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876.

West, M. A., Wallin, R. P., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H. G., Prescott, A. R., and Watts, C. (2004) Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* **305**: 1153-1157.

Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., and de Waal, Malefyt R. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* **8**: 950-957.

Wright, E. K., Goodart, S. A., Growney, J. D., Hadinoto, V., Endrizzi, M. G., Long, E. M., Sadigh, K., Abney, A. L., Bernstein-Hanley, I., and Dietrich, W. F. (2003) Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr Biol* **13**: 27-36.

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. (1990) CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-1433.

Xu, L. G., Wang, Y. Y., Han, K. J., Li, L. Y., Zhai, Z., and Shu, H. B. (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**: 727-740.

Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X. D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejaska, K. E., and Eissa, N. T. (2007) Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**: 135-144.

Yates, R. M. and Russell, D. G. (2005) Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* **23**: 409-417.

Yoneyama, M. and Fujita, T. (2007) Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* **282**: 15315-15318.

Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., and Fujita, T. (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**: 2851-2858.

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

Zamboni, D. S., Kobayashi, K. S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E. M., Vance, R. E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Flavell, R. A., Dietrich, W. F., and Roy, C. R. (2006) The Bir1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection. *Nat Immunol* **7**: 318-325.

Zweigner, J., Schumann, R. R., and Weber, J. R. (2006) The role of lipopolysaccharide-binding protein in modulating the innate immune response. *Microbes Infect* **8**: 946-952

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Norbert Suttorp, Direktor der Medizinischen Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, für die große Unterstützung, die ich von ihm bei meinen Forschungsarbeiten erfahren habe. Durch ihn sowie durch meinen früheren Doktorvater Prof. Dr. Ralf Schumann, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité – Universitätsmedizin Berlin, habe ich meine Freude an der Wissenschaft entdeckt und weiter vergrößern können.

Herzlich danken möchte ich den Doktoranden und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe sowie den vielen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin. Vor allem die enge Zusammenarbeit und die konstruktiven Diskussionen mit Dr. Julia Eitel und Vincent van Laak haben sehr wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Den ehemaligen und derzeitigen technischen Angestellten Kerstin Möhr, Jaqueline Hellwig und Doris Stoll danke ich für ihr ausgezeichnetes experimentelles Zuarbeiten.

Ich danke den Kooperationspartnern PD Dr. T Wolff, PD Dr. A. Flieger, Dr. S. Rothenburg, Prof. Dr. T. Chakraborty und Dr. Guido Heine für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfestellungen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Jürgen Manchot-Stiftung danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich zudem bei meinen Eltern für die moralische Unterstützung sowie das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

# Eidstattliche Erklärung

§4 Abs. 3 (k) Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift