

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks- Makrophagen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Philipp Oldemeier
aus München
2021

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Ködel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Eberle
PD Dr. Stefan Kastenbauer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 18.02.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Klinische Relevanz von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
1.2	Pathogenese von Pneumokokkenerkrankungen in Abhängigkeit von Virulenzfaktoren	1
1.2.1	Pneumolysin als zentraler Virulenzfaktor	2
1.2.2	Kapselpolysaccharid und Pneumokokkenzellwandbestandteile als Virulenzfaktoren mit immunostimulatorischen Eigenschaften.....	3
1.2.3	RNA als immunogener Bestandteil von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	4
1.3	Interaktion von Bakterien und Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunität mit „Wächterfunktion“	4
1.3.1	Anpassung des Makrophagen-Phänotyp durch Polarisation	5
1.3.2	Erkennung von Pathogenen durch Makrophagen via „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ und „Mustererkennungsrezeptoren“	6
1.3.3	Zelltodformen von Makrophagen bei bakteriellen Erkrankungen	7
1.4	Toll-like Rezeptoren.....	8
1.4.1	Toll-Like Rezeptoren bei der Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.4.2	Signalwege.....	11
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material.....	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Kultivierung muriner Knochenmarks-Makrophagen	14
2.2.2	Das Stimulationsprotokoll	17
2.2.3	Test zum Nachweis von Pneumolysin durch Hämolyseaktivität	18
2.2.4	Messverfahren.....	18
2.2.5	Statistische Analyse	20
3	Ergebnisse.....	21

3.1	Die Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen	21
3.1.1	Die Rolle des Adaptermoleküls MyD88 bei der Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen	21
3.1.2	Die Rolle endosomaler Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen	23
3.2	Charakterisierung der ausschlaggebenden Toll-Like-Rezeptoren bei der Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen.....	24
3.3	Unterschiedliche Bedeutung von Toll-Like-Rezeptoren bei der Aktivierung von Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen.....	26
3.3.1	Unterschiede bei der Aktivierung muriner Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen	26
3.3.2	Toll-like Rezeptor Profil bei der Erkennung unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen durch murine Knochenmarks-Makrophagen.....	28
3.4	Mögliche Ursachen für unterschiedliche Aktivierung von murinen Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen	31
3.4.1	Bedeutung von Pneumolysin für die Makrophagen-Reaktion bei Exposition mit <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
3.4.2	Weitere mögliche Ursachen für Unterschiede in der Toll-Like-Rezeptor-abhängigen Makrophagenaktivierung durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen.....	35
4	Diskussion.....	37
4.1	Toll-Like-Rezeptor-Profil bei der Erkennung von <i>Streptococcus pneumoniae</i> D39.....	37
4.2	Toll-Like-Rezeptor-Profil bei der Erkennung unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen.....	38
4.3	Einfluss der Pneumolysin-Produktion von <i>Streptococcus pneumoniae</i> auf Knochenmarks-Makrophagen	39
4.4	Mögliche Bedeutung des PLY-, Lipoprotein- und RNA-Gehalts für die Unterschiede in der immunstimulatorischen Aktivität einzelner Pneumokokken-Serotypen	41
5	Zusammenfassung	44
6	Ausblick	46
7	Anhang	47
7.1	Medien und Lösungen	47

7.2	Verbrauchsmaterialien	49
7.3	Technische Geräte und Arbeitsmaterialien	50
7.4	Verwendete Kits	51
7.5	Chemikalien.....	52
8	Literaturverzeichnis.....	53
9	Danksagung	66
10	Eidesstattliche Versicherung.....	67

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz von *Streptococcus pneumoniae*

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokkus) ist ca. 140 Jahre nach seiner Erstbeschreibung durch Pasteur und Sternberg weltweit immer noch ein klinisch relevantes Pathogen und häufiger Verursacher schwerer Krankheitsbilder wie beispielsweise einer Meningitis, Sepsis und Pneumonie (Drijkoningen und Rohde 2014). Die Prognose dieser Krankheitsbilder ist auch heute weiterhin als ernst zu bewerten (Geno et al. 2015; Feldman und Anderson 2016). Schätzungen der WHO gehen von weltweit jährlich 1,6 Millionen Toten durch Pneumokokkenerkrankungen aus (WHO 2007). Die akute Pneumokokkenmeningitis beispielsweise weist eine Sterblichkeit von bis zu 17% auf (Buchholz et al. 2016; Hasbun et al 2017). Über 30% der Überlebenden leiden zudem unter schweren neurologischen Folgeschäden wie Hörverlusten, kognitiven Einschränkungen bis hin zu Parästhesien und Paralysen (Hirst et al. 2008; Koedel et al. 2010b). Bedeutend für die Klinik ist die Tatsache, dass der Verlauf und die Schwere von Pneumokokken-Erkrankung vom Serotyp abhängig sind (Briles et al. 1992; Weinberger et al. 2010; Seyoum et al. 2011). Es sind bisher über 90 Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* bekannt (Geno et al. 2015), deren Einteilung anhand der unterschiedlichen Kapselpolysaccharide vorgenommen wird (Geno et al. 2015). Die einzelnen Serotypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Virulenz (van der Poll und Opal 2009). So existieren beispielsweise nicht-invasive Stämme, welche zumeist als Kommensalen die oberen Atemwege des Menschen besiedeln sowie virulente Stämme, welche zur Pathogenität befähigt sind und oben genannte Krankheitsbilder verursachen können (van der Poll und Opal 2009). Neben der unterschiedlichen Pathogenität einzelner Serotypen gelten auch wirtsabhängige Faktoren wie beispielsweise ein Alter unter fünf oder über 65 Jahren, genetische Faktoren, Immunsuppression, Schwächung der Barrieren der Wirtsabwehr durch beispielsweise vorangegangene Infektionen oder Rauchexposition als Risikofaktoren für die Entstehung von Pneumokokkenerkrankungen (van de Beek et al. 2016).

1.2 Pathogenese von Pneumokokkenerkrankungen in Abhängigkeit von Virulenzfaktoren

Entscheidend für die Pathogenität von Pneumokokken ist das sogenannte Virulom, welches ein vielfältiges Spektrum an Virulenzfaktoren, wie beispielsweise Pneumolysin (siehe **1.2.1**) oder diverse Bakterienbestandteile (siehe **1.2.2**), darstellt (van der Poll und Opal 2009). Virulenzfaktoren spielen bei der Besiedelung von Gewebe, beim Überleben in der Blutbahn sowie bei der Invasion mit Überwindung der Wirtsbarrieren eine entscheidende Rolle (van der Poll und Opal 2009; van der Beek et al. 2016). Gelingt es dem Bakterium, ausgehend von einer Besiedelung epithelialer Gewebe, die Barrieren der Wirts-Abwehr, wie beispielsweise die Schleimhäute der oberen Atemwege, zu überwinden und in das Gewebe einzudringen, können sich oben genannte Pneumokokken-Erkrankungen entwickeln

(Kadioglu et al. 2008; van de Beek et al. 2016). Beispielsweise gelangen Pneumokokken bei der Pneumokokkenmeningitis entweder direkt über eine Infektion angrenzender Strukturen oder über eine hämatogene Aussaat ausgehend von Epithelien des Nasopharynx in den Subarachnoidalraum (Koedel et al. 2010b). Dort angekommen können sie sich rasch in großer Zahl vermehren (Koedel et al. 2010b). Aufgrund verschiedener Stressoren wie beispielsweise fehlender Nährstoffe oder antibiotischer Behandlung sterben die eingedrungenen Bakterien in hoher Zahl ab und setzen dadurch eine große Menge bakterieller Bestandteile frei (van der Beek et al. 2016). Durch Interaktion von Bakterienbestandteilen sowie Komponenten des Immunsystems (siehe **1.3** und **1.4**) kommt es zu ausgeprägten Entzündungsreaktionen, welche schwere Gewebeschäden hervorrufen und letale Verläufe und Komorbiditäten nach sich ziehen (Koedel et al. 2010a). Hierbei spielen verschiedene Mechanismen der Immunaktivierung (siehe **1.3** und **1.4**) sowie Formen des Zelltodes (siehe **1.3.3**) eine entscheidende Rolle (van der Beek et al. 2016). Diese Mechanismen müssen daher kontrolliert initiiert, aufrechterhalten und anschließend wieder beendet werden, um oben genannte Folgeschäden durch eine fehlgeleitete und überschießende Immunaktivierung zu verhindern (Pasparakis et al. 2015).

1.2.1 Pneumolysin als zentraler Virulenzfaktor

Ein zentraler Virulenzfaktor von *Streptococcus pneumoniae* ist das Toxin Pneumolysin (PLY) (Berry et al. 1989). Eine wichtige Eigenschaft von PLY ist die Vermittlung von Zelltod (Bischofberger et al. 2012; Jorgensen et al. 2017). Pneumolysin gehört der Gruppe der porenbildenden Toxine (PFT) an, welche eine große Klasse bakterieller Toxine darstellen (Gonzalez-Juarbe et al. 2015). Es ist bekannt, dass PFT auf unterschiedlichen Wegen zum Zelltod führen können (Tveten 2005; Bischofberger et al. 2012). In hohen Konzentrationen induzieren PFTs durch Bildung von Poren in Zellmembranen Nekrose (Bischofberger et al. 2012). In niedrigeren Konzentrationen werden durch Pneumolysin Formen des programmierten Zelltodes wie Nekroptose (auch Pyronekrose genannt) (Gonzalez-Juarbe et al. 2015), Pyroptose (Kim et al. 2015a) oder Apoptose (Marriott et al. 2006; Bewley et al. 2011; Bewley et al. 2014) induziert (siehe **1.3.3**). Nekroptose scheint dabei eine grundlegende Form des Zelltodes bei Makrophagen zu sein, welche durch sublytische-, jedoch bereits letale-Konzentrationen von PFT ausgelöst wird (Gonzalez-Juarbe et al. 2015; Gilley et al. 2016). Allerdings spielen bei der Entstehung und dem Verlauf von Pneumokokken-Erkrankungen neben den lytischen Eigenschaften auch immunostimulatorische Eigenschaften von PLY (Martner et al. 2008; Hoegen et al. 2011) sowie durch PLY vermittelte Evasionsmechanismen (Paton et al. 1984; Feldman et al. 1990; Hirst et al. 2004) eine wichtige Rolle (Kirkham et al. 2006). Pneumolysin aktiviert das NLRP3-Inflammasom (McNeela et al. 2010) und wurde somit als Stimulus für die Freisetzung des pro-inflammatorischen Interleukins 1 β (IL-1 β) identifiziert (Hoegen et al. 2011). Inflammasomen wie das NLRP3-Inflammasom sind Multiproteinkomplexe, welche im Zytosol von Immunzellen als Reaktion auf eingedrungene Pathogene

gebildet werden und in der Folge Enzyme aus einer spezifischen Familie von Zysteinproteinasen, die sogenannten Caspasen, aktivieren können, welche zur Maturation und Freisetzung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 β führen (Bergsbaken et al. 2009; McNeela et al. 2010; Hoegen et al. 2011; Broz et al. 2016; Kim et al. 2015a). Eine weitere wichtige Rolle für die Freisetzung von IL-1 β spielt das zytosolische gelegene Protein Gasdermin D, welches ebenfalls durch Caspasen aktiviert wird, anschließend oligomerisiert und dann als Komplex Poren in der Zellmembran formt, welche eine Freisetzung von IL-1 β ermöglichen (He et al. 2015; Evavold et al. 2017). Durch PLY wird des Weiteren die Adhäsion an Epithelien des Wirtsorganismus erleichtert und der Immunantwort desselben entgegengewirkt (Hirst et al. 2004). Ein weiterer Effekt von PLY ist die Bindung von Komplementfaktoren und die damit einhergehende Verringerung der Opsonierung des Bakteriums (Paton et al. 1984). Des Weiteren verringert PLY den Zilienschlag respiratorischer Epithelien (Feldman et al. 1990) und induziert in humanen neutrophilen Granulozyten die Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) (Martner et al. 2008). In mehreren in vivo Modellen mit PLY-defizienten Mutanten von *Streptococcus pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der PLY-Produktion mit einer verminderten Virulenz und Wachstum des Bakteriums vergesellschaftet ist (Berry et al. 1989; Jim et al. 2016). Analog hierzu zeigte sich in klinischen Untersuchungen der Pneumokokkenmeningitis eine erhöhte Sterblichkeit bei Patientin mit hohen Pneumolysin-Konzentrationen im Liquor (Wall et al. 2012). Ebenso zeigte sich in klinischen Untersuchungen sowie in verschiedenen in-vivo-Modellen der Meningitis eine erhöhte Zahl neuronaler Schäden in Abhängigkeit von Pneumolysin (Reiss et al. 2011; Wippel et al. 2013). PLY ist daher sowohl an der Entstehung als auch dem Verlauf von Pneumokokken-Erkrankungen entscheidend beteiligt (Rubins et al. 1995; Hirst et al. 2008).

1.2.2 Kapselpolysaccharid und Pneumokokkenzellwandbestandteile als Virulenzfaktoren mit immunostimulatorischen Eigenschaften

Einen weiteren Virulenzfaktor stellt die Polysaccharid-Kapsel von *Streptococcus pneumoniae* dar (Briles et al. 1992). Ein wichtiger von der Kapsel vermittelter Effekt ist die Evasion der Phagozytose des Bakteriums (Hyams et al. 2010). Anhand der Kapselstruktur werden sowohl Impfstoffe entwickelt, als auch wie bereits erwähnt die Einteilung in die bisher über 90 bekannten Serotypen vorgenommen (Geno et al. 2015).

Zudem sind Pneumokokken-Zellwandbestandteile (PCW) wie Peptidoglycan (PGN) (Davis et al. 2011) oder Lipoteichonsäuren (LTA) (Heß et al. 2017) und Lipopeptide/Lipoproteine (LPs) (Briles et al. 2000; Palaniappan et al. 2005; Gisch et al. 2013; Tomlinson et al. 2014) von Bedeutung. Sie werden durch das von *Streptococcus pneumoniae* exprimierte Autolysin LytA freigesetzt (Mellroth et al. 2012) und sind durch spezifische Interaktionen mit Rezeptoren des Immunsystems (siehe **1.3.2**) in der Lage, eine Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder Interleukin 6 (IL-6) aus Immunzellen zu

induzieren und tragen so zur Pathogenese von Pneumokokkenerkrankungen bei (Tuomanen et al. 1985; Riesenfeld-Orn et al. 1989; Heumann et al. 1994).

Besonders ist das Oberflächen-gekoppelte Lipoprotein Pneumococcal surface adhesin A (PsaA) zu nennen, welches entscheidend an der Virulenz beteiligt ist, indem es die Adhäsion an Wirtszellen – und damit den ersten Schritt in der Pathogenese von Pneumokokkenerkrankungen - ermöglicht (Rajam et al. 2008).

1.2.3 RNA als immunogener Bestandteil von *Streptococcus pneumoniae*

Neuere Forschungen zeigen, dass analog zu extrazytoplasmatischen Zellwandbestandteilen auch intrazelluläre Komponenten von Bakterien eine starke Immunantwort induzieren können und somit zur Krankheitsentstehung beitragen (Eigenbrod und Dalpke 2015). Hier ist neben der bakteriellen DNA auch bakterielle RNA zu nennen, welche zur durch Pneumokokken vermittelte Immunogenität beizutragen scheint (Oldenburg et al. 2012; Eigenbrod et al. 2012; Eigenbrod und Dalpke 2015; Krüger et al. 2015; Spelmink et al. 2016). Erste Vermittler einer solchen Immunantwort sind Makrophagen als eine der zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems (Janeway, JR und Medzhitov 2002).

1.3 Interaktion von Bakterien und Makrophagen als Zellen der angeborenen Immunität mit „Wächterfunktion“

Makrophagen (M ϕ) sind Immunzellen myeloider Abstammung, welche sich während der Ontogenese aus verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen entwickeln (Murray et al. 2014; Varol et al. 2015). Sie zeichnen sich unter anderem durch die erstmals 1883 von Elie Metchnikoff publizierte intensive Phagozytoseaktivität aus, welche für sie namensgebend ist (Cavaillon 2011). Sie sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und übernehmen im gesamten Organismus ein breites Aufgabenspektrum, wobei eine Kernfunktion die Vermittlung von Immunität und Infektabwehr ist (Franken et al. 2016). Makrophagen finden sich unter anderem entlang der Basalmembranen von Lymph- und Blutgefäßen, in den Epithelien der Haut sowie im Bereich der Milzsinus, wo ein breiter Oberflächenkontakt herrscht und sie Ihre Funktion als „Wächterzellen“ wahrnehmen können (Franken et al. 2016). Makrophagen sind in der Lage, eingedrungene Pathogene (wie beispielsweise Pneumokokken) anhand von sogenannten „Pathogen-assoziierten molekularen Mustern“ (PAMPs) mit Hilfe diverser „Mustererkennungsezeptoren“ (PRRs), welche sich auf ihrer Zelloberfläche und/oder in Endosomen befinden, zu erkennen (siehe **1.3.2**). Die Interaktion von PAMPs und PRRs führt zur Zellaktivierung und/oder Phagozytose der Pathogene (Liddiard et al. 2011; Akira et al. 2013; Cole et al. 2014; Ley et al. 2016;). Neben der Phagozytose werden durch Makrophagen, um eingedrungene Pathogene suffizient bekämpfen zu können, eine Vielzahl unterschiedlicher antimikrobieller Effektormoleküle, beispielsweise Defensine und reaktive Sauerstoffspezies, produziert (Franken et al. 2016). Zudem setzen Sie pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine frei, welche unter anderem

zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen an den Ort der Infektion führen (Kim et al. 2015). Die eingewanderten Monozyten entwickeln sich in der Folge zu inflammatorischen Makrophagen, welche ebenso entzündungsfördernde Mediatoren freisetzen (Schwartz et al. 2012; Verschoor et al. 2012; Gordon et al. 2014) (siehe **1.3.1**). Neutrophile Granulozyten haben eine begrenzte Lebensdauer von meist nur wenige Stunden und gehen, nachdem Sie aus dem Knochenmark in die Blutbahn und anschließend an den Infektionsort gelangt sind, durch Apoptose zugrunde und werden von Makrophagen aus ihrer Nachbarschaft abgeräumt, ein Prozess namens Efferozytose (Briken 2012; Kolaczowska et al. 2013). Durch die Efferozytose ändert sich das Freisetzungsmuster der Zytokine in Richtung vorwiegend anti-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise transformierender Wachstumsfaktor- β (Ariel et al. 2012). Daraufhin bilden sich vermehrt Makrophagen mit entzündungshemmenden Eigenschaften, welche die Wundheilung fördern können sowie ein Ende der Entzündungsreaktion einleiten (Sica et al. 2012; Akira et al. 2013; Wynn et al. 2016; Minutti et al. 2017). Somit scheinen Makrophagen entscheidend dazu beizutragen, dass (i) bei einer Infektion umgehend eine angeborene Immunreaktion ausgelöst wird, (ii) diese Immunreaktion streng reguliert abläuft und (iii) nach der Beseitigung der Erreger kontrolliert unter wundheilenden Maßnahmen beendet wird (Cole et al. 2014).

1.3.1 Anpassung des Makrophagen-Phänotyp durch Polarisierung

Makrophagen sind in der Lage flexibel auf unterschiedliche Stimuli wie beispielsweise auf eingedrungene Mikroorganismen oder Zustandsänderungen in der Gewebemöostase in ihrer Umgebung zu reagieren, indem Sie selbige über spezielle Rezeptoren wahrnehmen (siehe **1.3.2**) und ihren Phänotyp sowie ihre Funktion dann adäquat an die unterschiedlichen Herausforderungen anpassen können (Adams und Hamilton 1984; Liddiard et al. 2015; Murray 2017; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Dazu verfügen Sie über ein genetisches Aktivierungsprogramm (Nau et al. 2002), welches unter anderem exprimierbare Zytokine wie IL-1 β oder Interleukin 6 (IL-6), Zytokinrezeptoren, Chemokine, Chemokinrezeptoren, Enzyme zur Generierung antimikrobieller Substanzen und kostimulatorische Moleküle beinhaltet (Benoit et al. 2008). Bei Aktivierung der Makrophagen durch einen Stimulus wird aus dem genetischen Aktivierungsprogramm ein bestimmtes Expressionsmuster ausgewählt, dieser Prozess ist als Polarisierung bekannt (Labonte et al. 2014; Murray 2017). Die Polarisierung ist ein plastischer Prozess, welcher es Makrophagen ermöglicht sich flexibel an die vorherrschende Situation anzupassen (Murray 2017). Dabei gibt es zwei extreme Endpunkte in einem Spektrum an möglichen Zuständen: Zum einen den klassisch aktivierten pro-inflammatorischen Makrophagen, welcher durch oben genannte Mechanismen (siehe **1.3**) in der Lage ist, eingedrungene Pathogene effizient zu bekämpfen (Murray 2017; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Dieser entwickelt sich unter anderem durch die Erkennung von eingedrungenen

Mikroorganismen durch PRRs und/ oder durch Stimulation mit entzündungsfördernden Zytokinen wie beispielsweise IFN- γ oder Koloniestimulierenden Faktoren (CSF) (Murray 2017; Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Um eine dauerhafte Entzündungsreaktion und damit einhergehende Gewebeschäden zu verhindern, steht am anderen Ende des Spektrums als zweites Extrem der alternativ polarisierte, entzündungshemmende/ immunmodulatorische Makrophage, welcher sich unter anderem durch Stimulation mit IL-4 und IL-13 entwickelt (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Durch die Freisetzung von hohen Konzentrationen anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder TGF- β kann er die Entzündungsreaktion modulieren und trägt zur Gewebsreparatur und zur Wiederherstellung der Homöostase bei (Shapouri-Moghaddam et al. 2018). Die Polarisierung stellt keinen dichotomen Prozess dar, sondern muss als dynamisches Geschehen mit Zwischenstufen betrachtet werden, welcher gut abgestimmt und ausgewogen ablaufen muss (Franken et al. 2016). Nur so kann die Entfernung und Bekämpfung von Pathogen ebenso wie die Reparatur von geschädigten Geweben nach Inflammation gewährleistet werden (Murray 2017; Shapouri-Moghaddam et al. 2018).

1.3.2 Erkennung von Pathogenen durch Makrophagen via „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ und „Mustererkennungsrezeptoren“

Ein erster Schritt zu einer effektiven Immunantwort ist die Erkennung spezifischer Muster, sogenannte „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ (PAMP) (Kumar et al. 2011; O'Neill et al. 2013). PAMPs repräsentieren hochkonservierte molekulare Strukturen, welche für das Überleben der Mikroorganismen unabkömmlich sind und zudem oft von großen Gruppen pathogener Mikroorganismen genutzt werden (Medzhitov und Janeway, JR 2000). Aufgrund kurzer Generationszeiten besitzen mikrobielle Pathogene die Eigenschaft, die von Ihnen exprimierten Proteine schnell zu verändern (Janeway, JR 1989). Da PAMPs hochkonservierte molekulare Strukturen darstellen, welche oben genannten Veränderungen nicht unterliegen, können Makrophagen somit eine sichere Fremd- und Selbsterkennung im Immunsystem gewährleisten (Janeway, JR 1989). Zudem kann über sogenannte „Vita-PAMPs“ zwischen lebenden- und toten-Bakterien unterschieden werden (Sander et al. 2011). Für die Erkennung von PAMPs sind keimbahnkodierte Rezeptoren, sogenannte „Mustererkennungsrezeptoren“ (PRR) zuständig (Medzhitov und Janeway, JR 2000). Diese befinden sich auf der Zelloberfläche sowie im Zellinneren von Immunzellen (Ley et al. 2016). Es sind fast 200 verschiedene solcher PRRs bei Makrophagen bekannt, welche neben PAMPs Auskunft über den Zustand des umliegenden Gewebes, den umgebenden Matrixkomponenten, den Zustand von in der Nähe befindlichen Zellen mit Formen des Zelltodes, über in der Nähe befindlichen Antikörper, eigene Moleküle sowie Zytokine und Chemokine in der Umgebung geben können (Ley et al. 2016). Verschiedene PRRs kommunizieren untereinander um eine effektive Immunantwort zu gewährleisten (Kawai et al. 2011). Die am besten untersuchte Gruppe der PRR sind die Toll-like Rezeptoren (TLRs),

welche auch an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch M ϕ beteiligt sind (Koppe et al. 2012) (Abbildung 1).

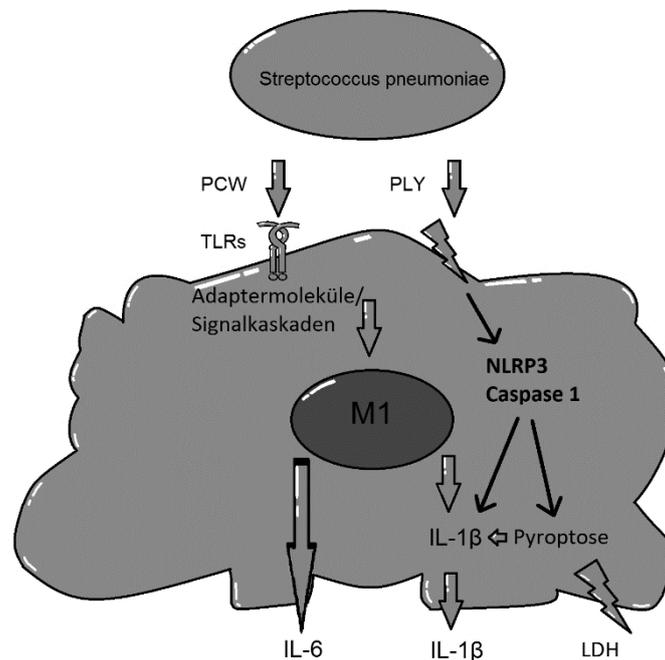


Abbildung 1 Unterschiedliche Stimuli und Funktion der Makrophagen: Einfluss von Pneumokokken-Zellwandbestandteilen (PCW) und Pneumolysin (PLY) von *Streptococcus pneumoniae* auf Knochenmarks-Makrophagen (M ϕ). *Streptococcus pneumoniae* setzt mittels LytA Zellwandbestandteile (PCW) frei. Diese werden von TLRs erkannt und initiieren über die Bindung von Adaptermolekülen wie MyD88 oder TRIF intrazelluläre Signalkaskaden, welche zur Aktivierung des M ϕ führen. PLY verursacht Schäden an Zellmembranen, vermittelt Zelltod und führt zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Der aktivierte M ϕ ist in der Lage Pathogene zu bekämpfen, unter anderem durch die Produktion und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder IL-1 β .

1.3.3 Zelltodformen von Makrophagen bei bakteriellen Erkrankungen

Prinzipiell kann Zelltod in zwei Kategorien, die akzidentellen und die regulierten Formen, unterteilt werden (Stephenson et al. 2016; Wallach et al. 2016). Akzidentelle Zelltodformen treten passiv ohne Beteiligung spezifischer zellulärer Signalwege auf (Stephenson et al. 2016). Im Gegensatz dazu laufen regulierte Zelltodformen nach klar definierten Programmen ab und können in Abhängigkeit von den daran mitwirkenden Caspasen (Casp), in weitere Subgruppen untergliedert werden, nämlich (i) die Casp8- oder Casp9-abhängige Apoptose, welche als immunologisch inerte Form des regulierten Zelltodes angesehen wird, (ii) die Casp1- oder Casp11/4/5-abhängige Pyroptose (Yuan et al. 2016; Jorgensen et al. 2017) sowie Casp-unabhängige, Rezeptor interagierende Proteinkinase (RIPK) RIPK1 und RIPK3-, sowie „mixed lineage kinase domain-like“ (MLKL)-vermittelte Nekroptose (oder Pyronekrose), welche lytisch und pro-inflammatorisch wirken (Pasparakis et al. 2015; Wallach et al. 2016). Formen des programmierten-lytischen Zelltodes wie Nekroptose, Pyroptose können als effiziente Abwehr gegen eingedrungene Pathogene angesehen werden, indem sie immobilisierend auf

Pathogene wirken sowie über streng regulierte Signalwege weitere Immunzellen zur Unterstützung und Beseitigung der Inflammation an den Ort der Entzündung rekrutieren (Pasparakis et al. 2015; Jorgensen et al. 2017).

1.4 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Typ-I transmembranäre Proteine, welche als PRRs des Immunsystems unter anderem von Makrophagen exprimiert werden (Medzhitov et al. 1997). Es sind derzeit 10 humane und 12 murine Toll-like Rezeptoren bekannt, nämlich die membranständigen TLRs 1, 2, 5, 6 und 10, die endosomal gelegenen TLRs 3, 7, 8, 9, 11, 12 und 13, sowie den sowohl membranständig- als auch endosomal vorkommenden TLR 4 (Nardo 2015). Mensch und Maus unterscheiden sich im Expressionsmuster ihrer Toll-like Rezeptoren: Die Toll-like Rezeptoren 11, 12 und 13 werden nur bei der Maus als funktionelle Rezeptoren exprimiert, während Sie beim Mensch als Pseudogen vorliegen, TLR 10 ist nur beim Mensch funktional, während er bei der Maus als Pseudogen vorliegt, zudem ist TLR 8 bei der Maus weitgehend nicht funktional (Ariffin und Sweet 2013). Jeder Toll-like Rezeptor erkennt spezifische Liganden (Tabelle 1). Auch bei der Ligandenspezifität existieren Unterschiede zwischen humanen und murinen Toll-like Rezeptoren (Jurk et al. 2002). So aktiviert beispielsweise die Verbindung Resiquimod den humanen TLR 8, nicht jedoch den murinen TLR 8 (Jurk et al. 2002). Für die Erkennung von Liganden ist die N-terminale Ektodomäne der TLRs zuständig (Nardo 2015).

Tabelle 1 Toll-like Rezeptoren und Ihre Liganden: *Toll-like Rezeptoren mit jeweiliger Lokalisation, Vorkommen beim Menschen und Maus, sowie Ihre Liganden. Tabelle nachempfunden (Nardo 2015).*

Toll-like Rezeptor	Lokalisation	Spezies	Liganden
TLR 1	Membranständig	Mensch/Maus	Lipopeptide
TLR 2	Membranständig	Mensch/Maus	Lipopeptide, Zymosan, Mannan, Peptidoglycan, Lipoteichonsäure
TLR 3	Endosomal	Mensch/Maus	Virale dsRNA
TLR 4	Membranständig/endosomal	Mensch/Maus	Lipopolysaccharid
TLR 5	Membranständig	Mensch/Maus	Flagellin
TLR 6	Membranständig	Mensch/Maus	Lipopeptide, Lipoteichonsäure, Zymosan
TLR 7	Endosomal	Mensch/Maus	Virale und bakterielle ssRNA
TLR 8	Endosomal	Mensch/Maus	Virale und bakterielle ssRNA (bei Maus nicht funktional)
TLR 9	Endosomal	Mensch/Maus	Virale und bakterielle DNA
TLR 10	Membranständig	Mensch	Bisher unbekannt
TLR 11	Endosomal	Maus	Profilin und Flagellin
TLR 12	Endosomal	Maus	Profilin
TLR 13	Endosomal	Maus	Bakterielle 23s rRNA

1.4.1 Toll-Like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae*

Die Beteiligung von TLR 2 an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* wurde erstmals durch Versuche mit CD-14 exprimierenden Fibroblasten des Hamster-Ovars (CHO/CD14) nachgewiesen, welche mit humanem TLR 2 transfiziert wurden und auf die Stimulation mit Hitze-getöteten Pneumokokken mit einer NF- κ B abhängigen Expression von CD25 reagierten (Yoshimura et al. 1999). Auch in vivo ist die Beteiligung des TLR 2 bei der Erkennung und Bekämpfung von *Streptococcus pneumoniae* von essentieller Bedeutung, was anhand von Pneumokokken infizierten Mäusen gezeigt wurde, welche eine gesteigerte TLR 2 mRNA Expression zeigten und bei einer TLR 2-Defizienz stärkere klinische Symptome aufwiesen als ihr Wildtyp Pendant (Koedel et al. 2003; Echchannaoui et al. 2002). Zunächst wurde LTA als wichtigster Ligand für TLR 2 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* betrachtet (Schroder et al. 2003). Neuere Untersuchungen zur Struktur und Immunogenität von Pneumokokken-LTA zeigen jedoch ein starkes TLR 2 vermitteltes proinflammatorisches Potential von LPs (Gisch et al. 2013; Tomlinson et al. 2014). Somit können LPs als Ligand für TLR 2 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* betrachtet werden (Gisch et al. 2013; Tomlinson et al. 2014). Bei der Erkennung von PCW kooperiert der TLR 2 mit dem Ko-Rezeptor CD 14 (Yoshimura et al. 1999; Han et al. 2003), dem Adaptermolekül Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LPB) (Schroder et al. 2003) sowie den Toll-like Rezeptoren 1 (Takeuchi et al. 2002) und 6 (Takeuchi 2001) bei der Erkennung von Lipopeptiden. Der Toll-like Rezeptor 4 ist der primäre Rezeptor für die Erkennung von LPS gram-positiver Bakterien (Poltorak et al. 1998; Hoshino et al. 1999). Die Rolle von PLY als potentieller Ligand des TLR 4 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wurde gezeigt, dass rekombinantes PLY bei peritonealen Makrophagen TLR 4 abhängig eine NF- κ B Translokation induziert (Malley et al. 2003). Eine TLR 4 abhängige IL-8 sowie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) Freisetzung wurde auch bei Versuchen mit CD14 und TLR 4 transfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) sowie alveolaren murinen Makrophagen (MH-S) beobachtet (Dessing et al. 2009). McNeela et al. stellten fest, dass Endotoxin-freies PLY allein keine Interleukinfreisetzung bei murinen dendritischen Zellen und Knochenmarks-Makrophagen induziert (McNeela et al. 2010). Zwar kam es in Kombination mit durch Hitze getötete D39 Pneumokokken zu einer verstärkten Interleukinfreisetzung bei beiden Zellarten, dieser Effekt war jedoch unabhängig von TLR 4 (McNeela et al. 2010). TLR 9 transfizierte HEK-Zellen reagieren mit einer Aktivierung von NF- κ B bei Stimulation mit aufgereinigter genomischer DNA von *Streptococcus pneumoniae* (Mogensen et al. 2006). Auch bakterielle RNA wurde als wichtiger TLR-Ligand bei der Erkennung Gram-positiver Bakterien identifiziert (Deshmukh et al. 2011; Eigenbrod et al. 2012). Hierbei fungiert RNA als ein Vita-PAMP (Sander et al. 2011). Essentiell für die Funktion der endosomalen, Nukleinsäure erkennenden TLRs ist das Protein Unc93B1, welches als wichtiger Cofaktor fungiert und nach neueren Erkenntnissen zur Stabilisierung sowie zum Schutz vor dem Abbau von TLR-

Proteinen beiträgt (Tabeta et al. 2006; Eigenbrod und Dalpke 2015; Pelka et al. 2018). TLR 7, 8 und 13 erkennen bakterielle RNA (Nardo 2015). Hierbei ist besonders der endosomale Rezeptor TLR 13 zu nennen, welcher als Sensor für 23S rRNA des Gram-positiver Bakteriums *Staphylococcus aureus* bei Knochenmarks-Makrophagen identifiziert wurde (Oldenburg et al. 2012).

Die Erkennung von Pneumokokken durch Toll-like Rezeptoren scheint auf der konzertierten Aktivität unterschiedlicher TLRs zu basieren (Lee et al. 2007; Klein et al. 2008). Untersuchungen an Peritonealen-Makrophagen, welche aus Gen-defizienten Mäusen gewonnen wurden, welche einzelne sowie kombinierte TLR-Ausfälle hatten, zeigten bei Defizienzen einzelner TLRs kaum Effekte. Bei kombinierten Defizienten von TLR 2 und TLR 4 konnte hingegen eine verminderte Interleukinfreisetzung festgestellt werden. Analog zu den Zellkulturbefunden zeigten sich auch im Tiermodell der experimentellen Pneumokokken-Meningitis nur bei Mäusen mit kombinierten TLR 2 und TLR 4 Defizienzen eine reduzierte Zytokinfreisetzung im zentralen Nervensystem (Klein et al. 2008). Ähnliche Befunde wurden für TLR 2-,4- und 9-einfachdefiziente Zellen der Milz im Vergleich zu TLR 2/4- und 2/9-doppeldefizienten Zellen gefunden (Lee et al. 2007). Die Tatsache, dass bei in vivo Untersuchungen keine Unterschiede bei der Immunantwort auf *Streptococcus pneumoniae* zwischen TLR 2/4-doppeldefizienten und TLR 2/4/9-dreifachdefizienten Mäusen festzustellen war, verdeutlicht die wichtige Rolle der TLR 2 und 4 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* und spricht gegen eine essentielle Beteiligung von TLR 9 und bakterieller DNA (Klein et al. 2008).

1.4.2 Signalwege

Nach Bindung des Liganden durch Toll-like Rezeptoren folgt die Signaltransduktion ins Zellinnere über zwei zentrale Signalkaskaden (Nardo 2015) (**Abbildung 2**). Diese beinhalten zum einen die Verbindung der TLRs mit dem Adaptermolekül MyD88, zum anderen die Verbindung mit dem Adaptermolekül TRIF (Gay et al. 2011) (**Abbildung 2**). Eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung von *Streptococcus pneumoniae* nimmt dabei das Adaptermolekül MyD88 ein (Koedel et al. 2004). Das Adaptermolekül MyD88 ist für die Funktion aller Toll-like Rezeptoren, mit Ausnahme von TLR 3 essentiell (Gay et al. 2011). Zudem fungiert MyD88 als Adaptermolekül in der IL-1-Signalkaskade (Takeuchi and Akira 2002). MyD88-defiziente Mäuse zeigten bei Infektion mit Pneumokokken eine über 80%ige Reduktion der Liquorpleozytose im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen; bei TLR 2/4-doppeldefizienten Mäusen konnte lediglich eine 50%ige Reduktion beobachtet werden (Koedel et al. 2004; Klein et al. 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Beteiligung weiterer Toll-like Rezeptoren neben TLR 2 und TLR 4 sein. Die Blockade von Inflammasom-Komponenten, welche wie MyD88 für den IL-1-Signalweg entscheidend sind, führte ebenfalls zu einer reduzierten Immunantwort im Mausmodell bei Stimulation mit Pneumokokken (Hoegen et al. 2011). Eine zweite mögliche Erklärung für die beobachtete Reduktion der Liquorpleozytose ist demnach die Blockade von IL-1-

Signalwegen durch Abwesenheit von MyD88. Wie oben bereits erwähnt, interagieren alle TLRs außer TLR 3 mit dem Adapter MyD88 (Gay et al. 2011). TLR 3 interagiert zur Signaltransduktion mit dem Adapterprotein TRIF (Yamamoto et al. 2003). TLR 4 ist in der Lage sowohl mit MyD88 als auch mit TRIF zu interagieren (Yamamoto et al. 2003). Nach der Verbindung der Toll-like Rezeptoren mit MyD88, folgt als nächster Schritt der Signalkaskade die Interaktion von MyD88 mit den Interleukin-1 Rezeptor assoziierten Kinasen (IRAKs), IRAK 2 und IRAK 4, wodurch es zur Bildung von hochmolekularen Komplexen, den sogenannten Myddosomen kommt, welche in letzter Konsequenz den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren (Gay et al. 2011). Die Aktivierung von NF- κ B führt unter anderem zur Bildung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 (Pahl 1999) (**Abbildung 2**). Der Toll-like Rezeptor 4 nutzt zur Verbindung mit MyD88 das Adapterprotein MAL (Gay et al. 2011). Die bereits erwähnte Interaktion von TLR 3 oder 4 mit TRIF führt über mehrere Schritte zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF 3, was in letzter Konsequenz unter anderem zur Bildung von Interferon β (IFN- β) führt (Gay et al. 2011). Zur Interaktion mit TRIF nutzt TLR 4 den Adapter TRAM (Gay et al. 2011) (**Abbildung 2**).

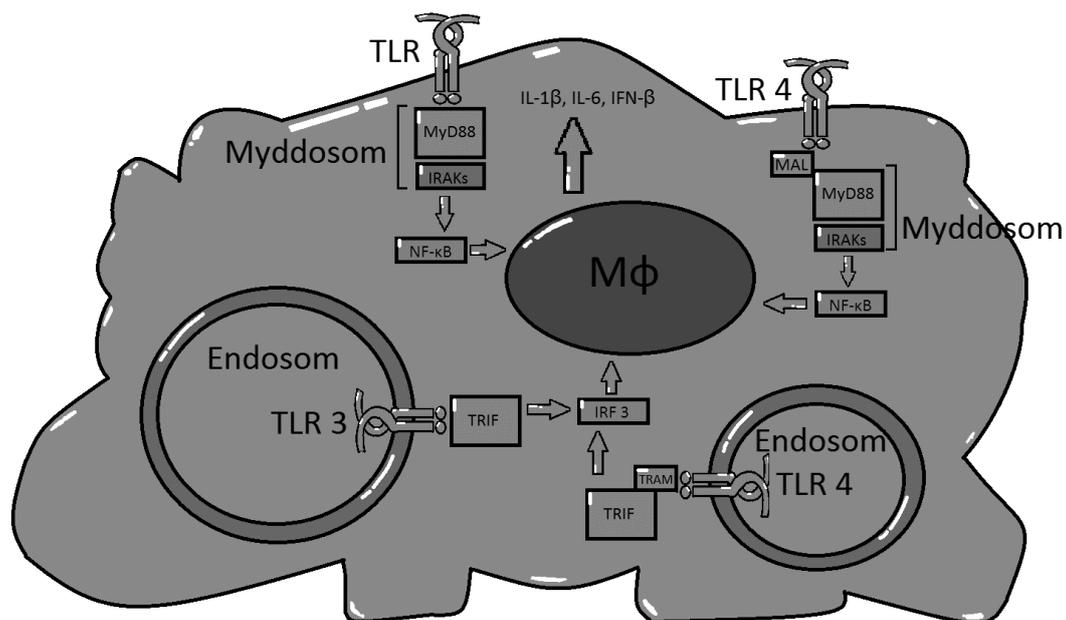


Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der zentralen Toll-like Rezeptor Signalwege: Alle TLRs außer TLR 3 nutzen das Adaptermolekül MyD88. TLR 3 nutzt den Adapter TRIF. TLR 4 ist in der Lage mittels beider Adaptermoleküle Signale zu transduzieren. Der MyD88 abhängige Signalweg endet mit der Aktivierung von NF- κ B. NF- κ B löst als Transkriptionsfaktor unter anderem die Produktion der Interleukine 1 β und 6 (IL-1 β , IL-6) aus. Der TRIF abhängige Signalweg aktiviert IRF 3. Hieraus resultiert die Produktion von Interferon β (IFN- β). Abbildung nachempfunden (Gay et al. 2011).

1.5 Ziele dieser Arbeit

Streptococcus pneumoniae ist ein wichtiger Verursacher schwerer Krankheitsbilder wie beispielsweise der Pneumokokkenmeningitis (van de Beek et al. 2016). Die Pathogenese sowie der Verlauf dieser Erkrankung werden entscheidend von der Immunreaktion im Subarachnoidalraum bestimmt (Koedel et al. 2010b). Durch unkontrollierte Vermehrung der Bakterien und die damit einhergehende Freisetzung großer Mengen an PAMPs kommt es in der Folge zu einer überschießenden Entzündungsreaktion, welche zu schweren Gewebeschäden mit Residuen oder letalen Verläufen führt (Koedel et al. 2010b). Toll-like Rezeptoren sind entscheidend an der Initiierung und Aufrechterhaltung dieser Immunreaktion beteiligt (Vijay 2018).

Bei Untersuchungen im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis fiel auf, dass MyD88-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Immunantwort (Koedel et al. 2004) im Vergleich zu TLR 2/4-doppeldefizienten Mäusen zeigten (Klein et al. 2008). Diese Beobachtung gibt einen Hinweis auf die Beteiligung weiterer Toll-Like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae*. Die Klärung dieser Frage war das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- (i) Überprüfung der Reproduzierbarkeit der oben genannten Erkenntnisse aus dem Mausmodell in der Makrophagen-Kultur sowie Charakterisierung der Rolle endosomaler Toll-Like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen.
- (ii) Charakterisierung der Rolle des Toll-like Rezeptors 13 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen.
- (iii) Überprüfung von Pathogenitätsunterschieden unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen in der Makrophagen-Kultur sowie Charakterisierung der Rolle der Toll-like Rezeptoren 2 und 13 bei der serotypenübergreifenden Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen.
- (iv) Screening auf mögliche Gründe unterschiedlicher Pathogenität verschiedener Pneumokokken-Serotypen (mit besonderem Fokus auf PLY).

2 Material und Methoden

2.1 Material

Listen aller hergestellten Medien und Lösungen (siehe **7.1**) sowie verwendeter Verbrauchsmaterialien (siehe **7.2**), Technischer Geräte und Arbeitsmaterialien (siehe **7.3**), Kits (siehe **7.4**) und Chemikalien (siehe **7.5**) befinden sich im Anhang.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung muriner Knochenmarks-Makrophagen

Makrophagen können unter definierten Zellkulturbedingungen aus Knochenmark-Vorläuferzellen durch Stimulation mit M-CSF angezüchtet werden (Bradley und Metcalf 1966; van Furth et al. 1972; Das et al. 1980; Stanley 2009). Die Kultivierung der murinen Knochenmarks-Makrophagen (BMDMs) erfolgte nach einem etablierten Protokoll unserer Arbeitsgruppe (Hoegen et al. 2011). Dabei wurden die Zellen zwischen den einzelnen Schritten bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert, sowie das Zellwachstum lichtmikroskopisch bei 50- und 200-facher Vergrößerung kontrolliert.

2.2.1.1 Isolierung der Zellen

Die für die Kultivierung von BMDMs benötigten Knochenmarkszellen wurden aus den Femora von (i) C57BL6/n Wildtyp Mäusen, sowie (ii) TLR 2-, 4-, 13-einfachdefizienten, (iii) TLR 2/4- und TLR 2/13-doppelfdefizienten, als auch (iv) TLR 2/4/13-tripelfdefizienten und (v) MyD88/TRIF-doppelfdefizienten Mäusen mit genetischem C57BL6 Hintergrund gewonnen (**Abbildung 3**). Dazu wurden Knochen, die uns von Herrn Prof. Dr. Kirschning vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen zur Verfügung gestellt wurden, mit 5 ml Phosphatgepufferter-Kochsalzlösung (PBS) gespült, das so gewonnene Knochenmark mittels Titrierung mit Hilfe einer Glaspipette zerkleinert und anschließend durch ein 70 µm Filtersieb in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt; anschließend wurde für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Erythrozyten-Lyse durch Resuspension des Sedimentes in 3 ml hypotoner 0,2%-NaCl Lösung. 40 Sekunden später wurde der Zellsuspension zur Isotonisierung 7 ml 1,2%-NaCl Lösung hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 4 ml PBS wiederaufgenommen. Die anschließende Trennung der Makrophagen-Vorläuferzellen von anderen Zelllinien erfolgte mittels einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (**Abbildung 3**): dazu wurden zunächst jeweils 4 ml zweier Lösungen unterschiedlicher Dichte (Lösung I und Lösung II siehe **7.1**) in einem 15 ml Zentrifugationsröhrchen übereinandergeschichtet und darüber anschließend die Zellsuspension gegeben. Nach 30 Minuten Zentrifugation ohne Bremse bei 2300 rpm und 4°C trennte sich die Zellsuspension in zwei Banden auf (**Abbildung 4**); die obere enthielt die Makrophagen Vorläuferzellen (**Abbildung 4**). Die Makrophagen-

Vorläuferzellen wurden anschließend in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit PBS auf 12 ml aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4°C; anschließend wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Makrophagen-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 10 ml Petrischale überführt und unter den oben genannten Bedingungen (siehe 2.2.1) für sieben Tage inkubiert.

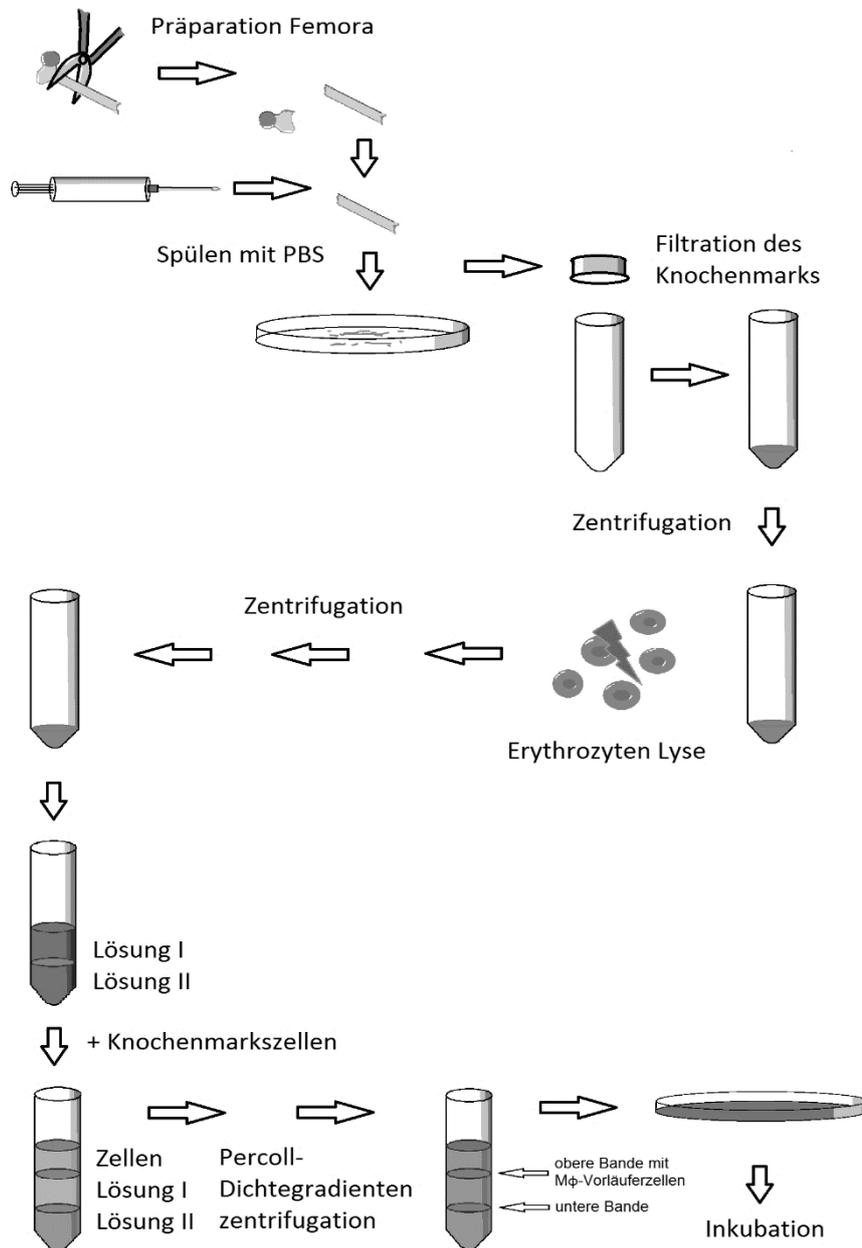


Abbildung 3 Fließschema Präparation: Einzelne Schritte der Präparation sind schematisch dargestellt. Zunächst erfolgt die Präparation der Femora, dann die Spülung und Filtration des Knochenmarks mittels eine 70 µm Filtersieb. Nach Zentrifugation folgt die Erythrozytenlyse und Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Die gewonnenen Vorläuferzellen werden inkubiert. Details siehe Fließtext.

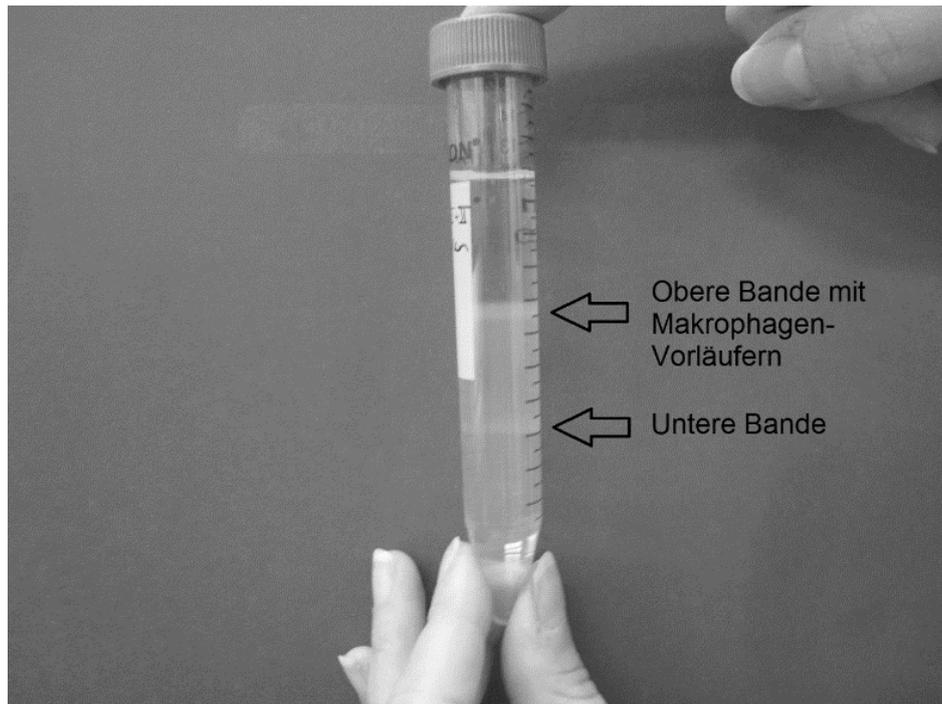


Abbildung 4 Banden nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation: Zentrifugationsröhrchen nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Mit Pfeil markiert ist die obere Bande, welche die Makrophagen-Vorläuferzellen enthält.

2.2.1.2 Kultivierung der isolierten Makrophagen-Vorläuferzellen

Während der siebentägigen Inkubationszeit wurden Medienwechsel durchgeführt. Hierfür wurden die Vorläufer-Zellen 24 Stunden nach Präparation in 50 ml Zentrifugationsröhrchen pipettiert und bei 1200 rpm und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde in neuem Makrophagen-Medium resuspendiert und in neue 10 ml Petrischalen überführt. Durch dieses Verfahren wurden die frei in Lösung befindlichen Zellen von adhärennten Fibroblasten getrennt, welche am Boden der alten Petrischale zurückblieben. Nach weiteren 96 Stunden wurde das Makrophagen-Medium der Zellkultur erneuert.

2.2.1.3 Aussaat der Makrophagen

Nach sieben Tagen wurde das Makrophagen-Medium durch 10 ml Accutase-Lösung ersetzt und die Zellen für 10 Minuten unter oben genannten Bedingungen (siehe **2.2.1**) im Brutschrank inkubiert um die adhärennten Makrophagen von der Zellkulturschale zu lösen. Die sich nun in Accutase-Lösung befindlichen Zellen wurden mittels Pipette aufgenommen, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt, bei 1200 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände verworfen und das Sediment in M-CSF freiem Makrophagen-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt. Dazu wurden jeweils 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl Trypan Blau Lösung gemischt. Die Zellzahl Z in n/ml ergab sich wie folgt:

$$Z = nZ \times Vf \times 1000 / [\text{ausgezählte Fläche (1 mm}^2\text{)} \times \text{Kammertiefe (0,2 mm)}] \text{mm}^3$$

nZ = Anzahl der gezählten Zellen; nF = Anzahl der gezählten Felder; Vf = Verdünnungsfaktor;

Daraufhin wurden die Zellen durch Zugabe der entsprechenden Menge von M-CSF freiem Makrophagen-Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und der Zellsuspension zusätzlich 60ng/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) hinzugefügt. PMA begünstigt das Wachstum der Makrophagen unter Kulturbedingungen (Greenberger et al. 1980; Smith et al. 1983; Mercurio und Shawn 1988), sowie die Aufnahme und Verarbeitung von Fremdmaterial (Kielian und Cohn 1981; Swanson 1989). Anschließend wurden 2×10^5 Zellen/well in einem Volumen von 200 μ l Kulturmedium 96-well Platte pipettiert. Um die Reinheit der Präparation zu überprüfen, wurden wiederholt FACS-Analysen (Herzenberg et al. 2002) mittels CD11b und F4/80-Antikörper durchgeführt, welche typische Makrophagenmarker darstellen (Lloyd et al. 2008).

2.2.2 Das Stimulationsprotokoll

2.2.2.1 Vorbereitung der Bakterien

Die verwendeten *Streptococcus pneumoniae* Stämme wurden uns von unserem Kooperationspartner Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt aus der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie am Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald zur Verfügung gestellt. Die Bakterien erhielten wir als in THY-Glycerol-Medium tiefgefrorene „ready to use“ Aliquots. Die Konzentrationen lagen hierbei zwischen 2×10^9 - und $1,4 \times 10^8$ KBE/ml. Die jeweilige Konzentration wurde bei jeder Charge durch Ausplattieren der Bakterien auf Blutagarplatten in absteigenden Konzentrationen und Zählen der Kolonien überprüft. Am Versuchstag wurden die Bakterien durch Zugabe von 10% Penicillin/Streptomycin zwei Stunden vor Stimulation lysiert. Es wurden sieben Stämme folgender Serotypen verwendet: Serotyp 2 (D39), Pneumolysin-defizienter Serotyp 2 (D39 Δ PLY), Serotyp 3, Serotyp 4, Serotyp 7F, Serotyp 14, Serotyp 19A.

2.2.2.2 Stimulation der Knochenmarks-Makrophagen mit *Streptococcus pneumoniae*

Am Tag der Stimulation wurde das Makrophagen-Medium zunächst durch Stimulations-Medium ersetzt. Für die Stimulation wurden die oben genannten *Streptococcus pneumoniae* Serotypen verwendet. Die Bakterien wurden in einer Konzentration von 1×10^7 KBE/ml in die Makrophagen-Kultur eingebracht, anschließend wurde bei 37°C und 5% CO₂ Begasung für sechs Stunden stimuliert. Als Negativkontrolle diente reines Makrophagen-Medium. Nach sechs Stunden Stimulation wurden die Überstände abgenommen und photometrische LDH Messungen (siehe 2.2.4) durchgeführt. Die restlichen Überstände wurden bei -30°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für Interleukin-Messungen mittels Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) (siehe 2.2.4) verwendet.

2.2.3 Test zum Nachweis von Pneumolysin durch Hämolyseaktivität

Zur Bestimmung der lytischen-Aktivität der bei dieser Arbeit untersuchten Pneumokokkenstämme wurden Hämolyse-Tests durchgeführt (Benton et al. 1997). Zur Gewinnung von intakten Erythrozyten wurden zunächst 10 ml Schafsblut bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Sediment anschließend mit 20 ml PBS resuspendiert. Insgesamt wurde dieser Arbeitsschritt dreimal wiederholt. Abschließend wurde das Sediment in 10 ml PBS resuspendiert. Zur Anzucht der Pneumokokken wurden die zuvor auf Blutagarplatten aufgebrauchten Bakterien (siehe **2.2.2**) mit Wattestäbchen in 35 ml THY-Flüssigmedium überführt und bei 37°C für 3-4 Stunden bis zu einer optischen Dichte von OD_{600} 0,4-0,5 kultiviert. Die Bakterien wurden dann durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 10 min als Überstand für die Durchführung der Hämolyse-Tests gewonnen. Zur Durchführung der Tests wurden 100 µl Lysepuffer in die Kavitäten einer 96-well Platte vorgelegt und anschließend 50 - 5 µl Pneumokokkenüberstand sowie 1:50 verdünnte Erythrozytensuspension dazugegeben. Anschließend wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und abschließend für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Die Auswertung der Hämolyseaktivität erfolgte phänotypisch. Hierbei galt der Test als negativ, wenn sich ein Erythrozytensediment am Ende der Untersuchung zeigte, welches auf intakte Erythrozyten hindeutet. Bei Abwesenheit eines entsprechenden Sedimentes hatte demzufolge Hämolyse stattgefunden. Als Negativkontrolle dienten 150 µl Lysepuffer mit 50 µl Erythrozytensuspension.

2.2.4 Messverfahren

2.2.4.1 Enzyme-linked immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA) ist eine enzymbasierte Methode zum quantitativen Nachweis von Molekülen wie beispielsweise Proteinen (Aydin 2015b). Bei der hier angewendeten Methode handelt es sich um einen sogenannten Sandwich-ELISA. Hierbei wird der Boden einer Gewebekulturplatte mittels „Capture-Antibody“ bedeckt, welcher das nachzuweisende Protein bindet. Anschließend wird die zu untersuchende Probe eingebracht und in der Folge die gebundenen Proben mittels „Detection-Antibody“ markiert. Abschließend kann durch einen enzymkatalysierten Farbumschlag eine Quantifizierung mittels Densitometrie und Eichkurve vorgenommen werden (Aydin 2015a). Diese Methodik wurde zur Bestimmung von Maus-IL-1 β (Mouse IL-1 β /IL 1F2 DuoSet® ELISA) sowie Maus-IL-6 (Mouse IL-6 DuoSet® ELISA) (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) in Zellkulturüberständen nach Stimulation eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA). Die Nachweisgrenze für beide Zytokine lag bei 15 pg/ml.

2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der LDH-Konzentration im Zellkulturüberstand

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität erfolgten über die Messung der LDH-Konzentrationen im Überstand. Das Enzym Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein intrazelluläres Enzym, welches bei Zellschäden, die mit einer Integritätsstörung der Plasmamembran oder Zell-Lyse einhergehen, aus dem Zellinneren freigesetzt wird (Korzeniewski und Callewaert 1983). Die Höhe der LDH Freisetzung korreliert mit dem Ausmaß der Zellschädigung, weshalb es sich als quantitative Methode zur Feststellung des lytischen Zelltodes eignet (Korzeniewski und Callewaert 1983). Der von LDH katalysierte Umsatz von Pyruvat zu Laktat unter NADH-Verbrauch kann hierbei photometrisch nachgewiesen und quantifiziert werden (Decker und Lohmann-Matthes 1988). Der von uns verwendete Nachweis basiert auf der Farbreaktion von wasserlöslichen Tetrazolium-Salzen (LDH-Cytotoxicity Assay Kit II) (Biovision Inc., Kalifornien, USA). Die Anwendung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Biovision Inc., Kalifornien, USA). Als Referenzwert für den vollständigen Zelltod wurde die LDH-Konzentration nach Lyse von BMDMs mit Octoxinol 9 (Triton™ X-100 im Folgenden Triton) verwendet (LDH in % of Triton). Triton zerstört als Detergens die Integrität von Zellmembranen (Helenius und Simons 1975).

2.2.4.3 Fluorometrischer Nachweis von bakterieller RNA

Die in dieser Arbeit untersuchten Pneumokokkenstämme (siehe **2.2.2**) wurden auf Ihren RNA Gehalt untersucht. Zur Bestimmung verwendeten wir eine Fluoreszenz-Methode (QuantiFluor® RNA System) (Promega Corporation, Wisconsin, USA). Dabei bindet eine fluoreszierende Färbelösung an RNA, dessen Gehalt in den Proben dann photometrisch über eine Eichkurve quantifiziert werden kann. Die Anwendung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Promega Corporation, Wisconsin, USA). Die Nachweisgrenze betrug dabei 0,1 ng/μl.

2.2.4.4 Analyse der Pneumolysin- und PsaA- Expression mittels Westernblot

Die Expression des Toxins Pneumolysin sowie die Bestimmung des Gehaltes an Oberflächenantigen PsaA bei den einzelnen Streptokokken-Serotypen (siehe **2.2.2**) wurde mittels Westernblot analysiert (Neal 1980). Hierzu wurden zunächst 10 μl der einzelnen Pneumokokkenstämme durch Zugabe von 10% Penicillin/Streptomycin lysiert und anschließend mit 10μl 2xSB Buffer verdünnt und auf das Gradientengel aufgebracht. Nach Einbringen des Laufpuffers folgte die Auftrennung der Proteine bei 200 V und 70-110 mA für 35 Minuten. Anschließend erfolgte das Blotting mittels Transferpuffer auf eine PVDF Membran mit 0,45 μm Porengröße bei 30V und 110-170 mA für eine Stunde. Danach wurden noch freie Bindungsstellen mittels PBS-Tween + Milchpulver blockiert und die Membranen für eine Stunde bei 37°C getrocknet. Nach Auftragen der entsprechenden primären und sekundären Antikörper folgte mittels Substrat-Kit (Chemiluminescent FemtoMax™ super sensitive HRP substrate)

(Rockland Immunochemicals Inc. Limerick, USA) und CCD Camera die Lumineszenzbestimmung. Die densitometrische Auswertung erfolgte mittels dem Computerprogramm ImageJ.

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm SigmaPlot. Es wurde eine einfaktorielle univariate Varianzanalyse (one-way ANOVA, analysis of variance) durchgeführt. Der Mehrgruppenvergleich erfolgte mittels Students-Newman-Keuls-Test. Die Normalverteilung wurde durch einen Shapiro-Wilk-Test überprüft, die Varianzhomogenität mit einem Brown-Forsythe-Test. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen

Die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 wurden als wichtige Rezeptoren für die Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch Makrophagen sowie für die Einleitung einer Immunreaktion gegen dieses Pathogen identifiziert (Koedel et al. 2003; Klein et al. 2008). Beobachtungen im Mausmodell der Pneumokokkenmeningitis lieferten erste Hinweise darauf, dass neben TLR 2 und TLR 4 weitere Toll-like Rezeptoren an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* beteiligt sind (Koedel et al. 2003; Koedel et al. 2004; Klein et al. 2008). Dort zeigten MyD88-defiziente Mäuse eine deutlich reduzierte Immunantwort (Koedel et al. 2004) im Vergleich zu TLR 2/4-doppeldefizienten Mäusen bei Infektion mit Pneumokokken (Klein et al. 2008). Da das Adaptermolekül MyD88 für die Funktion aller Toll-like Rezeptoren, mit Ausnahme von TLR 3 essentiell ist (Gay et al. 2011), könnten die beobachteten Unterschiede im Phänotyp durch die Beteiligung zusätzlicher Toll-like Rezeptoren erklärt werden. Bakterielle RNA wurde als ein wichtiger TLR-Ligand bei der Erkennung Gram-positiver Bakterien identifiziert (Deshmukh et al. 2011; Eigenbrod et al. 2012). Das Protein Unc93b1 ist essentiell für die Funktion der endosomalen, Nukleinsäure erkennenden TLRs (Tabeta et al. 2006; Eigenbrod und Dalpke 2015) Durch Versuche aus unserer Arbeitsgruppe mit TLR 2/4-defizienten Makrophagen, welche zudem die Missense-Mutation (3d) im Gen *Unc93b1* trugen (Tabeta et al. 2006; Brinkmann et al. 2007), konnte eine verminderte Zytokinproduktion ähnlich der von Makrophagen mit einer MyD88-Defizienz beobachtet werden. Dies spricht für eine Beteiligung endosomaler TLRs bei der Erkennung von Pneumokokken.

Daher sollte geklärt werden, ob (i) die oben genannten Beobachtungen aus dem Mausmodell in der Makrophagen-Kultur reproduzierbar sind und (ii) falls ja, ob neben TLR 2 und TLR 4 zusätzlich endosomale Toll-like Rezeptoren an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* in der Makrophagen-Kultur beteiligt sind.

3.1.1 Die Rolle des Adaptermoleküls MyD88 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen

Um die Reproduzierbarkeit der im Mausmodell beobachteten Reduktion der Immunantwort in der Makrophagen-Kultur nachvollziehen zu können, wurden folgende Versuche durchgeführt:

Es wurden (i) murine Wildtyp-Makrophagen, (ii) MyD88/TRIF- sowie (iii) TLR 2/4-doppeldefiziente murine Knock-Out-Makrophagen mit dem klassischen Laborstamm *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) stimuliert. Die Wildtyp-Makrophagen fungierten hierbei als Positiv-Kontrolle. Es zeigten sich folgende Phänotypen: Die IL-6 Konzentrationen waren bei MyD88/TRIF- und TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen signifikant zur WT-Positiv-Kontrolle verringert. Zudem zeigten sich

bei dem Vergleich zwischen MyD88/TRIF-doppeldefizienten-Makrophagen und TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen verringerte IL-6 Konzentrationen. Diese Unterschiede waren signifikant. Die IL-1 β Konzentrationen waren bei MyD88/TRIF-doppeldefizienten-Makrophagen signifikant zur Positiv-Kontrolle erniedrigt. Zudem zeigte sich eine signifikante Verringerung im Vergleich zu den TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen. Bei der LDH-Freisetzung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Positiv-Kontrollen und Gen-defizienten Makrophagen. Diese Beobachtungen decken sich mit den oben genannten Beobachtungen aus dem Mausmodell. Aufgrund dieser Ergebnisse gingen wir davon aus, dass neben TLR 2 und 4 weitere TLRs an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) in vitro beteiligt sind (Abbildung 5).

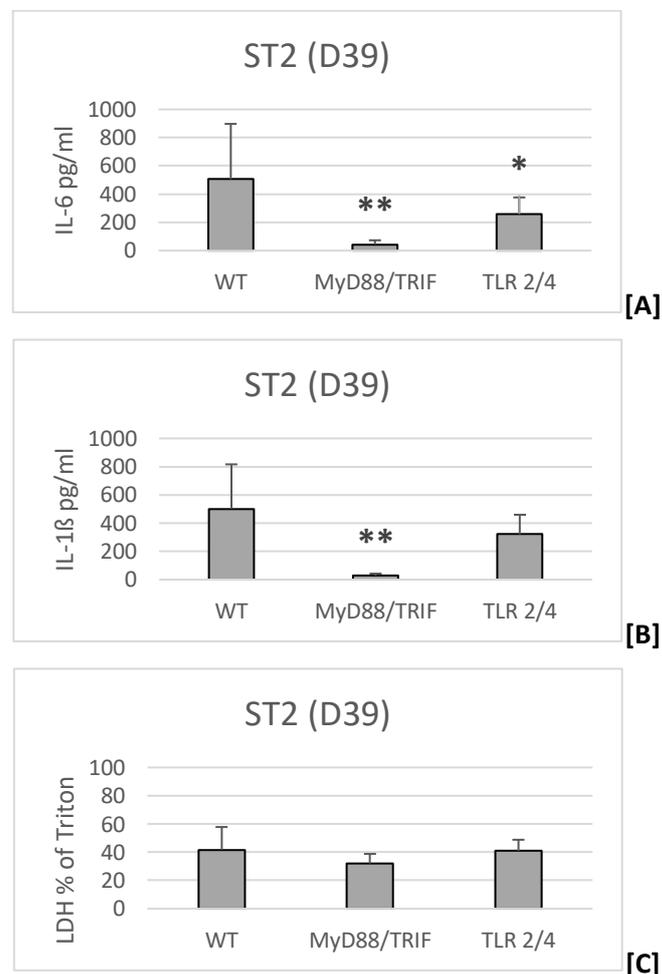


Abbildung 5 Die Rolle des Adaptermoleküls MyD88/TRIF bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* D39: Murine Knochenmarks-Makrophagen von C57BL6/n-Wildtyp-Mäusen sowie MydD88/TRIF- und TLR 2/4-defizienten Mäusen wurden für sechs Stunden mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) stimuliert. Es wurden die IL-6-, IL-1 β - sowie LDH-Konzentration im Überstand nach Stimulation bestimmt. Abbildung [A] zeigt die IL-6-, Abbildung [B] die IL-1 β - und Abbildung [C] die LDH in % of Triton-Konzentration in den Überständen der Zellkultur nach Stimulation. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. ** $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR 2/4-defizienten Makrophagen. Die Nachweisgrenze für IL-1 β und IL-6 betrug 15pg/ml.

3.1.2 Die Rolle endosomaler Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen

Die Missense-Mutation (3d) im Gen *Unc93b1* deaktiviert die Funktion von Unc93B1 (Tabeta et al. 2006), welches wiederum essentiell für die Funktion endosomaler Toll-like Rezeptoren ist (Lee et al. 2013; Pelka et al. 2018). Um eine mögliche Beteiligung endosomaler TLRs bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* in der Makrophagen-Kultur zu testen, wurden TLR 2/4-doppeldefiziente Makrophagen, welche zudem die Missense-Mutation (3d) trugen (3d&TLR 2/4) mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) stimuliert und mit dem MyD88/TRIF defizienten Phänotyp aus Abschnitt (3.1.1) verglichen: Dabei zeigte sich bei 3d&TLR 2/4-Makrophagen eine verminderte Zytokinproduktion für IL-6 und IL-1 β ähnlich der des MyD88/TRIF-doppeldefizienten Phänotypen. Dies spricht für die Beteiligung endosomaler Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) in vitro (**Abbildung 6**).

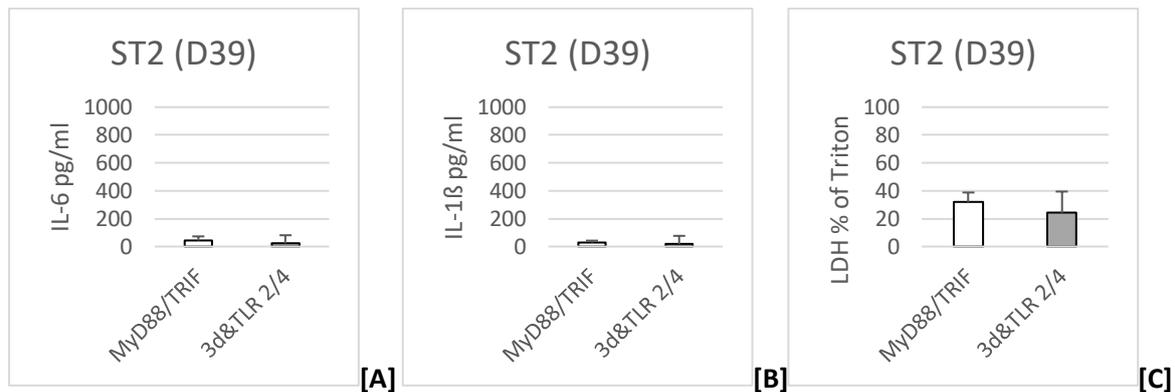


Abbildung 6 Die Rolle endosomaler Toll-like-Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* D39 durch BMDMs: Murine Knochenmarks-Makrophagen von Mäusen, welche die Missense Mutation 3d trugen sowie TLR 2/4-defizient waren, wurden für sechs Stunden mit *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) stimuliert. Zusätzlich ist der bereits unter 3.1.1 gezeigte MyD88/TRIF-defiziente Phänotyp abgebildet. Es wurden die IL-6-, IL-1 β - sowie LDH-Konzentration im Überstand nach Stimulation bestimmt. Abbildung [A] zeigt die IL-6-, Abbildung [B] die IL-1 β - und Abbildung [C] die LDH-Konzentration in den Überständen der Zellkultur nach Stimulation. Die Daten für MyD88/TRIF wurden bereits unter 3.1.1 gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Nachweisgrenze für IL-1 β und IL-6 betrug 15pg/ml.

3.2 Charakterisierung der ausschlaggebenden Toll-Like-Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) durch murine Knochenmarks-Makrophagen

Wie unter **3.1.2** gezeigt scheinen endosomale TLRs an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* in der Makrophagenkultur beteiligt zu sein. Frühere Untersuchungen deuteten auf eine wichtige Rolle des endosomalen TLR 13 bei der Erkennung von Gram-positiven Bakterien hin (Hidmark et al. 2012; Oldenburg et al. 2012). Um die ausschlaggebenden Toll-like Rezeptoren für die Erkennung von Pneumokokken im Makrophagensystem zu identifizieren, wurden im Folgenden (i) TLR 2-,4-,13-einfachdefiziente, (ii) 2/4- (bereits unter **3.1.1** gezeigt) und 2/13-doppeldefiziente, sowie (iii) TLR 2/4/13-dreifachdefiziente murine Knock-Out-Makrophagen mit dem klassischen Laborstamm *Streptococcus pneumoniae* Serotyp 2 (D39) stimuliert.

Die IL-6 Konzentrationen waren bei TLR 2/4/13-, TLR 2/13- und TLR 13- sowie zusätzlich TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen signifikant niedriger als bei der WT-Kontrolle. Die IL-1 β Konzentration in den Überständen waren bei den TLR 2/4/13-, TLR 2/13- sowie TLR 13-defizienten Makrophagen signifikant niedriger als bei der WT-Kontrolle. Für die Freisetzung beider Zytokine ergaben sich keine Unterschiede zwischen dem TLR 2/4/13-Tripel- und TLR 2/13-doppel-defizienten Phänotyp. Für den Zelltod konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Phänotypen beobachtet werden.

Diese Befunde deuten auf folgendes hin: (i) Die Zytokinfreisetzung von IL-6 und IL-1 β muriner Knochenmarks-Makrophagen bei Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* erfolgt TLR 2 und 13 abhängig. Dabei scheint die konzertierte Aktivität von TLR 2 und TLR 13 entscheidend zu sein. (ii) Der Zelltod muriner Knochenmarks-Makrophagen bei Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* erfolgt TLR unabhängig (**Abbildung 7**).

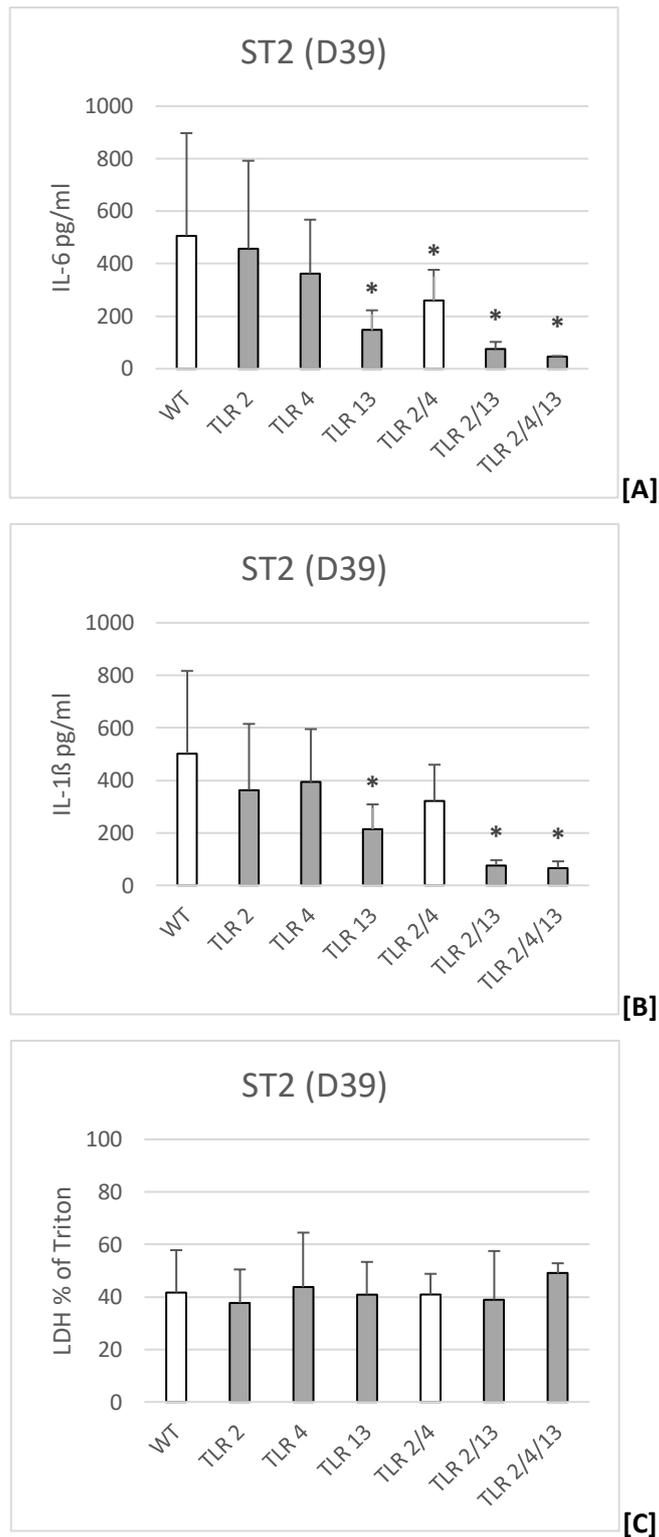


Abbildung 7 Das Toll-like-Rezeptor-Profil bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* D39 durch BMDMs: Folgende murine Knochenmarks-Makrophagen wurden für jeweils sechs Stunden mit *Streptococcus pneumoniae* D39 stimuliert: (i) Wildtyp- (ii) TLR 2-,4-,13-einfachdefiziente Makrophagen, sowie (iii) TLR 2/4-, 2/13-doppelfeziente Makrophagen sowie (iv) TLR 2/4/13-tripelfeziente Makrophagen. Gezeigt sind die Konzentrationen von IL-6 [A] IL-1 β [B] sowie LDH [C]. Die Daten für WT und TLR 2/4 wurden bereits unter 3.1.1 gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen. Die Nachweisgrenze für die IL-1 β und IL-6 ELISA betrug 15pg/ml.

3.3 Unterschiedliche Bedeutung von Toll-Like-Rezeptoren bei der Aktivierung von Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen

Die bisher vorgestellten Untersuchungen wurden mit dem klassischen Laborstamm D39 durchgeführt. Von klinischen und experimentellen Untersuchungen her ist bekannt, dass unterschiedliche Serotypen unterschiedliche Pathogenität besitzen (Briles et al. 1992; Grabenstein und Musey 2014; Geno et al. 2015).

Daher wurden die Untersuchungen im Folgenden auf verschiedene Serotypen ausgeweitet. Hierbei wurden zunächst (i) die Effekte verschiedener Serotypen bei WT-Makrophagen im Vergleich zu dem klassischen Laborstamm D39 charakterisiert und anschließend überprüft, ob (ii) die Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch Toll-like Rezeptoren serotypenübergreifend stattfindet.

3.3.1 Unterschiede bei der Aktivierung muriner Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen

Im Folgenden wurden die Zytokin-Freisetzung sowie der Zelltod muriner Knochenmarks-Makrophagen bei Stimulation mit den klinisch relevanten Serotypen 3, 4, 7F, 14 und 19A (Feldman und Anderson 2014) mit dem klassischen Laborstamm D39 verglichen, welche bereits unter Punkt 3.1 dargestellt wurden.

Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Serotypen eine signifikant erhöhte IL-6 Konzentration in den gewonnenen Überständen im Vergleich zur Stimulation mit reinem Makrophagenmedium induzierten. Die Höhe der IL-6 Konzentrationen variierte zwischen den Serotypen.

Bei den IL-1 β Messungen zeigte sich, dass die Serotypen 2, 4, 7F und 19A im Überstand eine signifikant erhöhte IL-1 β Konzentration im Vergleich zur Medium-Kontrolle verursachten. Die Serotypen 3 und 14 verursachten im Vergleich zur Medium-Kontrolle dagegen keinen signifikanten Anstieg der IL-1 β Konzentration im Überstand.

Bei den LDH-Messungen stellten wir fest, dass die Serotypen 2, 14, und 19A eine signifikant höhere LDH-Konzentration im Überstand im Vergleich zur Medium-Kontrolle hervorriefen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unterschiedliche Serotypen von Pneumokokken (i) eine unterschiedliche Zytokin-Freisetzung durch Makrophagen induzieren sowie (ii) in unterschiedlichem Ausmaß Zelltod hervorrufen. (iii) Es konnte kein Zusammenhang zwischen Zelltod und Zytokinfreisetzung festgestellt werden (**Abbildung 8**).

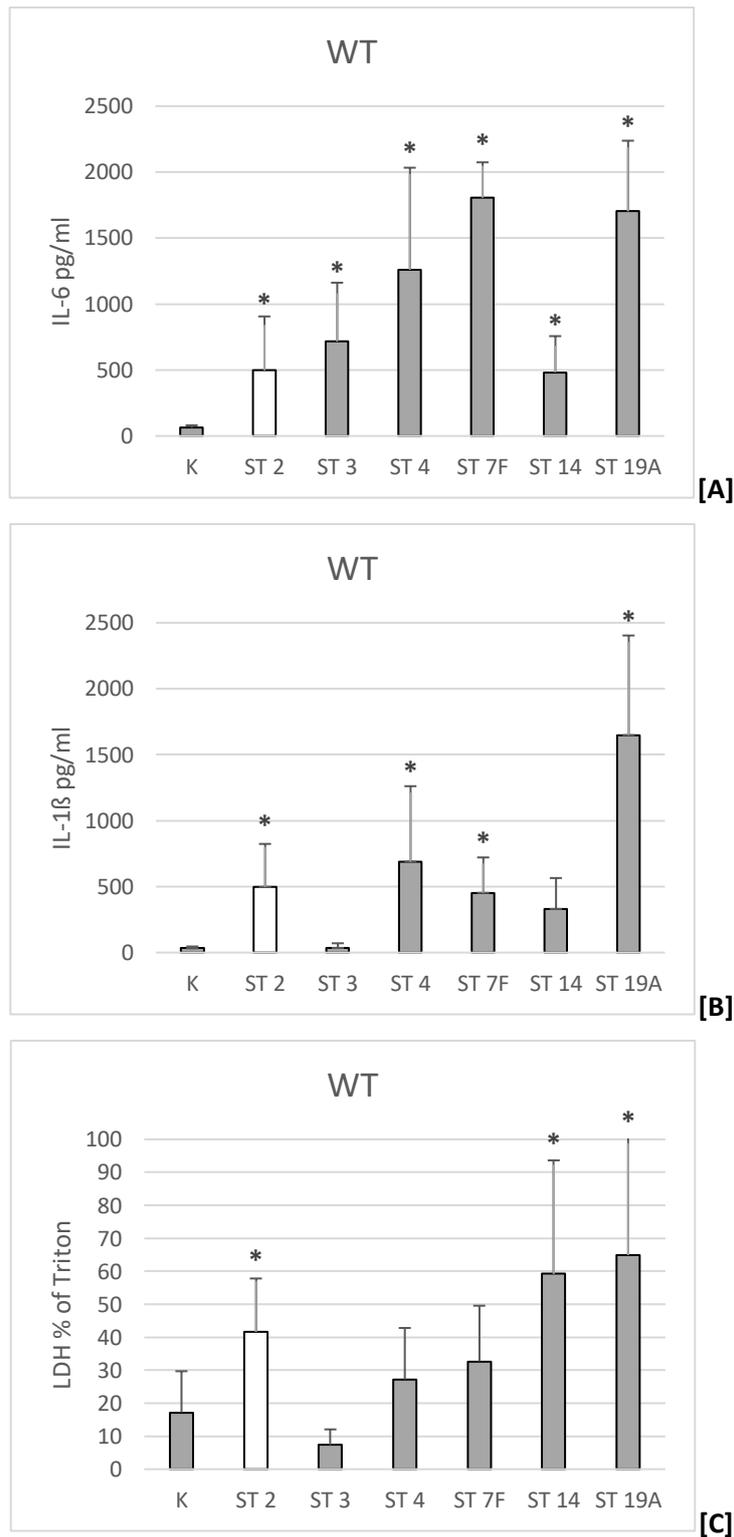


Abbildung 8 Makrophagenaktivierung und -Zelltod nach Exposition mit verschiedenen Serotypen von *Streptococcus pneumoniae*: Murine Knochenmarks-Makrophagen wurden für sechs Stunden mit jeweils folgenden *Streptococcus pneumoniae* Serotypen stimuliert: (i) 2 (ii) 3 (iii) 4 (iv) 7F (v) 14 (vi) 19A. Als Negativkontrolle diente Makrophagen-Medium. Abbildung [A] zeigt die IL-6-, Abbildung [B] die IL-1β- und [C] die LDH-Konzentration in den Überständen der Zellkultur nach Stimulation. Die Daten für Serotyp 2 wurden bereits unter 3.1.1 gezeigt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Medium-Kontrolle. Die Nachweisgrenze für die IL-1β und IL-6 ELISA betrug 15pg/ml.

3.3.2 Toll-like Rezeptor Profil bei der Erkennung unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen durch murine Knochenmarks-Makrophagen

Wie unter **3.3.1** gezeigt werden Makrophagen durch unterschiedliche Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* unterschiedlich aktiviert. Daher wurde im Folgenden überprüft, ob dies auf einer unterschiedlichen Interaktion mit Toll-like-Rezeptoren beruht. Dazu wurden Knochenmarks-Makrophagen mit einfachen- oder doppelten genetischen Toll-like Rezeptor Defizienzen mit den bereits unter **3.3.1** getesteten Serotypen stimuliert.

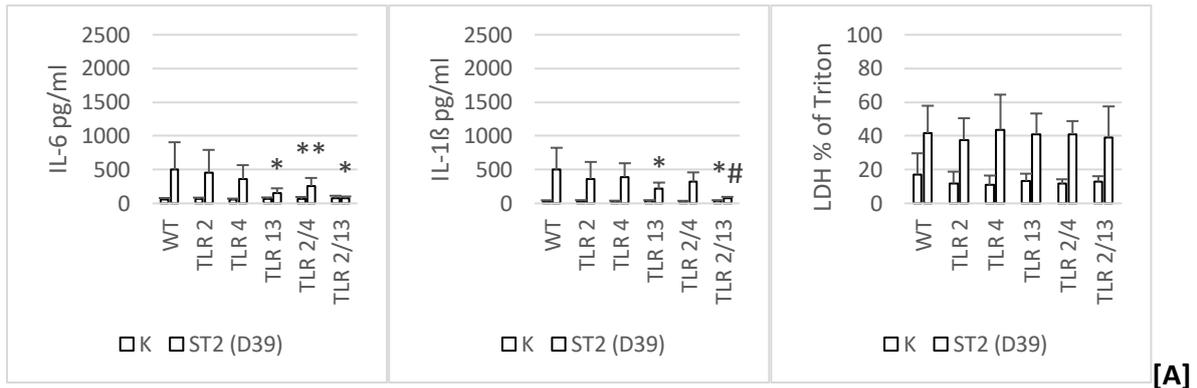
Die Stimulation von TLR 13-einfachdefizienten Makrophagen mit allen untersuchten Serotypen erbrachte signifikant niedrigere IL-6 Konzentrationen. Die Freisetzung von IL-1 β durch TLR 13-einfachdefiziente Makrophagen war bei allen Serotypen außer Serotyp 3 und 14 vermindert. TLR 4-einfachdefiziente Makrophagen setzten bei Stimulation mit Serotyp 14 signifikant weniger IL-6 frei. TLR 2-einfach defiziente Makrophagen zeigten bei Stimulation mit den Serotypen 3 und 4 verminderte IL-6 Konzentrationen.

TLR 2/13-doppeldefiziente Makrophagen erzeugten bei allen getesteten Serotypen verminderte IL-6-Konzentration im Überstand. Zudem zeigten sie für alle Serotypen außer Serotyp 3 verringerte IL-1 β -Konzentrationen. Die Messungen der IL-6 Konzentrationen bei TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen zeigten für die Stimulation mit den Serotypen 2 (D39), 3 und 14 signifikante Verminderungen, während die IL-1 β Konzentration nur bei Serotyp 4 vermindert war.

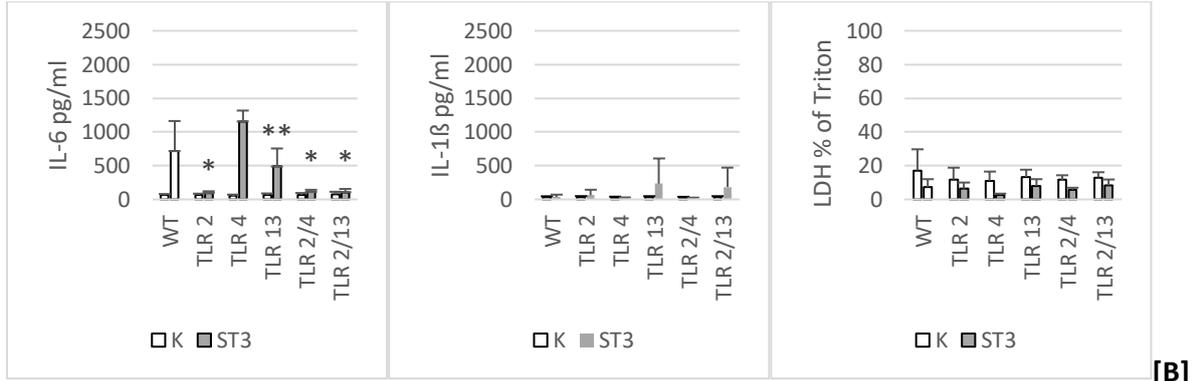
Der TLR 2/13-doppeldefiziente Phänotyp zeigte im Vergleich zum TLR 13-einfachdefizienten Phänotyp zudem signifikant niedrigere IL-6 Konzentrationen bei ST 3 und 7F sowie signifikant niedrigere IL-1 β Konzentrationen bei Serotyp 14.

Für den Zelltod zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Makrophagen von Wildtyp- und TLR-defizienten Mäusestämmen.

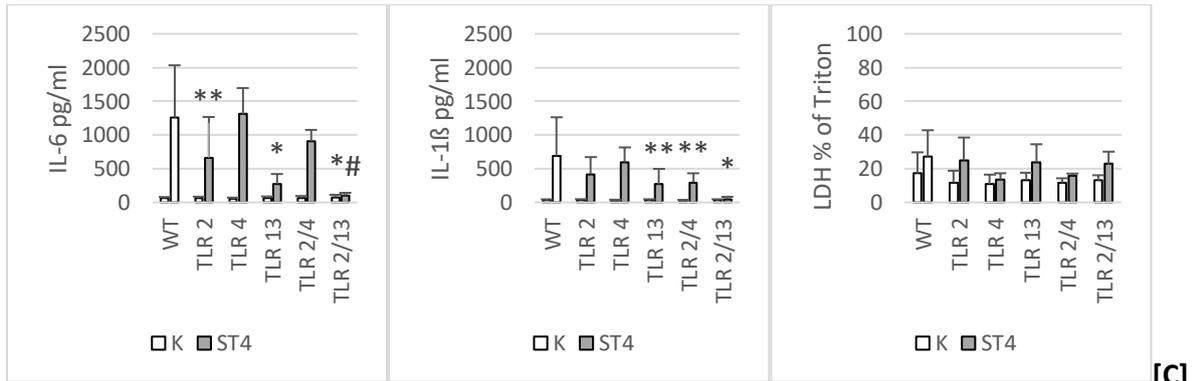
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass (i) die Toll-like Rezeptoren 2, 4 und 13 serotypenübergreifend an der Erkennung von Pneumokokken beteiligt sind und (ii) eine konzertierte Aktivität der Toll-like Rezeptoren 2 und 13 zu einer höheren Zytokin-Freisetzung bei Stimulation mit unterschiedlichen Pneumokokken-Serotypen führt (**Abbildung 9**).



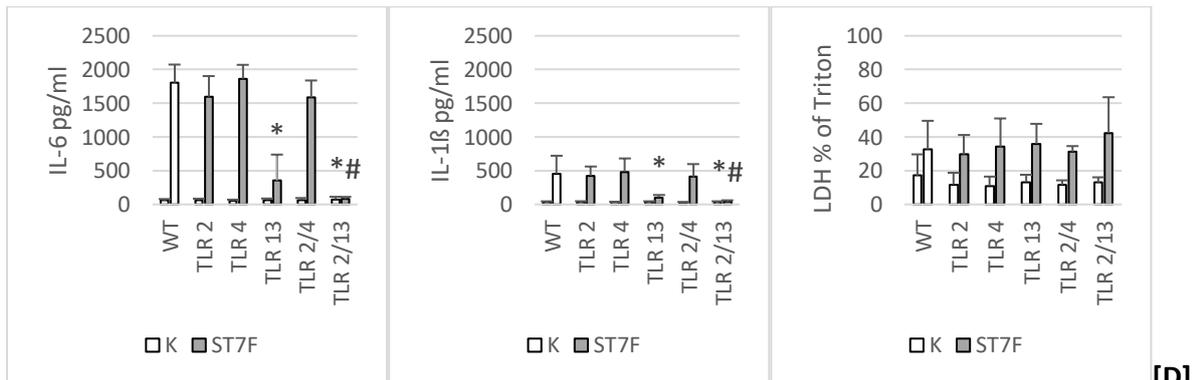
[A]



[B]



[C]



[D]

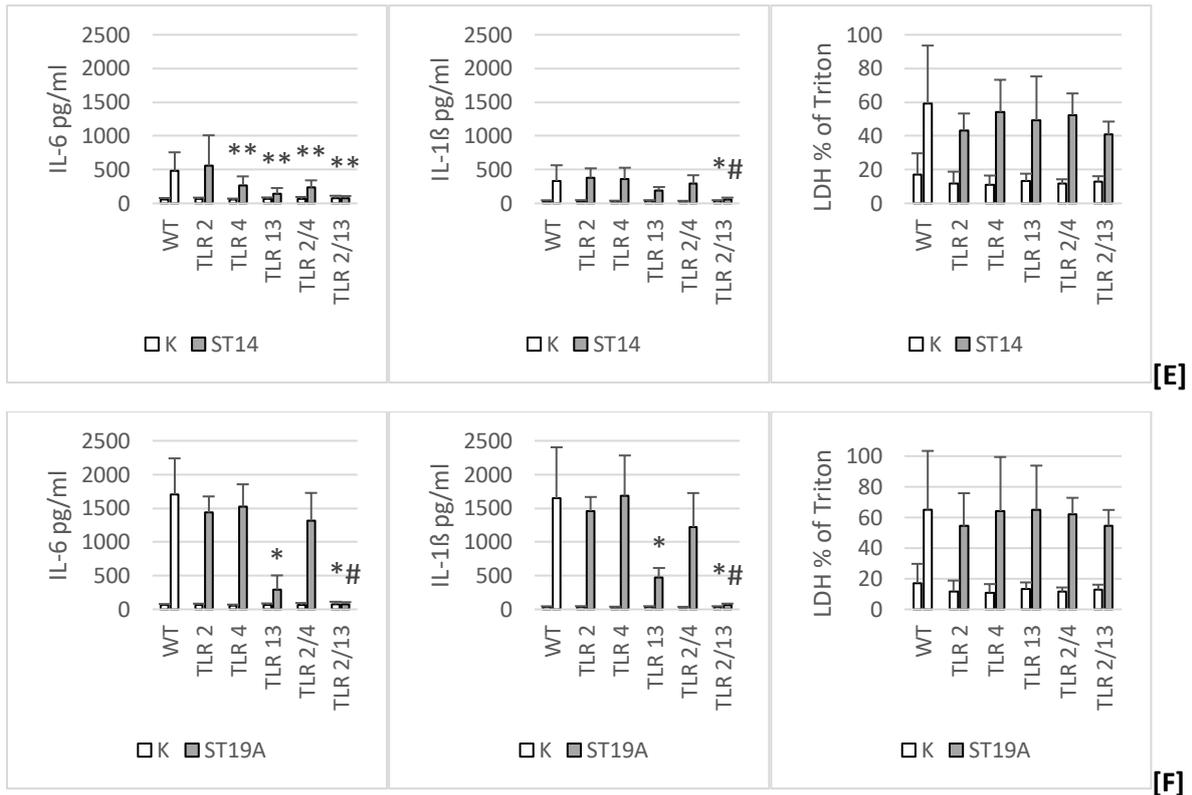


Abbildung 9 Toll-like-Rezeptorprofil bei der Erkennung unterschiedlicher Serotypen von *Streptococcus pneumoniae*: Es wurden (i) Wildtyp-(ii) TLR 2-,3-,13-einfachdefiziente-, sowie (iii) TLR 2/4-, 2/13-doppelt defiziente Knochenmarks-Makrophagen für jeweils sechs Stunden mit einem der folgenden *Streptococcus pneumoniae* Serotypen stimuliert: **[A]** ST2 (D39); **[B]** ST3; **[C]** ST4; **[D]** ST7F; **[E]** ST14; **[F]** ST19A. Zusätzlich sind jeweils die entsprechenden Werte für Stimulation mit reinem Makrophagen-Medium dargestellt. Die Daten für die Stimulation mit dem Wildtyp wurden bereits unter **3.3.1** gezeigt. Die Daten für die Stimulation mit dem Serotyp 2 wurden bereits unter **3.2** gezeigt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0,001$ im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen. ** $p < 0,05$ im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen. # $p < 0,05$ im Vergleich zu TLR 2/4-defizienten-Makrophagen. Die Nachweisgrenze für die IL-1β und IL-6 ELISA betrug 15pg/ml.

3.4 Mögliche Ursachen für unterschiedliche Aktivierung von murinen Makrophagen durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen

Wie bereits unter **3.3** gezeigt führt eine Stimulation mit unterschiedlichen Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* zu einer unterschiedlichen Aktivierung von Makrophagen. Da Pneumokokken eine Vielzahl unterschiedlicher Pathogenitätsfaktoren exprimieren und Unterschiede im Expressionslevel zwischen unterschiedlichen Serotypen nachweisbar sind (Mitchell und Mitchell 2010), sollte versucht werden, die Bedeutung ausgewählter bekannter Pathogenitätsfaktoren für die beobachteten Serotypenunterschiede bei der Makrophagenaktivierung in einem Screeningansatz zu erfassen.

3.4.1 Bedeutung von Pneumolysin für die Makrophagen-Reaktion bei Exposition mit *Streptococcus pneumoniae*

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Serotypen könnten auf einer unterschiedlichen Pneumolysin-Expression sowie Aktivität beruhen. PLY gilt als zentraler Pathogenitätsfaktor (Berry et al. 1989; Rubins et al. 1995; Hirst et al. 2008). PLY wurde als möglicher TLR 4-Ligand (Malley et al. 2003) und als zentraler Faktor bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (McNeela et al. 2010), welches für die IL-1 β -Produktion durch Makrophagen verantwortlich ist, beschrieben (Witzenrath et al. 2011). Für letzteres scheint die Fähigkeit von PLY, Poren in Zellmembranen von Makrophagen bilden zu können, entscheidend zu sein. Bei höheren Konzentrationen führt diese Aktivität zum nekroptischen Zelltod (Gonzalez-Juarbe et al. 2015). Um die Funktion von PLY in unserem Makrophagenzellkultursystem zu evaluieren, haben wir (i) zunächst die Wirkung des PLY-suffizienten Laborstammes D39 mit der eines isogenen PLY-defizienten Stammes D39 Δ PLY verglichen. Anschließend wurde dann (ii) die PLY-Expression bei unterschiedlichen Serotypen analysiert.

3.4.1.1 Effekte einer Pneumolysin-Defizienz auf die Makrophagenreaktion bei Exposition mit *Streptococcus pneumoniae*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der IL-6-, IL-1 β - sowie LDH-Messungen dargestellt. Eine Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* D39 sowie D39 Δ PLY führte zu einer signifikanten Erhöhung der IL-6 Konzentrationen gegenüber der Medium-Kontrolle, wobei die IL-6-Konzentration nach einer Stimulation mit D39 Δ PLY signifikant höher war als bei der mit dem entsprechenden Wildtypstamm. Bei den Messungen der IL-1 β Konzentrationen im Überstand zeigte sich, dass die Konzentration bei Stimulation mit D39 signifikant im Gegensatz zur Medium-Kontrolle sowie zum Stamm D39 Δ PLY erhöht war. D39 Δ PLY konnte als Stimulans bei den Makrophagen keine signifikante Erhöhung der IL-1 β Konzentration im Überstand hervorrufen. Bei Stimulation der Makrophagen mit dem Stamm D39 zeigte sich eine sowohl im Vergleich zur Medium-Kontrolle als auch zur isogenen

pneumolysindefizienten Mutante D39 Δ PLY signifikant erhöhte LDH-Konzentration in den Überständen. Unsere Untersuchungen an PLY-defizienten Stämmen belegen, dass PLY entscheidend zum Pneumokokken-induzierten Makrophagenzelluntergang und IL-1 β -Freisetzung, nicht aber IL-6-Produktion beiträgt (**Abbildung 10**).

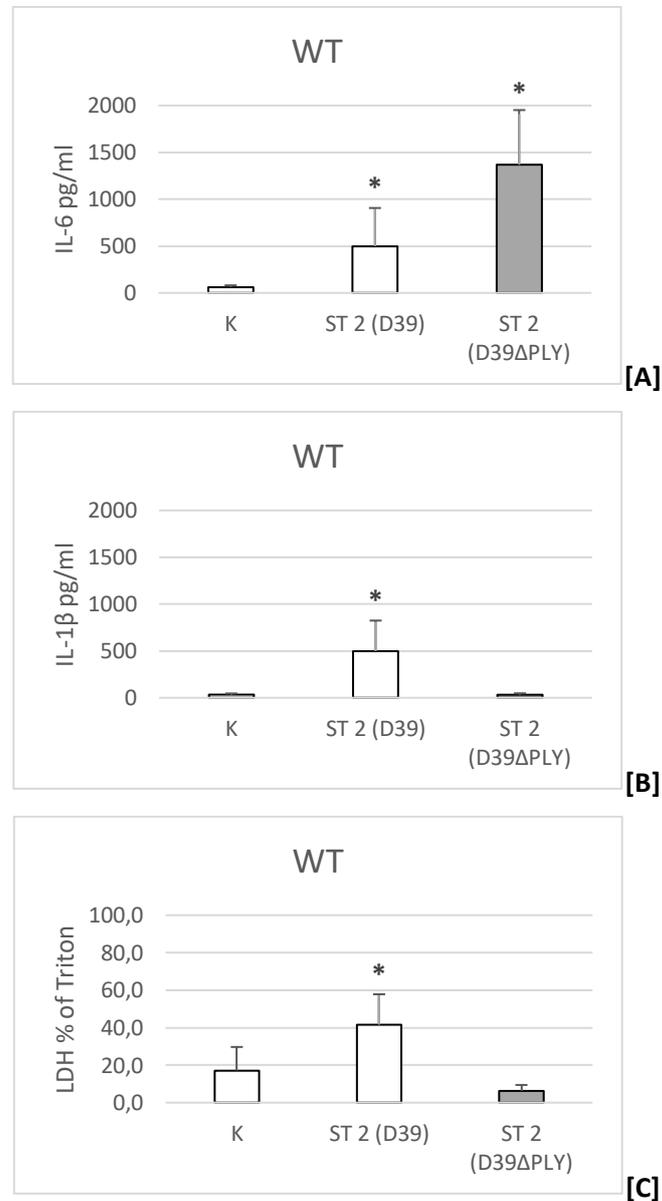
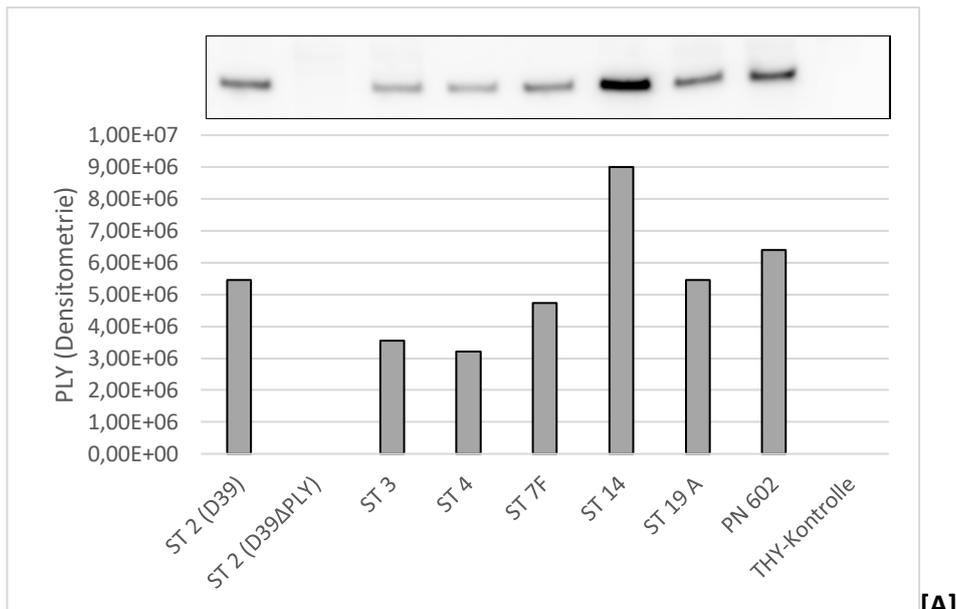


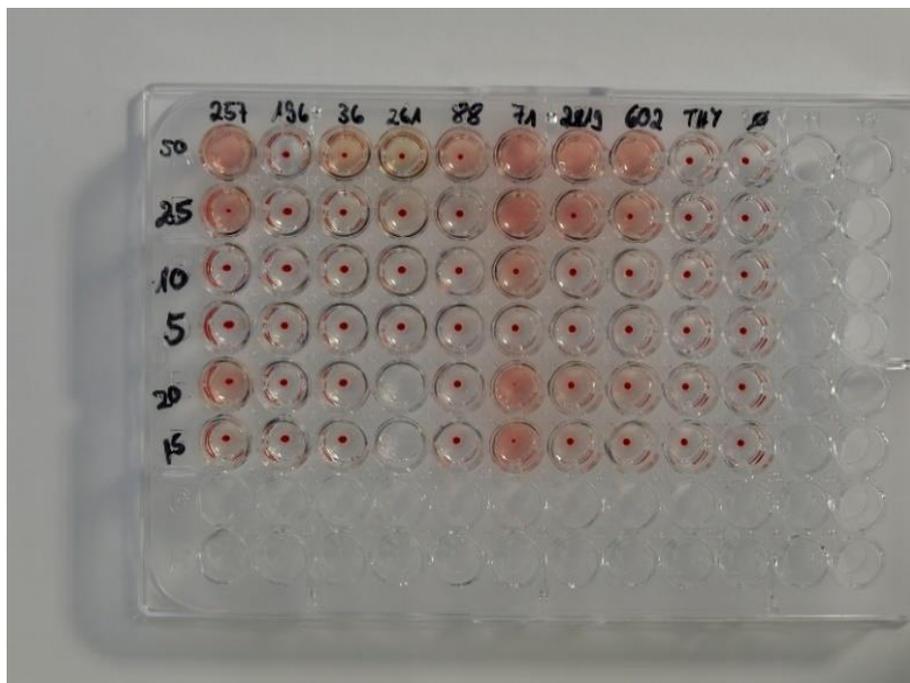
Abbildung 10 Stimulation von BMDMs mit *Streptococcus pneumoniae* D39 und dessen isogener pneumolysindefizienter Mutante D39 Δ PLY: Murine Knochenmarks-Makrophagen von C57BL6/n-Wildtyp-Mäusen wurden für sechs Stunden mit einem pneumolysinproduzierenden *Streptococcus pneumoniae* Stamm D39 und seiner pneumolysindefizienten isogenen Mutante Stamm D39 Δ PLY stimuliert. Als Negativkontrolle diente reines Makrophagen-Medium. Die Daten für die Kontrolle wurden bereits unter 3.3.1 gezeigt. Die Daten für den Serotyp 2 wurden bereits unter 3.1.1 gezeigt. Es wurden die LDH-, IL-1 β - sowie IL-6-Konzentration im Überstand nach Stimulation bestimmt. **Abbildung [A]** zeigt die IL-6-, **Abbildung [B]** die IL-1 β -Konzentration und **Abbildung [C]** die LDH Freisetzung in % of Triton in den Überständen der Zellkultur nach Stimulation. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung. * $p < 0,05$ im Vergleich zur Medium-Kontrolle. Die Nachweisgrenze für IL-1 β und IL-6 betrug 15pg/ml.

3.4.1.2 Pneumolysingehalt und hämolytische-Aktivität von *Streptococcus pneumoniae*: Zusammenhang mit Zelltod und Interleukinfreisetzung durch Makrophagen

Wie bereits beschrieben ist Pneumolysin in vivo und in vitro unter anderem aufgrund der vermittelten Zell-Lyse ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor bei Pneumokokkenerkrankungen (siehe **1.2.1**). Aus diesem Grund wurden die in dieser Arbeit untersuchten Stämme auf ihren Pneumolysin-Gehalt und ihre Aktivität hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Pneumolysinproduktion der einzelnen Stämme unterschiedlich hoch war. Dabei zeigte Serotyp 14 einen relativ hohen PLY-Gehalt, Serotyp 3 dagegen einen niedrigen. Der PLY-Gehalt der übrigen untersuchten Serotypen lag zwischen den Serotypen 3 und 14. Die hämolytische Aktivität stieg mit der hinzugefügten Menge an Pneumokokkenüberstand an. Hier zeigte der Serotyp 14 eine hohe, die Serotypen 2 und 19A eine mittlere sowie die Serotypen 3, 4 und 7F eine geringe PLY-Aktivität. Dies lässt folgende Schlüsse zu: (i) Es bestehen serotypenabhängige Unterschiede der Hämolyseaktivität sowie Pneumolysinproduktion. (ii) Die Menge des produzierten PLY-scheint mit der Hämolyseaktivität zu korrelieren. (iii) Weder für den Makrophagenzelltod noch für die Interleukinfreisetzung konnte ein Zusammenhang mit Hämolyseaktivität oder produzierter Pneumolysinmenge festgestellt werden (**Abbildung 11**).



[A]



[B]

Abbildung 11 Pneumolysingehalt der unterschiedlichen Serotypen und Hämolyseaktivität: Die Abbildung zeigt in [A] die Ergebnisse eines repräsentativen Pneumolysin Westernblots (oben) mit den Ergebnissen der Densitometrie (unten). [B] zeigt die Hämolyse von Schafsbluterythrozyten nach durchgeführtem Hämolysintest (siehe 2.2.3). Die Horizontale beschreibt in [B] die verschiedenen Pneumokokkenstämme in folgender Reihenfolge 2, 2ΔPLY, 3, 4, 7F, 14, 19A, eine LTA-defiziente Mutante sowie THY-Medium und Makrophagen-Medium. Die vertikale die hinzugefügte Menge an Pneumokokkenüberstand in μl . Es zeigen sich dabei Unterschiede im Gehalt an PLY [A] sowie bei der hämolytischen Aktivität [B] zwischen den einzelnen Serotypen.

3.4.2 Weitere mögliche Ursachen für Unterschiede in der Toll-Like-Rezeptor-abhängigen Makrophagenaktivierung durch verschiedene Pneumokokken-Serotypen

Im Folgenden sollte die Bedeutung weiterer Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* als potentielle Aktivatoren einer Makrophagenaktivierung untersucht werden.

3.4.2.1 Das Lipoprotein PsaA

Lipoproteine können als TLR-Agonisten inflammatorisch auf den Wirtsorganismus wirken (Gisch et al. 2013). Wie bereits einleitend beschrieben ist das Lipoprotein PsaA an der Entstehung von Pneumokokkenerkrankungen beteiligt (Rajam et al. 2008). Um Informationen über einen möglichen Zusammenhang zwischen der in vitro Aktivierung von Makrophagen und den Lipoproteingehalt von Pneumokokken zu erhalten, wurde die Konzentration von PsaA bei den hier untersuchten Serotypen bestimmt. (i) Die Messungen zeigten unterschiedliche PsaA-Konzentrationen bei den einzelnen Serotypen. (ii) Bezüglich des stimulatorischen Potentials auf Makrophagen oder deren Zelltod konnte kein Zusammenhang festgestellt werden (**Abbildung 12**).

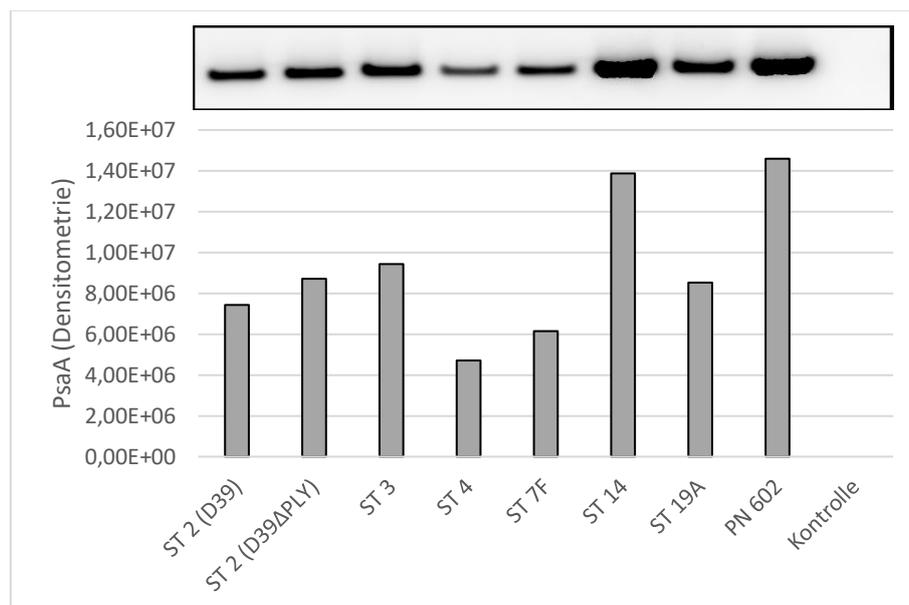


Abbildung 12 PsaA Gehalt der Serotypen: Die Abbildung zeigt die Menge an PsaA nach densitometrischer Auswertung der Westernblots. Im oberen Teil der Abbildung findet sich die Bande eines repräsentativen Westernblots, unten befinden sich die Ergebnisse der Densitometrie.

3.4.2.2 RNA

Auf die Rolle von bakterieller RNA bei der Entstehung von Pneumokokkenerkrankungen (siehe **1.2.3**) sowie deren Rolle bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch Makrophagen via TLRs (siehe **1.4**) wurde bereits hingewiesen. Aufgrund dieser Zusammenhänge wurden die hier untersuchten Serotypen auf ihren RNA-Gehalt hin untersucht. Die Messung der RNA Konzentration in den Überständen ergab unterschiedliche RNA-Konzentrationen für die Serotypen 2, 3, 4, 7F, 14 und 19A. Dabei zeigte sich für den Serotyp 14 die höchste RNA Konzentration und die niedrigste bei Serotyp 4. Daraus folgt, dass (i) die RNA-Konzentration zwischen einzelnen Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* variiert. (ii) Bezüglich der beobachteten stimulatorischen Aktivität ergab sich keine Korrelation mit der Menge des RNA-Gehaltes (**Abbildung 13**).

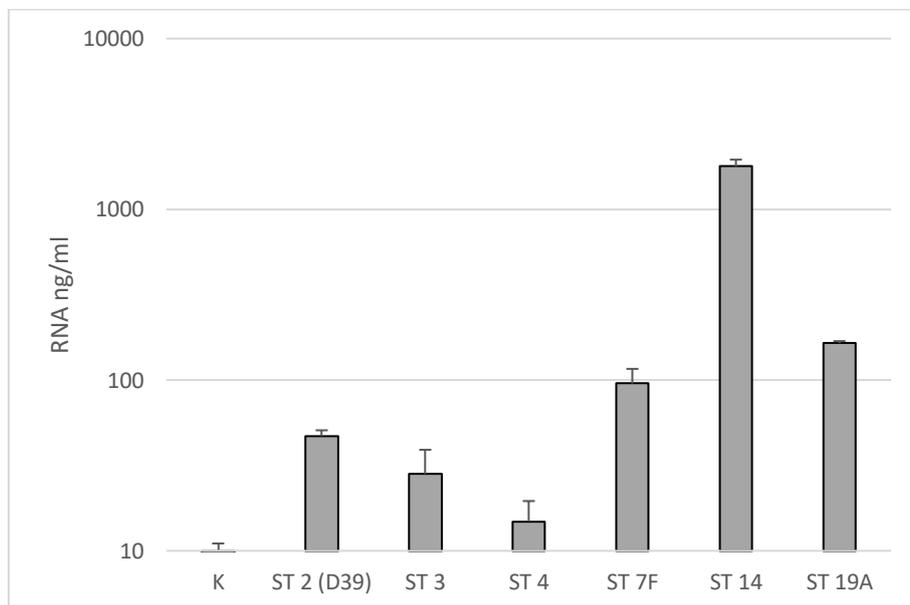


Abbildung 13 RNA-Gehalt der unterschiedlichen Pneumokokken-Serotypen: Die Abbildung zeigt die Konzentrationen von RNA in ng/ml der unterschiedlichen Serotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Skala ist logarithmisch. Die Nachweisgrenze betrug 0,1 ng/ μ l.

4 Diskussion

Ausgeprägte Entzündungsreaktionen tragen entscheidend zur Pathogenese von Pneumokokken-Erkrankungen wie der bakteriellen Meningitis bei (van de Beek et al. 2016; Bewersdorf et al. 2018). So kommt es durch eine überschießende Immunantwort zu schweren Gewebeschäden, welche letale Verläufe oder bleibende Schäden nach sich ziehen (Koedel et al. 2010a). Der initiale Trigger ist dabei die Interaktion von Pathogen und Mustererkennungsrezeptoren (Medzhitov und Janeway, JR 2000; O'Neill et al. 2013; Vidya et al. 2018). Hier ist das angeborene Immunsystem mit Toll-like Rezeptoren als bedeutende PRRs ausschlaggebend (Hedayad et al. 2011; Moresco et al. 2011). Es ist bekannt, dass die TLR 2 und 4 an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch Makrophagen beteiligt sind (Koedel et al. 2003; Klein et al. 2008). Aufgrund eines Phänotypenunterschiedes zwischen TLR 2/4-doppeldefizienten und MyD88-defizienten-Mäusen in einem in vivo-Modell der Pneumokokken-Infektion stellte sich die Frage nach der Beteiligung weiterer TLRs neben TLR 2 und 4 (Koedel et al. 2003; Koedel et al. 2004; Klein et al. 2008). Durch Versuche an Mäusen und murinen Makrophagen mit einem afunktionalem Unc93b1-Protein ergab sich der Verdacht auf die Beteiligung endosomaler TLRs (Tabeta et al. 2006; Eigenbrod und Dalpke 2015) (siehe **3.1.2**). Weitere Untersuchungen im Makrophagensystem demonstrierten, dass TLR 13 in konzertierter Aktion mit TLR 2 bei der Erkennung einer Pneumokokken-Infektion - unabhängig vom Serotyp -eine zentrale Rolle einnimmt. Zudem konnten wir zeigen, dass einzelne Serotypen Unterschiede in Ihrer immunostimulatorischen Aktivität auf Makrophagen aufweisen. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Makrophagen und deren Untergang infolge einer Pneumokokkenexposition scheint dem Pathogenitätsfaktor PLY zuzukommen; allerdings können Unterschiede in der PLY-Expression und -Aktivität die unterschiedliche stimulatorische Wirkung einzelner Pneumokokken-Serotypen nicht erklären. Auch andere durch uns untersuchte Faktoren wie Lipoproteine oder RNA scheinen alleine nicht ausschlaggebend zu sein, da Expressionsunterschiede nicht mit Aktivitätsunterschieden korrelierten.

4.1 Toll-Like-Rezeptor-Profil bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* D39

Bei den Untersuchungen zur Beteiligung der Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* D39 durch murine Knochenmarks-Makrophagen (siehe **3.2**) zeigte sich, dass bereits die genetische (Einfach-)Defizienz von TLR 13, nicht aber TLR 2 oder TLR 4, mit einer signifikanten Reduktion der Zytokinfreisetzung aus Makrophagen nach einer Pneumokokken-Exposition vergesellschaftet war. Dies spricht für eine zentrale Rolle von TLR 13 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen. Für eine zusätzliche Rolle von TLR 2 sprach unsere Beobachtung, dass TLR 2/13-doppeldefiziente Makrophagen regelhaft eine geringere Pneumokokken-induzierte Zytokinfreisetzung aufwiesen als die entsprechenden anderen TLR-Kombinationen. Kein Unterschied war bei der Zytokinfreisetzung zwischen den 2/4/13-

tripeldefizienten und 2/13-doppeldefizienten Makrophagen zu beobachten. Dies spricht gegen eine essentielle Beteiligung von TLR 4 und unterstreicht die fundamentale Funktion von TLR 2 und TLR 13 bei der in vitro Reaktion von Makrophagen auf eine Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* D39. Da weder durch Einfachdefizienzen, Doppel- oder Tripledefizienz von TLRs noch durch eine komplette Inaktivierung des MyD88- sowie TIRF-Signalweges ein signifikanter Unterschied beim Zelltod zu entsprechenden Wildtyp-Makrophagen festgestellt werden konnte, erscheint die Schlussfolgerung berechtigt zu sein, dass TLRs und TLR-abhängige Signalwege an einer Vermittlung von Zelltod muriner Knochenmarks-Makrophagen bei Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* nicht beteiligt sind.

Somit konnten wir durch die von uns erhobenen Befunde eine zentrale Rolle des Toll-like Rezeptors 13 in konzertierter Aktivität mit dem TLR 2 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen in vitro feststellen. Dies stimmt mit Befunden anderer Arbeitsgruppen überein, welche eine bedeutende Rolle des TLR 13 bei der Erkennung Gram-positiver Bakterien wie *Listeria monocytogenes* (Hidmark et al. 2012), *Staphylococcus aureus* (Hidmark et al. 2012; Oldenburg et al. 2012; Kolter et al. 2016), Streptokokken der Gruppe B (Signorino et al. 2014; Kolter et al. 2016), *Streptococcus pyogenes* (Fieber et al. 2015) und *Lactobacillus salivarius* (Li et al. 2012) sowie auch bei der Erkennung Gram-negativer Bakterien wie *Escherichia coli* (Li et al. 2012) feststellen konnten. Der Toll-like Rezeptor 13 ist ein ausschließlich bei der Maus aktiver Rezeptor (Ariffin und Sweet 2013). Er erkennt 23s rRNA gram-positiver Bakterien (Oldenburg et al. 2012) und liegt beim Menschen lediglich als Pseudogen vor (Ariffin und Sweet 2013). Als humanes Analogon des murinen TLR 13 kommt der endosomal gelegene TLR 8 in Frage, welcher ebenfalls bakterielle RNA als Ligand erkennt (Kruger et al. 2015) und eine wichtige Rolle bei der Abwehr Gram-positiver Bakterien spielt (Eigenbrod et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass TLR 8 bei der Erkennung von *Staphylococcus aureus* durch humane Makrophagen (Bergstrom et al. 2015) sowie bei der Erkennung von *Enterococcus faecalis* durch THP-1-Zellen entscheidend beteiligt ist (Nishibayashi et al. 2015). Zudem wurde RNA des Gram-negativen Spirochäten *Borrelia burgdorferi* als TLR 8 Ligand bei humanen Monozyten identifiziert (Cervantes et al. 2013). Für eine genauere Charakterisierung sind hier weitere Untersuchungen an humanen Zellen erforderlich.

4.2 Toll-Like-Rezeptor-Profil bei der Erkennung unterschiedlicher Pneumokokken-Serotypen

Die Untersuchungen zum Toll-like Rezeptorprofil bei der Erkennung unterschiedlicher Serotypen von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarksmakrophagen (siehe **3.3.2**) ergaben, dass die Toll-like Rezeptoren 2 und 13 entscheidend zur Erkennung aller untersuchten Serotypen beitrugen, was sich durch eine ausgeprägte Verringerung der Freisetzung der Zytokine IL-6 und/oder IL-1 β im Vergleich zu stimulierten Wildtyp-Kontrollzellen äußerte. Nach einer Stimulation mit PLY-defizientem Serotyp 2 oder Wildtyp-Serotyp 3 konnte allerdings keine Freisetzung von IL-1 β beobachtet werden.

Für die Freisetzung von IL-1 β ist neben der Produktion der Vorstufe pro-IL-1 β eine weitere Prozessierung in aktives IL-1 β über das Enzym Caspase 1 notwendig (Dinarello 1997). Die Aktivierung von Caspase 1 ist für die Pneumokokken-induzierte Freisetzung von IL-1 β entscheidend (Koedel et al. 2002) und erfolgt über das NLRP3 Inflammasom (McNeela et al. 2010; Schroder und Tschopp 2010; Hoegen et al. 2011; Witzentrath et al. 2012; Geldhoff et al. 2013), welches vor allem durch das bakterielle Toxin Pneumolysin aktiviert wird (siehe **1.2.1**). Den fehlenden Effekt beim PLY-defizienten Serotyp 2 und beim Serotyp 3 führen wir daher nicht auf die fehlende Beteiligung der Toll-like Rezeptoren 2 und 13 an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* zurück, sondern auf einen fehlenden Stimulus zur Caspase 1 Aktivierung und die damit ausbleibende Maturation und Freisetzung von IL-1 β (Koedel et al. 2002). Für diese Vermutung sprechen der fehlende Zelltod der Makropagen nach einer Stimulation mit den genannten Serotypen. Für die Induktion des Zelltodes wird in erster Linie das bakterielle Toxin PLY verantwortlich gemacht, welches gleichzeitig ein bekannter Aktivator des NLRP3-Inflammasoms ist (McNeela et al. 2010; Hoegen et al. 2011; Witzentrath, et al. 2011).

Als weitere wichtige Mustererkennungsrezeptoren bei der Erkennung von Pneumokokken wurden neben TLR (NOD)-like Rezeptoren (NLRs) sowie NLRP3 identifiziert (van de Beek et al. 2016). Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren auf eine potentielle Beteiligung von NOD2 bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* in vivo und in vitro hingewiesen (Opitz, B. et al. 2004; Liu et al. 2010; Dorrington et al. 2013; Hommes et al. 2015; Wang et al. 2018; Zheng et al. 2018). Hierbei ist NOD2 an der in vitro Aktivierung von NF- κ B bei Stimulation mit Pneumokokken beteiligt (Opitz, B. et al. 2004). Gleiches gilt - wie oben bereits erwähnt - für NLRP3: Es wurde in Zellkulturexperimenten (McNeela et al. 2010; Witzentrath et al. 2011) sowie in vivo (Hoegen et al. 2011) als wichtiger Aktivator des NLRP3-Inflammasoms bei Stimulation mit Pneumokokken identifiziert. Bei unseren Untersuchungen konnte allerdings durch genetische Inaktivierung von TLRs eine nahezu komplette Hemmung der Zytokinfreisetzung aus stimulierten murinen Makrophagen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass TLRs, insbesondere TLR 13, in diesem Versuchsmodell serotypenübergreifend der zentrale PRR bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* ist. Seine volle Wirkung scheint TLR 13 nur durch konzertierte Aktivität mit TLR 2 zu entfalten.

4.3 Einfluss der Pneumolysin-Produktion von *Streptococcus pneumoniae* auf Knochenmarks-Makrophagen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Pneumolysin-Produktion von *Streptococcus pneumoniae* auf die IL-6-, IL-1 β - sowie LDH-Freisetzung muriner Knochenmarks-Makrophagen ergaben, dass (i) die IL-6 Freisetzung durch murine Knochenmarks-Makrophagen unabhängig von der Pneumolysinproduktion durch *Streptococcus pneumoniae* stattfindet und (ii) die LDH- sowie IL-1 β -Freisetzung durch murine-Knochenmarks-Makrophagen PLY

abhängig ist. Der Makrophagen-Zelltod ist ein bei bakteriellen Infektionen häufig beobachtetes Phänomen (Chow et al. 2016; Stephenson et al. 2016; Jorgensen et al. 2017) (siehe **1.3.3**). In den vergangenen Jahren haben sich einige Zellkulturstudien mit der Frage beschäftigt, an welcher Zelltodform Makrophagen bei einer Pneumokokken-Infektion zugrunde gehen. Es wurde berichtet, dass eine Infektion mit Pneumokokken zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalweges führen kann (Marriott et al. 2006; Bewley et al. 2011). Für die Induktion des apoptotischen Makrophagenzelltod ist dabei PLY sowie die Phagozytose der Pneumokokken durch die Makrophagen von essentieller Bedeutung (Bewley et al. 2011; Bewley et al. 2014). Um die Aufnahme der Pneumokokken durch die Immunzellen in vitro zu ermöglichen, mussten die Bakterien allerdings vor der Makrophagen-Stimulation im Reagenzglas mit anti-Pneumokokken-Antiserum opsoniert werden, um sie der Phagozytose zugänglich zu machen (Bewley et al. 2011; Bewley et al. 2014). In einer Untersuchung an der Mäuse-Mikroglia-Zelllinie BV2 wurde kürzlich gezeigt, dass eine Stimulation dieser Zellen mit *Streptococcus pneumoniae* durch eine NLRP3 - Inflammasom abhängige Casp1 Aktivierung einen pyroptotischen Zelltod auslösen kann (Kim et al. 2015a). In einer weiteren Studie wurde wiederum demonstriert, dass verschiedene bakterielle Pathogene, darunter Pneumokokken und dessen Toxin PLY, eine Nekroptose in murinen und humanen Makrophagen induzieren können (Gonzalez-Jurabe et al. 2015). Die definitiven Gründe für diese heterogenen Befunde sind derzeit unklar. Möglicherweise beruhen sie auf Unterschieden im Versuchsaufbau wie beispielsweise unterschiedlichen Zellkulturmedien, Makrophagentypen und Pneumokokken-Serotypen. Unsere Beobachtungen, dass (i) Pneumokokken einen lytischen Zelltod auslösen können und (ii) PLY als entscheidender Auslöser des Zelltodes agiert, ist im Einklang mit oben genannten Arbeiten, welche immunostimulatorische Formen des Zelltodes postulieren. Die definitive Zelltodform in unserem Versuchssystem muss durch zusätzliche Untersuchungen mit spezifischen Hemmstoffen und Gen-defizienten Zellen noch evaluiert werden.

Die von uns beobachtete IL-1 β -Freisetzung bei Stimulation muriner Knochenmarks-Makrophagen mit *Streptococcus pneumoniae* im Vergleich zu seiner pneumolysindefizienten isogenen Mutante D39 Δ PLY deutet auf eine PLY abhängige IL-1 β Freisetzung hin. Es wurde gezeigt, dass PLY ein wichtiger Aktivator des Inflammasomes und damit der IL-1 β Freisetzung ist (McNeela et al. 2010; Fang et al. 2011; Hoegen et al. 2011; Witzernath et al. 2011). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Förderung der Freisetzung von IL-1 β aus dem Zytoplasma aufgrund von Zellmembranschäden, welche direkt durch die porenbildende Aktivität von PLY und/oder durch PLY induzierte Zelltodprogramme und Gasdermin D hervorgerufen wurden (siehe auch **1.2.1**).

Die Freisetzung von IL-6 durch murine Knochenmarks-Makrophagen bei Stimulation mit Pneumokokken erfolgte bei unseren Untersuchungen unabhängig von der Pneumolysinproduktion. Sowohl der PLY-suffiziente Stamm D39 als auch dessen, als auch seine isogene PLY-defiziente Mutante

D39 Δ PLY induzierten eine IL-6 Freisetzung. Die Produktion und Freisetzung von IL-6 erfolgt nach Aktivierung von NF- κ B durch TLR-Signalwege über PAMPs (Mansell und Jenkins 2013; Wolf et al. 2014; Schaper et al. 2015; Garbers et al. 2018; Rose 2018). Somit könnte die beobachtete PLY-unabhängige Freisetzung von IL-6 durch die Aktivierung von TLRs durch PCWs Lipopeptide/Lipoproteine (LPs) (Gisch et al. 2013) getriggert werden. Bei unseren Untersuchungen war die IL-6 Konzentration bei Stimulation mit PLY-defizienten Pneumokokken signifikant höher als bei dem entsprechenden Wildtyp-Stamm. Ein möglicher Grund für diesen Befund ist die durch die zytotoxische Wirkung von PLY dezimierte Makrophagen-Zellzahl bei Stimulation mit dem PLY-suffizienten Wildtyp D39; letztere tritt beim PLY-defizienten Stamm nicht auf.

4.4 Mögliche Bedeutung des PLY-, Lipoprotein- und RNA-Gehalts für die Unterschiede in der immunstimulatorischen Aktivität einzelner Pneumokokken-Serotypen

Bei unseren Untersuchungen stellten wir teils erhebliche Differenzen in der IL-1 β -, IL6- und LDH-Freisetzung aus Knochenmarksmakrophagen nach einer Exposition mit unterschiedlichen Pneumokokken-Serotypen fest. Mögliche Ursachen für diese Differenzen könnten Serotypen spezifische Unterschiede in der PLY-Konzentration bzw. – Aktivität, im Lipoprotein- und/oder im RNA-Gehalt sein.

In der medizinischen Fachliteratur finden sich etliche Arbeiten, welche sich mit der funktionellen Bedeutung von PLY bei Pneumokokken-induzierter Makrophagenaktivierung und -Zelllyse beschäftigen und zeigen, dass PLY entscheidend zum Zelluntergang und zur Zytokinfreisetzung aus Makrophagen beiträgt (Houldsworth et al. 1994; Shoma et al. 2008; McNeela et al. 2010; Hoegen et al. 2011; Witzenrath et al. 2011; Gonzalez-Juarbe et al. 2015; Kim et al. 2015; Gilley et al. 2016). Ausschließlich Pneumokokken-Serotypen, welche ein hämolytisch wirksames PLY produzierten, waren in der Lage, sowohl die Produktion, als auch die Freisetzung von IL-1 β aus Makrophagen zu induzieren (Witzenrath et al. 2011; Harvey et al. 2014). Unsere Western Blot- und Hämolyse-Test zeigten, dass die von uns analysierten Serotypen sehr unterschiedliche Mengen an PLY bilden. Allerdings war das gebildete PLY in allen Fällen hämolytisch aktiv (siehe **3.4.1**). Lediglich die Abwesenheit von PLY ging mit einem Verlust der zytotoxischen und der IL-1 β -induzierenden Wirkung der Pneumokokken einher. Bei den PLY-bildenden Serotypen waren weder die PLY-Menge, noch dessen hämolytische Aktivität mit dem Ausmaß des Zellunterganges und/oder der IL-1 β -Konzentration im Überstand assoziiert. Unterschiede in der PLY-Aktivität bzw.-Menge scheinen folglich nicht für die Serotypen-Unterschiede in Zytotoxizität und IL-1 β -Freisetzung verantwortlich zu sein. Auffallend war zudem, dass die PLY-Defizienz keine Reduktion der IL-6-Freisetzung bedingte. Ganz im Gegenteil, die IL-6-Konzentrationen im Zellkulturüberstand waren nach einer Stimulation mit dem defizienten Stamm sogar höher als mit dem PLY-bildenden Wildtypstamm. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der fehlenden

Zytotoxizität des PLY-defizienten Stammes und damit der höheren Zahl an Makrophagen, die IL-6 bilden können, liegen (siehe auch **4.3**).

Die immunstimulatorische Wirkung von Pneumokokken begründet sich durch die Interaktion von PAMPs mit entsprechenden Mustererkennungsrezeptoren. Als bekannte immunstimulatorische Moleküle von Gram-positiven Keimen wie Pneumokokken gelten Lipoproteine wie PsaA (Briles et al. 2000; Palaniappan et al. 2005; Tomlinson et al. 2014) und bakterielle RNA (Eigenbrod et al. 2012; Oldenburg et al. 2012; Krüger et al. 2015; Spelmink et al. 2016). Die immunstimulatorische Aktivität wird dabei hauptsächlich durch deren Bindung an Toll-like-Rezeptoren vermittelt, wobei – wie in dieser Untersuchung gezeigt – der konzertierten Aktion von TLR 2 und TLR 13 eine bedeutende Rolle zukommt. Es ist folglich denkbar, dass die beobachtenden Unterschiede in der immunstimulierenden Aktivität der analysierten Serotypen zumindest teilweise auf Unterschieden in der Expression von PsaA und/oder RNA beruhen. Bei unseren Analysen stellten wir zwar deutliche Differenzen in der PsaA- und RNA-Menge (auch der 23s-RNA, die mittels rt-PCR von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hammerschmidt bestimmt wurde; Daten nicht dargestellt) zwischen den Serotypen fest. Ähnlich wie für PLY konnten wir aber auch für PsaA und RNA keine Assoziation mit dem immunstimulatorischen Potenzial der Serotypen beobachten. Folglich scheinen auch diese Faktoren nicht hauptverantwortlich für die detektierten Serotypen spezifischen Unterschiede in der der Zytokin-Freisetzung und Zytotoxizität zu sein. Zur Identifizierung und genaueren Charakterisierung dieses Phänomens sind somit weitere Untersuchungen, wie beispielsweise unter Einsatz moderner Proteomics-Methoden (siehe z.B. Schmidt et al. 2019), vonnöten. Eine Zusammenfassung zeigt (**Abbildung 14**).

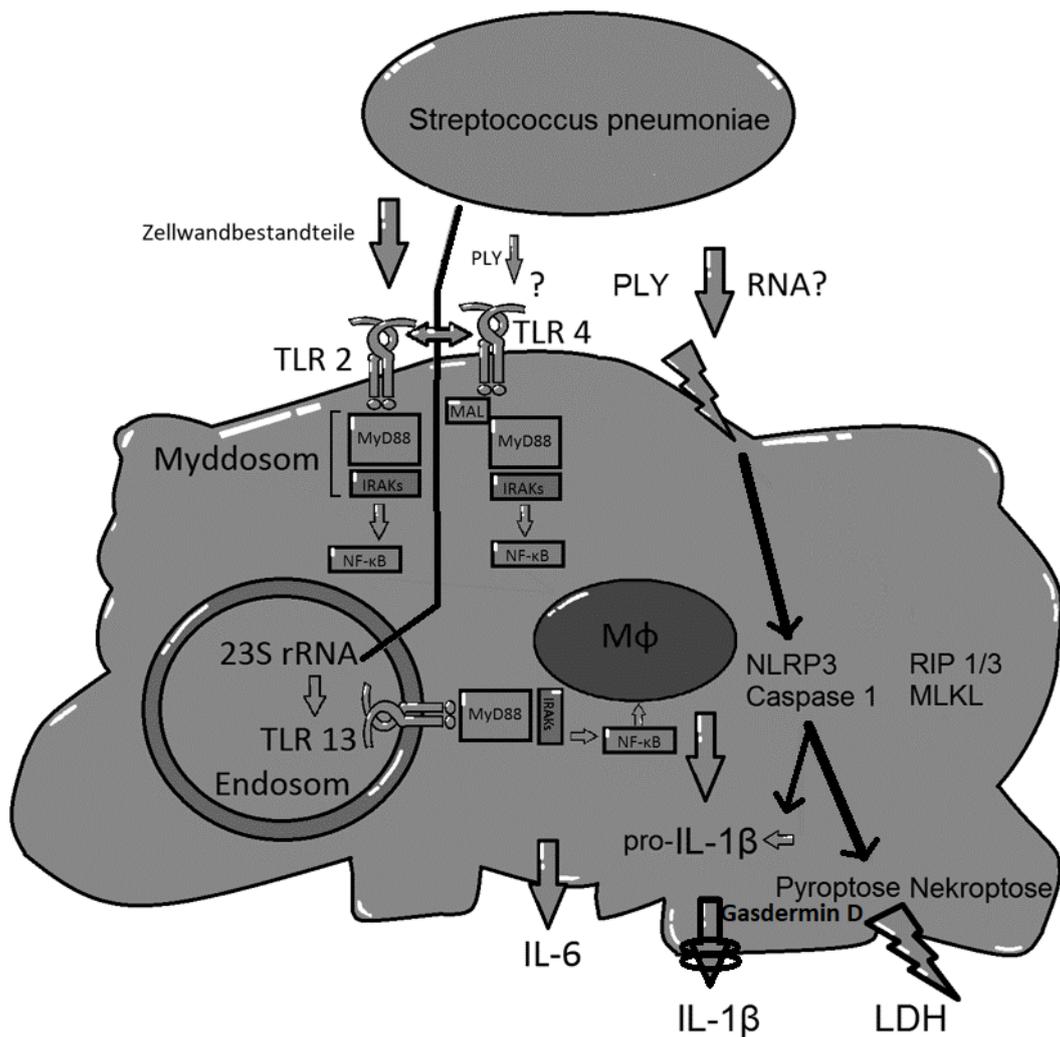


Abbildung 14 Schematische Darstellung der Rolle von TLRs bei der Detektion von Pneumokokken durch Makrophagen: Die Toll-like Rezeptoren 2 und 13 sind an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* beteiligt. Der Toll-like Rezeptor 2 erkennt Zellwandbestandteile (a.e. Lipopeptide). Die *In vitro* Aktivität von Pneumolysin beruht auf der Induktion von Zelltodprogrammen wie Pyroptose, Nekroptose sowie der IL-1 β Maturation über Caspase 1 Aktivierung mit konsekutiver Freisetzung über vom Protein Gasdermin D gebildete Poren. Das vermehrte Eindringen von bakterieller RNA durch die poröse Zellmembran könnte zusätzlich zu einer erhöhten IL-1 β -Freisetzung führen. Der endosomal gelegene TLR 13 erkennt 23s-RNA von *Streptococcus pneumoniae* und aktiviert NF- κ B. TLR 13 ist der zentrale Rezeptor bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* und wirkt synergistisch mit TLR 2.

5 Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* ist ein klinisch bedeutsamer Erreger und Verursacher schwerer Krankheitsbilder wie beispielsweise einer Meningitis, Pneumonie oder Sepsis (Feldman und Anderson 2016; van de Beek et al. 2016; Hasbun et al 2017). Die bisherigen Fortschritte bei der Behandlung von Pneumokokken-Erkrankungen verdanken wir dem Zugewinn an Erkenntnissen über dieses Pathogen und seinen Wechselwirkungen mit dem Immunsystem des Wirtes (Koedel et al. 2010b; van de Beek et al. 2016). Makrophagen (M ϕ) als wichtiger Vertreter der angeborenen Immunität (Janeway, JR und Medzhitov 2002; Franken et al. 2016) erkennen mittels Mustererkennungsrezeptoren (Pattern-recognition receptors, PRRs) sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) und initiieren eine komplexe Immunantwort (Janeway, JR und Medzhitov 2002; Kumar et al. 2011; O'Neill et al. 2013). Toll-like Rezeptoren gelten als entscheidende PRRs bei der Regulierung dieser Immunreaktion (Koppe et al. 2012; Nardo 2015; Vijay 2018). Die aus der PAMP-PRR Interaktion resultierende Entzündungsreaktion stellt einen entscheidenden pathogenetischen Faktor bei Pneumokokken-Erkrankungen dar (Koedel et al. 2010b; van de Beek et al. 2016).

Von früheren in vitro- und in vivo-Studien war bekannt, dass die TLR 2 und 4 an der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* beteiligt sind (Koedel et al. 2003; Klein et al. 2008). Hinweise auf die Beteiligung weiterer TLRs ergaben sich aus Versuchen an genetisch veränderten Mäusen, welche eine genetische Defizienz des Adaptermolekül MyD88 und dadurch einen funktionellen Defekt nahezu aller TLR-vermittelter Signaltransduktionswege (außer von TLR 3 und partiell TLR 4) aufwiesen, welche zur Signaltransduktion über Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* unabkömmlich sind (Koedel et al. 2004). Diese Mäuse zeigten im Vergleich zu TLR 2/4-doppeldefizienten Makrophagen eine deutlich reduzierte Entzündungsreaktion (Koedel et al. 2004; Klein et al. 2008). In Pilot-Versuchen an TLR 2/4-defizienten Makrophagen, die zusätzlich die Missense-Mutation (3d) im Gen *Unc93b1* trugen, dessen Genprodukt für die Prozessierung endosomaler TLRs verantwortlich gemacht wird (Tabeta et al. 2006; Brinkmann et al. 2007; Tabeta et al. 2006; Eigenbrod und Dalpke 2015; Pelka et al. 2018), beobachtete unsere Arbeitsgruppe eine Reduktion der Zytokinfreisetzung, die dem Befund bei MyD88-defizienten Makrophagen vergleichbar war. Diese Befunde werteten wir als Hinweis für die Beteiligung eines oder mehrerer endosomaler TLRs bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae*. Als möglicher Kandidat kam insbesondere TLR 13 in Frage, da dieser als PRR für 23sRNA mehrerer anderer Gram-positiver und -negativer Bakterien beschrieben worden war (Hidmark et al. 2012; Li et al. 2012; Oldenburg et al. 2012; Signorino et al. 2014; Fieber et al. 2015; Kolter et al. 2016).

Ziel dieser Arbeit war zunächst die Sicherung der in den oben beschriebenen Pilotexperimenten an 3d/TLR 2/4-defizienten Makrophagen erhobenen Befunde. In der Folge sollten die an der Erkennung

von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarks-Makrophagen mitwirkenden endosomalen TLRs identifiziert werden. In weiteren Versuchsreihen sollte überprüft werden, ob sich die Reaktion von Makrophagen auf eine Exposition mit unterschiedlichen Pneumokokken-Serotypen gleicht und falls nicht, ob hierfür Unterschiede im Bereich der PAMP-PRR-Interaktion verantwortlich zu machen sind.

Die Untersuchungen wurden an Primärkulturen muriner Knochenmarksmakrophagen verschiedener Mäusestämme mit und ohne TLR-Defizienzen durchgeführt. Um auszuschließen, dass Wachstumsunterschiede zwischen verschiedenen Pneumokokken-Serotypen für mögliche Unterschiede in der Makrophagenreaktion verantwortlich sind, wurden die Pneumokokken vorab durch eine Behandlung mit Penicillin/Streptomycin abgetötet. Die Makrophagen wurden in allen Experimenten mit jeweils 1×10^7 KBE/ml Pneumokokkensuspension stimuliert. Nach sechs Stunden wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und die Konzentrationen der Zytokine IL-6 und IL-1 β sowie des Zelltodmarkers LDH bestimmt. In weiteren Experimenten wurden die PLY-Menge und -Aktivität sowie der Lipoprotein PsaA- und der RNA-Gehalt der verschiedenen Pneumokokken-Serotypen ermittelt.

Die wesentlichen Befunde unserer Untersuchungen waren: (i) die immunstimulatorische und zytotoxische Aktivität auf Makrophagen variiert zwischen verschiedenen Pneumokokken-Serotypen. (ii) Die Beteiligung einzelner TLRs bei der Erkennung einer Pneumokokken-Exposition weist Serotypen spezifische Unterschiede auf. (iii) Für die immunstimulatorische Wirkung aller Serotypen ist die konzertierte Aktion von TLR 2 und TLR 13 essentiell, während PLY die zytotoxische Wirkung der Serotypen zu vermitteln scheint. (iv) Weder Unterschiede in der PLY-Menge und -Aktivität noch im PsaA- und RNA-Gehalt scheinen für die beobachteten Serotypen spezifischen Differenzen im immunstimulatorischen Potential von Pneumokokken verantwortlich zu sein. Das Lipoprotein PsaA und bakterielle RNA sind bekannte Liganden von TLR 2 und TLR 13 (siehe **1.2.2** und **1.2.3**). Somit zeigten unsere Untersuchungen an primären murinen Makrophagen erstmals, dass die konzertierte Aktion von TLR 2 und TLR 13 für die Erkennung von Pneumokokken entscheidend zu sein scheint. In zukünftigen Untersuchungen muss deren Bedeutung an in vivo Modellen, wie beispielsweise dem der Pneumokokken-Meningitis überprüft werden. Sollten sich die in vitro Befunde in vivo bestätigen lassen, könnten TLR 2 und TLR 13 vielversprechende Angriffspunkte für eine erfolgreiche adjuvante, anti-inflammatorische Behandlung der Pneumokokken-Meningitis beispielsweise mit anti-TLR 2-Antikörpern und Chloroquin, einem Hemmstoff endosomaler TLRs, sein. Da TLR 13 zwar in der Maus, nicht aber im Menschen exprimiert wird, muss in weiteren Analysen an menschlichen Zellen die Funktion endosomaler TLRs überprüft und in der Folge das menschliche Äquivalent von TLR 13 identifiziert werden.

6 Ausblick

Ein Hauptaugenmerk zukünftiger Untersuchungen soll auf der Frage der Übertragbarkeit unserer in vitro-Befunde auf die in vivo-Situation liegen. Dafür sollen Experimente in einem Mausmodell der Pneumokokken-Meningitis durchgeführt werden. Zunächst soll durch Einsatz Gen-defizienter Stämme überprüft werden, ob TLR 2 und TLR 13 in diesem kliniknahen Modell entscheidend zur autodestruktiven Immunreaktion beitragen. Sollte dies der Fall sein, soll in weiteren Versuchsreihen getestet werden, ob durch eine Antagonisierung der entsprechenden TLRs (z.B. mit Chloroquin, einem Hemmstoff endosomaler TLR-Aktivität, plus anti-TLR 2-Antikörpern) der klinische Verlauf der Pneumokokken-Meningitis verbessert werden kann, und zwar im Vergleich zur Standardtherapie mit Dexamethason. Des Weiteren möchten wir in Untersuchungen an primären humanen Monozyten/Makrophagen das humane Äquivalent des murinen TLR 13 identifizieren. Überdies sollen Mechanismen des Pneumokokken-induzierten Makrophagenzelltod und deren Relevanz im in vivo-Modell analysiert und Ursachen der Serotypen spezifischen Unterschiede in der Zytotoxizität und im immunstimulatorischen Potenzial erfasst werden.

7 Anhang

7.1 Medien und Lösungen

Komponente	Menge/ Konzentration	Hersteller
2xSB Buffer		
Tris HCL	1,25 ml 1M	(siehe 7.2)
Glycerin	2 ml	(siehe 7.5)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 ml 20%	(siehe 7.5)
Bromphenolblau	5 ml	(siehe 7.2)
2-Mercaptoethanol	0,5 ml	(siehe 7.5)
Antikörper für Westernblot		
Primär PLY		
Anti-Pneumolysin Antibody	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Antikörper für Westernblot		
Sekundär PLY		
Anti-Rabbit IgG F(ab') ₂ fragment-Peroxidase antibody	1:2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antikörper für Westernblot		
Primär PsaA		
PsaA (SP1650) Antikörper		Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt aus der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie am Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald
Antikörper für Westernblot		
Sekundär PsaA		
Goat anti-Mouse IgG HRP		R&D Systems, Minneapolis, USA
Lösung I		
NaCl	0,15 M NaCl	(siehe 7.5)
Endotoxin-freies Wasser	19,85%	(siehe 7.2)

Percoll	80,15% Percoll	(siehe 7.2)
Lösung II		
NaCl	0,15 M	(siehe 7.5)
Endotoxin-freies Wasser	42,92%	(siehe 7.2)
Percoll	57,08%	(siehe 7.2)
Laufpuffer		
Mes konz. Puffer	50ml	(siehe 7.2)
Destilliertes Wasser	950 ml	(siehe 7.2)
Lysepuffer		
Dithiothreitol (DTT)	10mM	(siehe 7.5)
BSA	0,1%	(siehe 7.2)
Makrophagen-Medium		
DMEM	---	(siehe 7.2)
Fetal Bovine Serum	10%	(siehe 7.2)
Hepes solution	10mM	(siehe 7.2)
Penicillin/Streptomycin	10µg/ml	(siehe 7.2)
M-CSF	50ng/ml	(siehe 7.2)
Makrophagen-Medium ohne		
M-CSF		
DMEM	---	(siehe 7.2)
Fetal Bovine Serum	10%	(siehe 7.2)
Penicillin/Streptomycin	10µg/ml	(siehe 7.2)
NaCl-Lösung 0,2%		
NaCl	0,03 M	(siehe 7.5)
Endotoxin-freies Wasser	---	(siehe 7.2)
NaCl-Lösung 1,2%		
NaCl	0,2 M	(siehe 7.5)
Endotoxin-freies Wasser	---	(siehe 7.2)
PBS-Tween + Milchpulver		
PBS-Tween	500 ml	(siehe 7.2)
Milchpulver	25 g	(siehe 7.2)
Phosphate Buffered Saline		
(PBS) für ELISA		
NaCl	137 mM	(siehe 7.5)
KCl	2.7 mM	(siehe 7.5)

Na ₂ HPO ₄	8.1 mM	(siehe 7.5)
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	(siehe 7.5)
Reagent diluent		
BSA	1%	(siehe 7.2)
PBS	---	(siehe 7.2)
Stimulations-Medium		
DMEM	---	(siehe 7.2)
Nutridoma	1%	(siehe 7.2)
Hepes solution	10 mM	(siehe 7.2)
Penicillin/Streptomycin	10µg/ml	(siehe 7.2)
Stop Solution		
H ₂ SO ₄	2 N	(siehe 7.5)
THY-Flüssigmedium		
Todd-Hewitt-Broth	36,4g/l	(siehe 7.2)
Hefe Extrakt	0,5%	(siehe 7.2)
Transferpuffer		
Transfer Buffer	50 ml	(siehe 7.2)
Methanol	100 ml	(siehe 7.5)
Destilliertes Wasser	850 ml	(siehe 7.2)
Wasch Buffer		
Tween® 20	0.05%	(siehe 7.5)
PBS	---	(siehe 7.2)

7.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Akkutase-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endotoxin-freies Wasser	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Escherichia coli Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Bovines Serum Albumin (FBS)	Gibco by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Gradientengel	NOVEX by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hepes solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

M-CSF	PeptoTech, Rocky Hill, USA
Mes knoz. Puffer	Novex by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Milchpulver	Merck, Darmstadt, Germany
Nigericin	Biomol, Hamburg, Germany
Nutridoma	Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Percoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pneumolysin	Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt aus der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie am Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald
PVDF Membran	Millipore-by Merck, Darmstadt, Germany
Schafsblut, defibriniert	Oxid by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Todd-Hewitt-Bouillon	Roth, Karlsruhe, Germany
Tris-HCl 1 M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

7.3 Technische Geräte und Arbeitsmaterialien

Technische Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank	---	Heraeus, Hanau, Germany
CCD-Kamera	ChemiDoc-It Imaging System	UVP by Analytic Jena, Jena, Germany
Elektronische Pipette	Easypet 3	Eppendorf, Hamurg, Germany
Feinwaage	ABJ 220-4NM	Kern, Balingen-Frommern, Germany
Fuchs-Rosenthal Zählkammer	---	Brand, Wertheim, Germany
Mikroskop	Leitz DM IL	Leitz by Leica, Wetzlar, Germany

Photometer	Ultraspec 500/1100 pro	Amersham by GE Healthcare, Chicago, USA
Pipette 100 – 1000 µl	---	Eppendorf, Hamurg, Germany
Pipette 25 – 250 µl	---	Eppendorf, Hamurg, Germany
Pipette 5 – 20 µl	---	Eppendorf, Hamurg, Germany
Zentrifuge 1	Z360K	Hermle, Gosheim, Germany
Zentrifuge 2	5415R	Eppendorf, Hamurg, Germany

Arbeitsmaterialien

Material	Hersteller
96-well Gewebekulturplatte	Falcon by Corning, Corning, USA
96-well Photometerplatte	Nunc, Roskilde, Denmark
Blutagarplatten	BD, Franklin Lakes, USA
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamurg, Germany
Feinsieb 70µm	Falcon by Corning, Corning, USA
Petrischale 10 ml	Falcon by Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamurg, Germany
Pipettenspitzen 25 – 250 µl	Eppendorf, Hamurg, Germany
Pipettenspitzen 5 – 20 µl	Eppendorf, Hamurg, Germany
Pipettenspitzen 5 ml	Falcon by Corning, Corning, USA
Pipettenspitzen 10 ml	Falcon by Corning, Corning, USA
Plate Sealers	R&D Systems, Minneapolis, USA
Sterile Kanüle 0,5 mm	BD, Franklin Lakes, USA
Spritze 10 ml	BD, Franklin Lakes, USA
Zentrifugationsröhrchen 15 ml	Falcon by Corning, Corning, USA
Zentrifugationsröhrchen 50 ml	Falcon by Corning, Corning, USA

7.4 Verwendete Kits

Typ	Hersteller
Chemiluminescent FemtoMax™ super sensitive HRP substrate	Rockland Immunochemicals, Limerick, USA
LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II	Biovision, Milpitas, USA
Mouse IL-1-beta /IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minneapolis, USA
QuantiFluor® RNA System	Promega, Madison, USA

7.5 Chemikalien

Komponente	CAS-Nummer
C_2H_6OS (2-Mercaptoethanol)	60-24-2
$C_3H_8O_3$ (Glycerin)	56-81-5
$C_4H_{10}O_2S_2$ (Dithiothreitol) (DTT)	7634-42-6
H_2SO_4 (Schwefelsäure)	7664-93-9
KCl (Kaliumchlorid)	7447-40-7
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	7778-77-0
CH_4O (Methanol)	67-56-1
NaCl (Natriumchlorid)	7647-14-5
Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat)	7558-79-4
$C_{12}H_{25}NaO_4S$ (Natriumdodecylsulfat) (SDS)	151-21-3
Octoxinol 9 (Triton™ X-100)	9002-93-1
$C_{36}H_{56}O_8$ (Phorbol-12-myristat-13-acetat) (PMA)	16561-29-8
Polysorbat 20 (Tween® 20)	9005-64-5

8 Literaturverzeichnis

- Adams, Dolph O.; Hamilton, Thomas A. (1984): *The Cell Biology of Macrophage Activation*.
- Akira S, Misawa T, Satoh T, Saitoh T. (2013): Macrophages control innate inflammation. *Diabetes Obes Metab* 2013;15 Suppl 3:10-8.
- Anwar, Muhammad Ayaz; Basith, Shaherin; Choi, Sangdun (2013): Negative regulatory approaches to the attenuation of Toll-like receptor signaling. In: *Experimental & molecular medicine* 45, e11. DOI: 10.1038/emm.2013.28.
- Ariel A, Serhan CN. (2012): New Lives Given by Cell Death: Macrophage Differentiation Following Their Encounter with Apoptotic Leukocytes during the Resolution of Inflammation. *Front Immunol* 2012;3:4.
- Ariffin, Juliana K.; Sweet, Matthew J. (2013): Differences in the repertoire, regulation and function of Toll-like Receptors and inflammasome-forming Nod-like Receptors between human and mouse. In: *Current opinion in microbiology* 16 (3), S. 303–310. DOI: 10.1016/j.mib.2013.03.002.
- Aydin, Suleyman (2015a): A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. In: *Peptides* 72, S. 4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Aydin, Suleyman (2015b): A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. In: *Peptides* 72, S. 4–15. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Benoit, M.; Desnues, B.; Mege, J.-L. (2008): Macrophage Polarization in Bacterial Infections. In: *The Journal of Immunology* 181 (6), S. 3733–3739. DOI: 10.4049/jimmunol.181.6.3733.
- Benton, Kimberly A.; Paton, James C.; Briles, David E. (1997a): Differences in Virulence for Mice among *Streptococcus pneumoniae* Strains of Capsular Types 2, 3, 4, 5, and 6 Are Not Attributable to Differences in Pneumolysin Production.
- Benton, Komberly A.; Paton, James C.; Briles, David E. (1997b): Differences in Virulence for Mice among *Streptococcus pneumoniae* Strains of Capsular Types 2, 3, 4, 5, and 6 Are Not Attributable to Differences in Pneumolysin Production.
- Bergsbaken, Tessa; Fink, Susan L.; Cookson, Brad T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (2), S. 99–109. DOI: 10.1038/nrmicro2070.
- Bergstrom B, Aune MH, Awuh JA, et al. (2015): TLR8 Senses *Staphylococcus aureus* RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN-beta Production via a TAK1-IKKbeta-IRF5 Signaling Pathway. *J Immunol* 2015 Aug 1;195(3):1100-11.
- Berry, A. M.; Yother, J.; Briles, D. E.; Hansman, D.; Paton, J. (1989): Reduced Virulence of a Defined Pneumolysin-Negative Mutant of *Streptococcus pneumoniae*.
- Bewersdorf JP, Grandgirard D, Koedel U, Leib SL (2018): Novel and preclinical treatment strategies in pneumococcal meningitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2018 Feb;31(1):85-92.
- Bewley MA, Marriott HM, Tulone C, et al. (2011): A cardinal role for cathepsin d in co-ordinating the host-mediated apoptosis of macrophages and killing of pneumococci. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001262.
- Bewley MA, Naughton M, Preston J, et al. (2014): Pneumolysin activates macrophage lysosomal membrane permeabilization and executes apoptosis by distinct mechanisms without membrane pore formation. *MBio* 2014;5:e01710-e01714.

- Bischofberger, Mirko; Iacovache, Ioan; van der Goot, F Gisou (2012): Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. In: *Cell host & microbe* 12 (3), S. 266–275. DOI: 10.1016/j.chom.2012.08.005.
- Bradley, T. R.; Metcalf, D. (1966): THE GROWTH OF MOUSE BONE MARROW CELLS IN VITRO. In: *Immunol Cell Biol* 44 (3), S. 287–300. DOI: 10.1038/icb.1966.28.
- Briken V. (2012): "With a little help from my friends": efferocytosis as an antimicrobial mechanism. *Cell Host Microbe* 2012;12:261-3.
- Briles, David E.; Crain, Marilyn J.; Gray, Barry M.; Forman, Colynn; Yother, Janet (1992): Strong Association between Capsular Type and Virulence for Mice among Human Isolates of *Streptococcus pneumoniae*.
- Briles DE, Hollingshead S, Brooks-Walter A, Nabors GS, Ferguson L, Schilling M, Gravenstein S, Braun P, King J, Swift A. (2000): The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. *Vaccine*. 2000 Feb 25;18(16):1707-11.
- Brinkmann, Melanie M.; Spooner, Eric; Hoebe, Kasper; Beutler, Bruce; Ploegh, Hidde L.; Kim, You-Me (2007): The interaction between the ER membrane protein UNC93B and TLR3, 7, and 9 is crucial for TLR signaling. In: *The Journal of cell biology* 177 (2), S. 265–275. DOI: 10.1083/jcb.200612056.
- Broz, P., Dixit, V. (2016): Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16, 407–420 (2016) doi:10.1038/nri.2016.58.
- Buchholz, Grete; Koedel, Uwe; Pfister, Hans-Walter; Kastenbauer, Stefan; Klein, Matthias (2016): Dramatic reduction of mortality in pneumococcal meningitis. In: *Critical care (London, England)* 20 (1), S. 312. DOI: 10.1186/s13054-016-1498-8.
- Cavaillon, Jean-Marc (2011): The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. In: *Journal of leukocyte biology* 90 (3), S. 413–424. DOI: 10.1189/jlb.0211094.
- Cervantes JL, La Vake CJ, Weinerman B, et al. (2013): Human TLR8 is activated upon recognition of *Borrelia burgdorferi* RNA in the phagosome of human monocytes. *J Leukoc Biol* 2013 Dec;94(6):1231-41.
- Evavold, Charles L.; Ruan, Jianbin; Tan, Yunhao; Xia, Shiyu; Wu, Hao; Kagan, Jonathan C. et al. (2017): The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Open ArchivePublished:November 28, 2017DOI:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013.*
- Chow SH, Deo P, Naderer T. (2016): Macrophage cell death in microbial infections. *Cell Microbiol* 2016; 18:466-74.
- Cole J, Aberdein J, Jubrail J, Dockrell DH (2014): The role of macrophages in the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: mechanisms and contrasts. *Adv Microb Physiol* 2014;65:125-202.
- Das, S. K.; Stanley, E. R.; Guilbert, L. J.; Forman, L. W. (1980): Discrimination of a colony stimulating factor subclass by a specific receptor on a macrophage cell line. In: *Journal of cellular physiology* 104 (3), S. 359–366. DOI: 10.1002/jcp.1041040309.
- Davis, Kimberly M.; Nakamura, Shigeki; Weiser, Jeffrey N. (2011): Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 121 (9), S. 3666–3676. DOI: 10.1172/JCI57761.

- Decker, Thomas; Lohmann-Matthes, Marie-Luise (1988): A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. In: *Journal of immunological methods* 115 (1), S. 61–69. DOI: 10.1016/0022-1759(88)90310-9.
- Deshmukh, Sachin D.; Kremer, Bernhard; Freudenberg, Marina; Bauer, Stefan; Golenbock, Douglas T.; Henneke, Philipp (2011): Macrophages recognize streptococci through bacterial single-stranded RNA. In: *EMBO reports* 12 (1), S. 71–76. DOI: 10.1038/embor.2010.189.
- Dessing, Mark C.; Hirst, Robert A.; Vos, Alex F. de; van der Poll, Tom (2009): Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. In: *PloS one* 4 (11), e7993. DOI: 10.1371/journal.pone.0007993.
- Dinarello, Charles A. (1997): Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997 Dec;8(4):253-65. DOI: 10.1016/s1359-6101(97)00023-3.
- Dorrington MG, Roche AM, Chauvin SE, Tu Z, Mossman KL, Weiser JN, Bowdish DM. (2013): MARCO is required for TLR2- and Nod2-mediated responses to *Streptococcus pneumoniae* and clearance of pneumococcal colonization in the murine nasopharynx. *J Immunol.* 2013 Jan 1;190(1):250-8.
- Draing, Christian; Pfitzenmaier, Markus; Zummo, Sebastiana; Mancuso, Giuseppe; Geyer, Armin; Hartung, Thomas; Aulock, Sonja von (2006): Comparison of lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (45), S. 33849–33859. DOI: 10.1074/jbc.M602676200.
- Drijkoningen, J. J. C.; Rohde, G. G. U. (2014): Pneumococcal infection in adults: burden of disease. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20 Suppl 5, S. 45–51. DOI: 10.1111/1469-0691.12461.
- Eigenbrod, Tatjana; Dalpke, Alexander H. (2015): Bacterial RNA: An Underestimated Stimulus for Innate Immune Responses. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (2), S. 411–418. DOI: 10.4049/jimmunol.1500530.
- Eigenbrod, Tatjana; Franchi, Luigi; Munoz-Planillo, Raul; Kirschning, Carsten J.; Freudenberg, Marina A.; Nunez, Gabriel; Dalpke, Alexander (2012): Bacterial RNA mediates activation of caspase-1 and IL-1 β release independently of TLRs 3, 7, 9 and TRIF but is dependent on UNC93B. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (1), S. 328–336. DOI: 10.4049/jimmunol.1103258.
- Eigenbrod, Tatjana; Pelka, Karin; Latz, Eicke; Kreikemeyer, Bernd; Dalpke, Alexander H. (2015): TLR8 Senses Bacterial RNA in Human Monocytes and Plays a Nonredundant Role for Recognition of *Streptococcus pyogenes*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 195 (3), S. 1092–1099. DOI: 10.4049/jimmunol.1403173.
- Echchannaoui Echchannaoui,1Karl Frei,3Christian Schnell,2Stephen L. Leib,4Werner Zimmerli,1and Regine Landmann (2002) Toll-Like Receptor 2–Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Streptococcus pneumoniae* Meningitis because of Reduced Bacterial Clearing and Enhanced Inflammation *H JID* (2002).
- Fang R, Tsuchiya K, Kawamura I, et al. (2011): Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol* 2011;187:4890-9.
- Feldman, C.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Boulnois, G. J.; Read, R. C.; Todd, H. C. et al. (1990): The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro.

- Feldman, Charles; Anderson, Ronald (2014): Review: current and new generation pneumococcal vaccines. In: *The Journal of infection* 69 (4), S. 309–325. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.06.006.
- Feldman, Charles; Anderson, Ronald (2016): Epidemiology, virulence factors and management of the pneumococcus. In: *F1000Research* 5, S. 2320. DOI: 10.12688/f1000research.9283.1.
- Fieber, Christina; Janos, Marton; Koestler, Tina; Gratz, Nina; Li, Xiao-Dong; Castiglia, Virginia et al. (2015): Innate immune response to *Streptococcus pyogenes* depends on the combined activation of TLR13 and TLR2. In: *PloS one* 10 (3), e0119727. DOI: 10.1371/journal.pone.0119727.
- Franken, Lars; Schiwon, Marzena; Kurts, Christian (2016): Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. In: *Cellular microbiology* 18 (4), S. 475–487. DOI: 10.1111/cmi.12580.
- Garbers C, Heink S, Korn T, Rose-John S (2018): Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat Rev Drug Discov.* 2018 Jun;17(6):395-412.
- Gay, Nicholas J.; Gangloff, Monique; O'Neill, Luke A. J. (2011): What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. In: *Trends in Immunology* 32 (3), S. 104–109. DOI: 10.1016/j.it.2010.12.005.
- Geno, K. Aaron; Gilbert, Gwendolyn L.; Song, Joon Young; Skovsted, Ian C.; Klugman, Keith P.; Jones, Christopher et al. (2015): Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. In: *Clinical microbiology reviews* 28 (3), S. 871–899. DOI: 10.1128/CMR.00024-15.
- Geldhoff, M. et al. (2013): Inflammasome activation mediates inflammation and outcome in humans and mice with pneumococcal meningitis. *BMC Infect. Dis.* 13, 358 (2013).
- Gilley, Ryan P.; Gonzalez-Juarbe, Norberto; Shenoy, Anukul T.; Reyes, Luis F.; Dube, Peter H.; Restrepo, Marcos I.; Orihuela, Carlos J. (2016): Infiltrated Macrophages Die of Pneumolysin-Mediated Necroptosis following Pneumococcal Myocardial Invasion. In: *Infection and Immunity* 84 (5), S. 1457–1469. DOI: 10.1128/IAI.00007-16.
- Gisch, Nicolas; Kohler, Thomas; Ulmer, Artur J.; Muthing, Johannes; Pribyl, Thomas; Fischer, Kathleen et al. (2013): Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* Lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (22), S. 15654–15667. DOI: 10.1074/jbc.M112.446963.
- Gonzalez-Juarbe, Norberto; Gilley, Ryan Paul; Hinojosa, Cecilia Anahi; Bradley, Kelley Margaret; Kamei, Akinobu; Gao, Geli et al. (2015): Pore-Forming Toxins Induce Macrophage Necroptosis during Acute Bacterial Pneumonia. In: *PLoS pathogens* 11 (12), e1005337. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005337.
- Gordon S, Pluddemann A, Martinez EF. (2014): Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 2014;262:36-55.
- Grabenstein, John D.; Musey, Luwy K. (2014): Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults. In: *Vaccine* 32 (21), S. 2399–2405. DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.02.096.
- Greenberger, Joel S.; Newburger, Peter E.; Sakakeeny Maryann (1980): Phorbol Myristate Acetate Stimulates Macrophage Differentiation and Replication and Alters Granulopoiesis and Leukemogenesis in Long-Term Bone Marrow Cultures.
- Greene, Neil G.; Narciso, Ana R.; Filipe, Sergio R.; Camilli, Andrew (2015): Peptidoglycan Branched Stem Peptides Contribute to *Streptococcus pneumoniae* Virulence by Inhibiting Pneumolysin Release. In: *PLoS pathogens* 11 (6), e1004996. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004996.

He, W., Wan, H., Hu, L. et al. (2015): Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res* 25, 1285–1298 (2015). <https://doi.org/10.1038/cr.2015.139>.

Han, S. H.; Kim, J. H.; Martin, M.; Michalek, S. M.; Nahm, M. H. (2003): Pneumococcal Lipoteichoic Acid (LTA) Is Not as Potent as Staphylococcal LTA in Stimulating Toll-Like Receptor 2. In: *Infection and Immunity* 71 (10), S. 5541–5548. DOI: 10.1128/IAI.71.10.5541-5548.2003.

Harvey, Richard M.; Hughes, Catherine E.; Paton, Adrienne W.; Trappetti, Claudia; Tweten, Rodney K.; Paton, James C. (2014): The impact of pneumolysin on the macrophage response to *Streptococcus pneumoniae* is strain-dependent. In: *PloS one* 9 (8), e103625. DOI: 10.1371/journal.pone.0103625.

Hasbun, R., N. Rosenthal, J. M. Balada-Llasat, J. Chung, S. Duff, S. Bozzette, L. Zimmer, and C. C. Ginocchio. 2017. Epidemiology of Meningitis and Encephalitis in the United States from 2011-2014. *Clin. Infect. Dis.* 65: 359-363.

Hedayat M, Netea MG, Rezaei N (2011): Targeting of Toll-like receptors: a decade of progress in combating infectious diseases. *Lancet Infect Dis.* 2011 Sep;11(9):702-12.

Helenius, Ari; Simons, Kai (1975): SOLUBILIZATION OF MEMBRANES BY DETERGENTS.

Herzenberg, Leonard A.; Parks, David; Sahaf, Bits; Perez, Omar; Roederer, Mario; Herzenberg, Leonore (2002): The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford.

Heumann, D.; Barras, C.; Severin, A.; Glauser, M. P.; Tomasz, A. (1994): Gram-Positive Cell Walls Stimulate Synthesis of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 by Human Monocytes.

Heß N, Waldow F, Kohler TP, Rohde M, Kreikemeyer B, Gómez-Mejía A, Hain T, Schwudke D, Vollmer W, Hammerschmidt S, Gisch N. (2017): Lipoteichoic acid deficiency permits normal growth but impairs virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Heß N, Waldow F, Kohler TP, Rohde M, Kreikemeyer B, Gómez-Mejía A, Hain T, Schwudke D, Vollmer W, Hammerschmidt S, Gisch N. *Nat Commun.* 2017 Dec 12;8(1):2093.

Hidmark, Asa; Saint Paul, Antonia von; Dalpke, Alexander H. (2012): Cutting edge: TLR13 is a receptor for bacterial RNA. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 189 (6), S. 2717–2721. DOI: 10.4049/jimmunol.1200898.

Hirst R A, Kadioglu A, Callaghan C O, and Andrew P W (2004): The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis (*Clin Exp Immunol.*) 138(2), S. 195–201. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02611.

Hirst, Robert A.; Gosai, Bejal; Rutman, Andrew; Guerin, Christopher J.; Nicotera, Pierluigi; Andrew, Peter W.; O'Callaghan, Christopher (2008): *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. In: *The Journal of infectious diseases* 197 (5), S. 744–751. DOI: 10.1086/527322.

Hoebe, Kasper; Janssen, Edith; Beutler, Bruce (2004): The interface between innate and adaptive immunity. In: *Nature immunology* 5 (10), S. 971–974. DOI: 10.1038/ni1004-971.

Hoegen, Tobias; Tremel, Nadin; Klein, Matthias; Angele, Barbara; Wagner, Hermann; Kirschning, Carsten et al. (2011): The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 187 (10), S. 5440–5451. DOI: 10.4049/jimmunol.1100790.

Hommel TJ, van Lieshout MH, van 't Veer C, Florquin S, Bootsma HJ, Hermans PW, de Vos AF, van der Poll T. (2015): Role of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Containing (NOD) 2 in Host Defense during Pneumococcal Pneumonia. *PLoS One.* 2015 Dec 16;10(12):e0145138.

Hoshino, Katsuaki; Takeuchi, Osamu; Kawai, Taro; Sanjo, Hideki; Ogawa, Tomohiko; Takeda, Yoshifumi et al. (1999): Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product.

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

Hyams, Catherine; Camberlein, Emilie; Cohen, Jonathan M.; Bax, Katie; Brown, Jeremy S. (2010): The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *In: Infection and Immunity* 78 (2), S. 704–715. DOI: 10.1128/IAI.00881-09.

Janeway, Charles A., JR (1989): Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology.

Janeway, Charles A., JR; Medzhitov, Ruslan (2002): Innate immune recognition. *In: Annual review of immunology* 20, S. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Jim KK, Engelen-Lee J, van der Sar AM, Bitter W, Brouwer MC, van der Ende A, Veening JW, van de Beek D, Vandenbroucke-Grauls CM (2016): Infection of zebrafish embryos with live fluorescent *Streptococcus pneumoniae* as a real-time pneumococcal meningitis model. *In: J Neuroinflammation*. 2016 Aug 19;13(1):188.

Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. (2017): Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:151-164.

Jurk, Marion; Heil, Florian; Vollmer, Jorg; Schetter, Christian; Krieg, Arthur M.; Wagner, Hermann et al. (2002): Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *In: Nature immunology* 3 (6), S. 499. DOI: 10.1038/ni0602-499.

Kadioglu, Aras; Weiser, Jeffrey N.; Paton, James C.; Andrew, Peter W. (2008): The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *In: Nature reviews. Microbiology* 6 (4), S. 288–301. DOI: 10.1038/nrmicro1871.

Kang TB, Yang SH, Toth B, Kovalenko A, Wallach D. (2014): Activation of the NLRP3 inflammasome by proteins that signal for necroptosis. *Methods Enzymol* 2014;545:67-81.

Kawai T, Akira S (2011): Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011 May 27;34(5):637-50.

Kielian, Margaret C.; Cohn, Zanvil A. (1981): PHORBOL MYRISTATE ACETATE STIMULATES PHAGOSOME- LYSOSOME FUSION IN MOUSE MACROPHAGES.

Kim, You-Me; Brinkmann, Melanie M.; Paquet, Marie-Eve; Ploegh, Hidde L. (2008): UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *In: Nature* 452 (7184), S. 234–238. DOI: 10.1038/nature06726.

Kim JY, Paton JC, Briles DE, Rhee DK, Pyo S. (2015a): *Streptococcus pneumoniae* induces pyroptosis through the regulation of autophagy in murine microglia. *Oncotarget* 2015 Dec 13;6:44161-44178.

Kim ND, Luster AD. (2015): The role of tissue resident cells in neutrophil recruitment. *Trends Immunol* 2015;36:547-55.

Kirkham, Lea-Ann S.; Jefferies, Johanna M. C.; Kerr, Alison R.; Jing, Yu; Clarke, Stuart C.; Smith, Andrew; Mitchell, Tim J. (2006): Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *In: Journal of clinical microbiology* 44 (1), S. 151–159. DOI: 10.1128/JCM.44.1.151-159.2006.

Klein, Matthias; Obermaier, Bianca; Angele, Barbara; Pfister, Hans-Walter; Wagner, Hermann; Koedel, Uwe; Kirschning, Carsten J. (2008): Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. In: *The Journal of infectious diseases* 198 (7), S. 1028–1036. DOI: 10.1086/591626.

Koedel, U.; Angele, B.; Rupprecht, T.; Wagner, H.; Roggenkamp, A.; Pfister, H.-W.; Kirschning, C. J. (2003): Toll-Like Receptor 2 Participates in Mediation of Immune Response in Experimental Pneumococcal Meningitis. In: *The Journal of Immunology* 170 (1), S. 438–444. DOI: 10.4049/jimmunol.170.1.438.

Koedel, Uwe; Klein, Matthias; Pfister, Hans-Walter (2010a): Modulation of brain injury as a target of adjunctive therapy in bacterial meningitis. In: *Current infectious disease reports* 12 (4), S. 266–273. DOI: 10.1007/s11908-010-0116-1.

Koedel, Uwe; Klein, Matthias; Pfister, Hans-Walter (2010b): New understandings on the pathophysiology of bacterial meningitis. In: *Current opinion in infectious diseases* 23 (3), S. 217–223. DOI: 10.1097/QCO.0b013e328337f49e.

Koedel, Uwe; Merbt, Ulrike Michaela; Schmidt, Caroline; Angele, Barbara; Popp, Bernadette; Wagner, Hermann et al. (2007): Acute brain injury triggers MyD88-dependent, TLR2/4-independent inflammatory responses. In: *The American journal of pathology* 171 (1), S. 200–213. DOI: 10.2353/ajpath.2007.060821.

Koedel, Uwe; Rupprecht, Tobias; Angele, Barbara; Heesemann, Juergen; Wagner, Hermann; Pfister, Hans-Walter; Kirschning, Carsten J. (2004): MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. In: *Brain : a journal of neurology* 127 (Pt 6), S. 1437–1445. DOI: 10.1093/brain/awh171.

Koedel, Uwe; Winkler, Frank; Angele, Barbara; Fontana, Adriano; Flavell, Richard A.; Pfister, Hans-Walter (2002): Role of Caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: Evidence from pharmacologic Caspase inhibition and Caspase-1-deficient mice. In: *Annals of neurology* 51 (3), S. 319–329.

Kolaczkowska E, Kubes P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;13:159-75.

Kolter J, Feuerstein R, Spoeri E, et al. (2016): Streptococci Engage TLR13 on Myeloid Cells in a Site-Specific Fashion. *J Immunol* 2016 Mar 15;196(6):2733-41.

Koppe, Uwe; Suttorp, Norbert; Opitz, Bastian (2012): Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. In: *Cellular microbiology* 14 (4), S. 460–466. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01746.x.

Korzeniewski, Carol; Callewaert, Denis M. (1983): An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. In: *Journal of immunological methods* 64 (3), S. 313–320. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90438-6.

Kruger, Anne; Oldenburg, Marina; Chebrolu, Chiranjeevi; Beisser, Daniela; Kolter, Julia; Sigmund, Anna M. et al. (2015): Human TLR8 senses UR/URR motifs in bacterial and mitochondrial RNA. In: *EMBO reports* 16 (12), S. 1656–1663. DOI: 10.15252/embr.201540861.

Kumar H, Kawai T, Akira S. (2011): Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*. 2011 Feb; 30(1):16-34.

Labonte, Adam C.; Tosello-Tramont, Annie-Carole; Hahn, Young S. (2014): The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. In: *Molecules and cells* 37 (4), S. 275–285. DOI: 10.14348/molcells.2014.2374.

- Lee, Bettina L.; Moon, Joanne E.; Shu, Jeffrey H.; Yuan, Lin; Newman, Zachary R.; Schekman, Randy; Barton, Gregory M. (2013): UNC93B1 mediates differential trafficking of endosomal TLRs. DOI: 10.7554/eLife.00291.001.
- Lee, Katherine S.; Scanga, Charles A.; Bachelder, Eric M.; Chen, Quanyi; Snapper, Clifford M. (2007): TLR2 synergizes with both TLR4 and TLR9 for induction of the MyD88-dependent splenic cytokine and chemokine response to *Streptococcus pneumoniae*. In: *Cellular immunology* 245 (2), S. 103–110. DOI: 10.1016/j.cellimm.2007.04.003.
- Ley K, Pramod AB, Croft M, Ravichandran KS, Ting JP. (2016): How Mouse Macrophages Sense What Is Going On. *Front Immunol* 2016;7:204.
- Li XD, Chen ZJ. (2012): Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* 2012;1:e00102.
- Liu X, Chauhan VS, Young AB, Marriott I. (2010): NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia*. 2010 May;58(7):839-47.
- Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. (2011): Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol* 2011;41:2503-8.
- Liddiard K, Taylor PR. (2015): Understanding local macrophage phenotypes in disease: shape-shifting macrophages. *Nat Med* 2015 Feb;21(2):119-20.
- Lloyd, Catherine M.; Phillips, Anthony R. J.; Cooper, Garth J. S.; Dunbar, P. Rod (2008): Three-colour fluorescence immunohistochemistry reveals the diversity of cells staining for macrophage markers in murine spleen and liver. In: *Journal of immunological methods* 334 (1-2), S. 70–81. DOI: 10.1016/j.jim.2008.02.005.
- Malley, Richard; Henneke, Philipp; Morse, Sarah C.; Cieslewicz, Michael J.; Lipsitch, Marc; Thompson, Claudette M. et al. (2003): Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection.
- Mansell, Ashley; Jenkins, Brendan J. (2013): Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. In: *Cytokine & growth factor reviews* 24 (3), S. 249–256. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.03.007.
- Marriott HM, Dockrell DH. (2006): *Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:1848-54.
- Martner, Anna; Dahlgren, Claes; Paton, James C.; Wold, Agnes E. (2008): Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. In: *Infection and Immunity* 76 (9), S. 4079–4087. DOI: 10.1128/IAI.01747-07.
- McNeela, Edel A.; Burke, Aine; Neill, Daniel R.; Baxter, Cathy; Fernandes, Vitor E.; Ferreira, Daniela et al. (2010): Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. In: *PLoS pathogens* 6 (11), e1001191. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001191.
- Medzhitov, Ruslan (2008): Origin and physiological roles of inflammation. In: *Nature* 454 (7203), S. 428–435. DOI: 10.1038/nature07201.
- Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A., JR (2000): Innate immune recognition: mechanisms and pathways.

Medzhitov, Ruslan; Preston-Hurlburt, Paula; Janeway Charles A. (1997a): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Medzhitov, Ruslan; Preston-Hurlburt, Paula; Janeway, Charles A., JR (1997b): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity.

Mellroth, Peter; Daniels, Robert; Eberhardt, Alice; Ronnlund, Daniel; Blom, Hans; Widengren, Jerker et al. (2012): LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (14), S. 11018–11029. DOI: 10.1074/jbc.M111.318584.

Mercurio, Arthur M.; Shawn, Leslie M. (1988): Macrophage Interactions with Laminin: PMA Selectively Induces the Adherence and Spreading of Mouse Macrophages on a Laminin Substratum.

Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. (2017): Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol* 2017;61:3-11.

Mitchell A.M.; Mitchell T.J. (2010): *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. In: *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 16, Issue 5, May 2010, Pages 411-418.

Mogensen, Trine H.; Paludan, Soren R.; Kilian, Mogens; Ostergaard, Lars (2006): Live *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria meningitidis* activate the inflammatory response through Toll-like receptors 2, 4, and 9 in species-specific patterns. In: *Journal of leukocyte biology* 80 (2), S. 267–277. DOI: 10.1189/jlb.1105626.

Moresco EM, LaVine D, Beutler B. (2011): Toll-like receptors. *Curr Biol*. 2011 Jul 12;21(13):R488-93.

Murray PJ. (2017): Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol*. 2017 Feb 10;79:541-566.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. (2014): Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 2014 Jul 17;41(1):14-20.

Nardo, Dominic de (2015): Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. In: *Cytokine* 74 (2), S. 181–189. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.02.025.

Nau, Gerard J.; Richmond, Joan F. L.; Schlesinger, Ann; Jennings, Ezra G.; Lander, Eric S.; Young, Richard A. (2002): Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3), S. 1503–1508. DOI: 10.1073/pnas.022649799.

Neal, Burnette W. (1980): "Western Blotting": Electrophoretic Transfer of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Unmodified Nitrocellulose and Radiographic Detection with Antibody and Radioiodinated Protein A.

Nishibayashi R, Inoue R, Harada Y, Watanabe T, Makioka Y, Ushida K. (2015): RNA of *Enterococcus faecalis* Strain EC-12 Is a Major Component Inducing Interleukin-12 Production from Human Monocytic Cells. *PLoS One* 2015;10(6):e0129806.

Oldenburg, Marina; Krüger, Anne; Ferstl, Ruth; Kaufmann, Andreas; Nees, Gernot; Sigmund, Anna et al. (2012): TLR13 Recognizes Bacterial 23S rRNA Devoid of Erythromycin Resistance-Forming Modification. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6098), S. 1107–1111. DOI: 10.1126/science.1220761.

Opitz, B. et al. (2004): Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 279, 36426–36432.

O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. (2013): The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun; 13(6):453-60.

- Pahl, H. L. (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. In: *Oncogene* 18 (49), S. 6853–6866. DOI: 10.1038/sj.onc.1203239.
- Palaniappan R, Singh S, Singh UP, Sakthivel SK, Ades EW, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Sampson JS, Lillard JW Jr. (2005): Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. *Infect Immun.* 2005 Feb;73(2):1006-13.
- Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 2015;517:311-20.
- Paton, James C.; Rowan-Kelly, Brenton; Ferrante, Antonio (1984): Activation of Human Complement by the Pneumococcal Toxin Pneumolysin.
- Pelka, Karin; Bertheloot, Damien; Reimer, Elisa; Phulphagar, Kshiti; Schmidt, Susanne V.; Christ, Anette et al. (2018): The Chaperone UNC93B1 Regulates Toll-like Receptor Stability Independently of Endosomal TLR Transport. In: *Immunity* 48 (5), 911-922.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.011.
- Poltorak, Alexander; He, Xiaolong; Smirnova, Irina; Liu, Mu-Ya; van Huffel, Christophe; Du, Xin et al. (1998): Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene.
- Rajam, Gowrisankar; Anderton, Julie M.; Carlone, George M.; Sampson, Jacquelyn S.; Ades, Edwin W. (2008): Pneumococcal Surface Adhesin A (PsaA): A Review.
- Reiss A, Braun JS, Jäger K, Freyer D, Laube G, Bühner C, Felderhoff-Müser U, Stadelmann C, Nizet V, Weber JR (2011): Bacterial pore-forming cytolysins induce neuronal damage in a rat model of neonatal meningitis. *J Infect Dis.* 2011 Feb 1;203(3):393-400.
- Riesenfeld-Orn, I.; Wolpe, S.; Garcia-Bustos, J. F.; Hoffmann, M. K.; Tuomanen, E. (1989): Production of Interleukin-1 but Not Tumor Necrosis Factor by Human Monocytes Stimulated with Pneumococcal Cell Surface Components.
- Rose-John S. (2018): Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Feb 1;10(2).pii: a028415.
- Rubins, J. B.; Charboneau, D.; Paton, J. C.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Janoff, E. N. (1995): Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. In: *The Journal of clinical investigation* 95 (1), S. 142–150. DOI: 10.1172/JCI117631.
- Sander, L.E. et al. (2011): Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature* 474, 385-389.
- Schaper F, Rose-John S. (2015): Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct;26(5):475-87.
- Schmidt F, Kakar N, Meyer TC, Depke M, Masouris I, Burchhardt G, Gómez-Mejía A, Dhople V, Håvarstein LS, Sun Z, Moritz RL, Völker U, Koedel U, Hammerschmidt S. (2019): In vivo proteomics identifies the competence regulon and AliB oligopeptide transporter as pathogenic factors in pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog.* 2019 Jul 29;15(7):e1007987.
- Schroder, Kate; Tschopp, Jurg (2010): The inflammasomes. In: *Cell* 140 (6), S. 821–832. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.040.
- Schroder, Nicolas W. J.; Morath, Siegfried; Alexander, Christian; Hamann, Lutz; Hartung, Thomas; Zahringer, Ulrich et al. (2003): Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (18), S. 15587–15594. DOI: 10.1074/jbc.M212829200.

- Schwartz YS, Svistelnik AV. (2012): Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype. *Biochemistry (Mosc)* 2012 ;77:246-60.
- Seyoum, Beza; Yano, Masahide; Pirofski, Liise-anne (2011): The innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the lung depends on serotype and host response. In: *Vaccine* 29 (45), S. 8002–8011. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.064.
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. (2018): Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018 Sep;233(9):6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429. Epub 2018 Mar 1.
- Shoma S, Tsuchiya K, Kawamura I, Nomura T, Hara H, Uchiyama R, Daim S, Mitsuyama M (2008): Critical involvement of pneumolysin in production of interleukin-1alpha and caspase-1-dependent cytokines in infection with *Streptococcus pneumoniae* in vitro: a novel function of pneumolysin in caspase-1 activation. *Infect Immun.* 2008 Apr;76(4):1547-57.
- Sica A, Mantovani A. (2012): Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-95.
- Signorino G, Mohammadi N, Patane F, et al. (2014): Role of TLR13 in innate immune recognition of group B streptococci. *Infect Immun* 2014 Dec;82(12):5013-22.
- Smith, Bonita M.; Sturm, Robert J.; Carchman, Richard A. (1983): Calcium Modulation of Phorbol Ester-induced Alterations in Murine Macrophage Morphology.
- Song, Joon Young; Nahm, Moon H.; Moseley, M. Allen (2013): Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. In: *Journal of Korean medical science* 28 (1), S. 4–15. DOI: 10.3346/jkms.2013.28.1.4.
- Spelmink L, Sender V, Hentrich K, Kuri T, Plant L, Henriques-Normark B (2016): Toll-Like Receptor 3/TRIF-Dependent IL-12p70 Secretion Mediated by *Streptococcus pneumoniae* RNA and Its Priming by Influenza A Virus Coinfection in Human Dendritic Cells. *MBio.* 2016 Mar 8;7(2):e00168-16.
- Stanley, E. Richard (2009): Lineage commitment: cytokines instruct, at last! In: *Cell stem cell* 5 (3), S. 234–236. DOI: 10.1016/j.stem.2009.08.015.
- Stephenson HN, Herzig A, Zychlinsky A. (2016): Beyond the grave: When is cell death critical for immunity to infection? *Curr Opin Immunol* 2016;38:59-66.
- Sundberg-Kovamees, Marianne; Grunewald, Johan; Wahlstrom, Jan (2016): Immune cell activation and cytokine release after stimulation of whole blood with pneumococcal C-polysaccharide and capsular polysaccharides. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 52, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.07.004.
- Swanson, Joel A. (1989): Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages.
- Tabeta, Koichi; Hoebe, Kasper; Janssen, Edith M.; Du, Xin; Georgel, Philippe; Crozat, Karine et al. (2006): The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. In: *Nature immunology* 7 (2), S. 156–164. DOI: 10.1038/ni1297.
- Takeuchi and Akira (2002): MyD88 as a bottle neck in Toll/IL-1 signaling
- Takeuchi, O. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. In: *International Immunology* 13 (7), S. 933–940. DOI: 10.1093/intimm/13.7.933.

Takeuchi, O.; Sato, S.; Horiuchi, T.; Hoshino, K.; Takeda, K.; Dong, Z. et al. (2002): Cutting Edge. Role of Toll-Like Receptor 1 in Mediating Immune Response to Microbial Lipoproteins. In: *The Journal of Immunology* 169 (1), S. 10–14. DOI: 10.4049/jimmunol.169.1.10.

Tomlinson G, Chimalapati S, Pollard T, Lapp T, Cohen J, Camberlein E, Stafford S, Periselneris J, Aldridge C, Vollmer W, Picard C, Casanova JL, Noursadeghi M, Brown J. (2014): TLR-mediated inflammatory responses to *Streptococcus pneumoniae* are highly dependent on surface expression of bacterial lipoproteins. *J Immunol*. 2014 Oct 1;193(7):3736-45.

Tuomanen, Elaine; Liu, Hans; Hengstler, Bruno; Zak, Oto; Tomasz, Alexander (1985): The Induction of Meningeal Inflammation by Components of the Pneumococcal Cell Wall.

Tweten, Rodney K. (2005): Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. In: *Infection and Immunity* 73 (10), S. 6199–6209. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6199-6209.2005.

van de Beek, Diederik; Brouwer, Matthijs; Hasbun, Rodrigo; Koedel, Uwe; Whitney, Cynthia G.; Wijdicks, Eelco (2016): Community-acquired bacterial meningitis. In: *Nature reviews. Disease primers* 2, S. 16074. DOI: 10.1038/nrdp.2016.74.

van der Poll, Tom; Opal, Steven M. (2009): Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. In: *The Lancet* 374 (9700), S. 1543–1556. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61114-4.

van Furth, R.; Cohn, Z. A.; Hirsch, J. G.; Humphrey, J. H.; Spector, W. G.; Langevoort, H. L. (1972): The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells.

Varol, Chen; Mildner, Alexander; Jung, Steffen (2015): Macrophages: development and tissue specialization. In: *Annual review of immunology* 33, S. 643–675. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032414-112220.

Verschoor CP, Puchta A, Bowdish DM. (2012): The macrophage. *Methods Mol Biol* 2012;844:139-56.

Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. (2018): Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*. 2018 Jan 2;37(1):20-36.

Vijay, Kumar (2018): Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. In: *International immunopharmacology* 59, S. 391–412. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.03.002.

Wall EC, Gordon SB, Hussain S, Goonetilleke UR, Gritzfeld J, Scarborough M, Kadioglu A. (2012): Persistence of pneumolysin in the cerebrospinal fluid of patients with pneumococcal meningitis is associated with mortality. *Clin Infect Dis*. 2012 Mar 1;54(5):701-5.

Wallach D, Kang TB, Dillon CP, Green DR. (2016): Programmed necrosis in inflammation: Toward identification of the effector molecules. *Science* 2016;352:aaf2154.

Wang Y, Liu X, Liu Q. (2018): NOD2 Expression in *Streptococcus pneumoniae* Meningitis and Its Influence on the Blood-Brain Barrier. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018 Aug 13;2018:7292084.

Weinberger, Daniel M.; Harboe, Zitta B.; Sanders, Elisabeth A. M.; Ndiritu, Moses; Klugman, Keith P.; Ruckinger, Simon et al. (2010): Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. In: *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51 (6), S. 692–699. DOI: 10.1086/655828.

- Wippel C, Maurer J, Förtsch C, Hupp S, Bohl A, Ma J, Mitchell TJ, Bunkowski S, Brück W, Nau R, Iliev AI. (2013): Bacterial cytolysin during meningitis disrupts the regulation of glutamate in the brain, leading to synaptic damage. *PLoS Pathog.* 2013;9(6):e1003380.
- Witzenrath, Martin; Pache, Florence; Lorenz, Daniel; Koppe, Uwe; Gutbier, Birgitt; Tabeling, Christoph et al. (2011): The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. In: *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 187 (1), S. 434–440. DOI: 10.4049/jimmunol.1003143.
- Wolf J, Rose-John S, Garbers C. (2014): Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine.* 2014 Nov;70(1):11-20.
- WHO (2007): WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, NO. 12, 23 MARCH 2007, 82nd YEAR / No. 12,2007,82, 93–104.
- Wynn TA, Vannella KM. (2016): Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* 2016;44:450-62.
- Yamamoto, Masahiro; Shintaro, Sato; Hemmi, Hiroaki; Hoshino, Katsuaki; Kaisho, Tsuneyasu; Sanjo, Hideki et al. (2003): Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway.
- Yoshimura, Atsutoshi; Lien, Egil; Ingalls, Robin R.; Tuomanen, Elaine; Dziarski, Roman; Golenbock, Douglas (1999): Cutting Edge: Recognition of Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components by the Innate Immune System Occurs Via Toll-Like Receptor 2.
- Yuan J, Najafov A, Py BF. (2016): Roles of Caspases in Necrotic Cell Death. *Cell* 2016 15;167:1693-704.
- Zheng Y, Shang F, An L, Zhao H, Liu X (2018): NOD2-RIP2 contributes to the inflammatory responses of mice in vivo to *Streptococcus pneumoniae*. *Neurosci Lett.* 2018 Apr 3;671:43-49.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Uwe Ködel bedanken. Der Dank gilt insbesondere der hervorragenden Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit sowie der geduldigen und freundlichen Art bei der Beantwortung meiner Fragen und den hilfreichen Korrekturen.

Zudem möchte ich auch Frau Barbara Angele recht herzlich danken, welche mir mit Zeit und Geduld die für die Erstellung dieser Arbeit notwendigen laborchemischen Methoden vermittelt sowie mir stets bei Problemen im Laboralltag weitergeholfen hat.

Ferner gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans-Walter Pfister für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe Neuroinfektiologie sowie dem gesamten Team für die gute Arbeitsatmosphäre im Labor.

Weiter danke ich Herrn Prof. Dr. Sven Hammerschmidt aus der Abteilung für Molekulare Genetik und Infektionsbiologie am Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der Universität Greifswald sowie Herrn Prof. Dr. Kirschning vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen für die gute Zusammenarbeit und Bereitstellung von Arbeitsmaterialien.

Vielen Dank ganz besonders an meine Frau und meinen Sohn, welche viele Stunden der Abwesenheit durch meine Arbeit geduldig mitgetragen sowie mich stets unterstützt haben. Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für die Motivation und den Glauben an mich.

10 Eidesstattliche Versicherung

Philipp, Oldemeier

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Die Rolle von Toll-like Rezeptoren bei der Erkennung von *Streptococcus pneumoniae* durch murine Knochenmarksmakrophagen

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach Ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Unterhaching, 22.02.2021

Philipp Oldemeier

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand