

**Interaktion von Pneumokokken mit Abwehrzellen des
Immunsystems:
Die Bedeutung bakterieller Virulenzfaktoren bei der
Phagozytose, dem intrazellulären Überleben und der
induzierten Immunantwort**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dipl. Biol.
Nadja Noske
aus Aschaffenburg

Oktober 2008



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter: Prof. Dr. Sven Hammerschmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kuhn

3. Gutachter: Dr. Ulrike Kämmerer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt wurde.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

München, Oktober 2008

Nadja Noske

Meiner Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 2004 bis Oktober 2008 in der Arbeitsgruppe und unter der Betreuung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt am Zentrum für Infektionsforschung (Vorstand: Prof. Dr. J. Hacker) der Universität Würzburg und am Max-von-Pettenkoferinstitut der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. J. Heesemann) angefertigt.

Prof. Dr. Sven Hammerschmidt danke ich für die engagierte Betreuung dieser Arbeit und für die vielen fachlich kompetenten Hilfestellungen und Diskussionen, die zum Gelingen und Vollenden dieser Arbeit beitrugen.

Ich bedanke mich bei *Prof. Dr. Michael Kuhn* für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. *PD Dr. Ulrike Kämmerer* danke ich für die Übernahme ihrer Funktion als Gutachterin im Promotionskomitee, für die ausgiebige Einarbeitung in das Themengebiet der Arbeit und für viele gute wissenschaftliche Ratschläge.

Für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen möchte ich *Dr. Manfred Rohde* vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig danken.

Besonders danke ich meinen lieben Würzburger- und Münchenern- Kollegen: *Simone Bergmann, Claudia Rennemeier, Christa Albert, Inga Jensch, Hanne Schönen, Gustavo Gamez, Daniela Somplatzki, Vaibhav Agarwal, Tobias Härtel, Kathrin Berschl, Sabrina Jung* und *Doris Deininger*. Es war mir immer ein großes Vergnügen mit Euch zu arbeiten und den Laboralltag mit Euch zu versüßen.

Ich danke meinen Freunden vielmals für viele schöne Stunden außerhalb des Labors und für zahlreiche unterstützende Worte.

Mein tiefer Dank gilt meiner Familie, die mich immer in allen Zeiten bestärkt und mit voller Überzeugung unterstützt hat. Danke für Euer Vertrauen!

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|---|-----------|
| 1 Zusammenfassung | 1 |
| 2 Summary | 3 |
| 3 Einleitung | 5 |
| 3.1 Bedeutung der angeborenen und adaptiven Immunität bei mikrobiellen Infektionen..... | 5 |
| 3.2 Charakterisierung und Funktion von dendritischen Zellen..... | 7 |
| 3.2.1 Regulation der adaptiven Immunantwort durch dendritische Zellen | 8 |
| 3.2.2 Das Prinzip des „trojanischen Pferdes“ bei mikrobiellen Erregern..... | 11 |
| 3.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 12 |
| 3.3.1 Krankheitsbild, Ausbreitung und Epidemiologie von <i>S. pneumoniae</i> | 12 |
| 3.3.2 Virulenzfaktoren von <i>S. pneumoniae</i> | 15 |
| 3.3.3 Der Virulenzfaktor PavA..... | 21 |
| 3.4 Immunologische Reaktionen bei <i>S. pneumoniae</i>-Infektionen | 23 |
| 3.5 Die Interaktion von Streptokokken mit DCs | 24 |
| 3.6 Antibiotikaresistenzen und Therapiemöglichkeiten für <i>S. pneumoniae</i> | 26 |
| 3.7 Zielsetzung der Arbeit..... | 28 |
| 4 Ergebnisse | 30 |
| 4.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von DCs..... | 30 |
| 4.2 Die Rolle des bakteriellen Kapselpolysaccharids bei der Interaktion von <i>S. pneumoniae</i> mit Makrophagen und DCs | 31 |
| 4.2.1 Herstellung einer Kapsel-defizienten Mutante von <i>S. pneumoniae</i> D39 | 32 |
| 4.2.2 Einfluss der Pneumokokkenkapsel auf die Interaktion mit APCs..... | 34 |
| 4.3 Die Rolle des bakteriellen Pneumolysins bei der Interaktion zwischen <i>S. pneumoniae</i> und APCs | 37 |
| 4.3.1 Apoptoseinduktion von DCs durch Pneumolysin-produzierende Pneumokokken | 37 |
| 4.3.2 Einfluss von Pneumolysin auf die Internalisierung von <i>S. pneumoniae</i> durch APCs | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 4.4 Die Rolle von PavA bei der Interaktion zwischen <i>S. pneumoniae</i> und APCs | 43 |
| 4.4.1 Apoptoseinduktion in DCs durch PavA-produzierende Pneumokokken | 43 |
| 4.4.2 Einfluss von PavA auf die Internalisierung von <i>S. pneumoniae</i> in APCs..... | 46 |
| 4.5 Beteiligung des zellulären Zytoskeletts an der Internalisierung von Pneumokokken in APCs | 48 |
| 4.5.1 Einfluss des Zytoskeletts von Makrophagen auf die Interaktion mit <i>S. pneumoniae</i> | 49 |
| 4.5.2 Einfluss des Zytoskeletts von DCs auf die Internalisierung von Pneumokokken | 51 |
| 4.6 Prozessierung von Pneumokokken durch Makrophagen und DCs..... | 53 |
| 4.6.1 Überleben intrazellulärer <i>S. pneumoniae</i> in Makrophagen | 54 |
| 4.6.2 Einfluss von PavA auf die Überlebensrate intrazellulärer Pneumokokken in DCs | 55 |
| 4.6.3 Lokalisierung intrazellulärer Pneumokokken in DCs | 57 |
| 4.7 Ausreifung von DCs nach der Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> | 60 |
| 4.7.1 Anregung zur DC-Maturation durch <i>S. pneumoniae</i> | 60 |
| 4.7.2 Rolle von PavA bei der Ausreifung von DCs | 62 |
| 4.8 Zytokingenexpression und Zytokinfreisetzung durch Pneumokokken-stimulierte DCs | 65 |
| 4.8.1 PavA-abhängige Zytokinexpression in Pneumokokken-stimulierten DCs | 66 |
| 4.8.2 Zytokinproduktion und -freisetzung in <i>S. pneumoniae</i> -stimulierten DCs | 72 |
| 4.8.3 PavA-abhängige Induktion von Zytokinen in DCs | 75 |
| 4.9 Induktion der T-Zellproliferation durch <i>S. pneumoniae</i>-stimulierte DCs..... | 78 |
| 4.10 Funktionelle Analysen mit rekombinantem PavA | 81 |
| 4.10.1 Produktion des Fusionsproteins MBP-PavA | 81 |
| 4.10.2 Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes MBP-PavA | 83 |
| 4.10.3 Bindung von löslichem MBP-PavA an Pneumokokken..... | 85 |
| 4.10.4 Bindung von löslichem MBP-PavA an APCs | 87 |
| 4.10.5 Die Funktionalität von MBP-PavA bei <i>in vitro</i> Infektionen mit Pneumokokken und APCs..... | 89 |
| 4.10.6 Einfluss von MBP-PavA auf die Zytokinfreisetzung von Pneumokokken-stimulierten DCs..... | 91 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 5 | Diskussion..... | 94 |
| 5.1 | Bedeutung der Kapsel und die Rolle von Pneumolysin für die Erkennung von <i>S. pneumoniae</i> durch das angeborene Immunsystem..... | 97 |
| 5.2 | Die Rolle von PavA bei der Identifizierung von <i>S. pneumoniae</i> durch Immunzellen..... | 101 |
| 5.3 | PavA-abhängige immunmodulierende Funktion von Pneumokokken-stimulierten DCs | 107 |
| 6 | Material | 115 |
| 6.1 | Bakterielle Stämme und Nährmedien | 115 |
| 6.1.1 | <i>S. pneumoniae</i> Wildtyp-Stämme | 115 |
| 6.1.2 | <i>S. pneumoniae</i> Mutanten-Stämme..... | 116 |
| 6.1.3 | <i>E. coli</i> Stämme und Klone..... | 116 |
| 6.1.4 | Bakterielle Nährmedien..... | 117 |
| 6.2 | Zellkultur..... | 118 |
| 6.2.1 | Verwendete eukaryotische Zellen | 118 |
| 6.2.2 | Zellkultur- und Separationsmedien | 119 |
| 6.2.3 | Zellkulturzusätze | 120 |
| 6.3 | Antibiotika..... | 121 |
| 6.4 | Antikörper..... | 121 |
| 6.5 | Proteine, Inhibitoren und sonstige Faktoren | 122 |
| 6.6 | Plasmide und Oligonukleotide..... | 123 |
| 6.7 | DNA/RNA-Größenstandards | 124 |
| 6.8 | Proteinstandard | 125 |
| 6.9 | Enzyme | 125 |
| 6.10 | Molekular- und Immunbiologische Kits | 126 |
| 6.11 | Puffer und Lösungen..... | 126 |

| | |
|---|------------|
| 7 Methoden | 131 |
| 7.1 Mikrobiologische Methoden | 131 |
| 7.1.1 Kultivierung von <i>S. pneumoniae</i> und <i>E. coli</i> | 131 |
| 7.1.2 Konservierung von Bakterien..... | 131 |
| 7.1.3 Transformation von <i>S. pneumoniae</i> | 131 |
| 7.1.4 Herstellung von FITC-konjugierten Pneumokokken | 132 |
| 7.2 Methoden für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen | 132 |
| 7.2.1 Gewinnung von humanem Vollblut und Leukozytenkonzentrat..... | 132 |
| 7.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten..... | 133 |
| 7.2.3 Ausdifferenzierung von Monozyten zu DCs..... | 134 |
| 7.2.4 Kultivierung von J774-Makrophagenzellen | 135 |
| 7.2.5 Kryokonservierung von Zellen..... | 135 |
| 7.2.6 Auftauen von Zellen | 135 |
| 7.2.7 Zellzahlbestimmung | 136 |
| 7.2.8 Nachweis der zellulären Apoptose und Nekrose bei DCs mittels Durchflusszytometrie..... | 136 |
| 7.3 Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen <i>S. pneumoniae</i> und APCs | 137 |
| 7.3.1 Kultivierung von <i>S. pneumoniae</i> für Infektionsversuche | 137 |
| 7.3.2 Präinkubation von <i>S. pneumoniae</i> für Infektionsversuche | 137 |
| 7.3.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen für Infektionsversuche | 138 |
| 7.3.4 Präinkubation der eukaryotischen Zellen für Infektionsversuche | 138 |
| 7.3.5 Infektionsversuche und verlängerte Stimulierung von DCs..... | 139 |
| 7.3.6 Doppelimmunfluoreszenzfärbung | 139 |
| 7.3.7 Antibiotika-Protektions-Methode..... | 141 |
| 7.4 Mikroskopie | 141 |
| 7.4.1 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie | 141 |
| 7.4.2 Vorbereitung von Präparaten für Rasterelektronenmikroskopie (REM)..... | 142 |
| 7.4.3 Fixierung von Präparaten für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) | 142 |
| 7.4.4 Kapsel­fixierung von Pneumokokken für TEM | 142 |
| 7.4.5 Aufbereitung der Präparate für TEM..... | 143 |
| 7.5 Methoden zur Untersuchung der induzierten DC-Ausreifung | 143 |
| 7.5.1 Zytometrischer Nachweis von extrazellulären Oberflächenstrukturen | 143 |
| 7.5.2 Detektion der Zytokine..... | 144 |
| 7.5.3 Untersuchung der T-Zellaktivierung durch DCs (OxMi)..... | 145 |

| | |
|---|------------|
| 7.6 Bindungsnachweise von isolierten Proteinen an Pneumokokken bzw. DCs..... | 146 |
| 7.6.1 Bindung von Pneumokokken an immobilisierte Proteine | 146 |
| 7.6.2 Bindung von gelösten MBP-Proteinen an Pneumokokken | 147 |
| 7.6.3 Bindung von gelösten MBP-Proteinen an humane DCs | 147 |
| 7.7 Methoden zum Arbeiten mit DNA | 148 |
| 7.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. pneumoniae</i> mittels Genomic-Tipp Kits (QIAGEN)..... | 148 |
| 7.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Pneumokokken mittels Na-Acetat Fällung | 148 |
| 7.7.3 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von isolierter DNA | 149 |
| 7.7.4 Agarose-Gelelektrophorese | 149 |
| 7.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 150 |
| 7.7.6 Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden | 151 |
| 7.7.7 Southern-Blot Verfahren | 152 |
| 7.7.8 DNA-DNA Hybridisierung | 152 |
| 7.7.9 Herstellung kapselloser Pneumokokkenmutanten..... | 153 |
| 7.7.10 Quantitative Real Time PCR | 153 |
| 7.8 Methoden zum Arbeiten mit RNA | 155 |
| 7.8.1 RNA Isolierung aus infizierten DCs..... | 155 |
| 7.8.2 Reverse Transkription..... | 156 |
| 7.8.3 RNA Gelelektrophorese | 157 |
| 7.9 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen | 157 |
| 7.9.1 Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i> | 157 |
| 7.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) | 157 |
| 7.9.3 Proteinfärbe-Methoden..... | 158 |
| 7.9.4 Herstellung von Bakterienlysaten..... | 158 |
| 7.9.5 Zellaufschluss von Bakterien..... | 159 |
| 7.9.6 Western Blot (Semi-Dry Verfahren) | 159 |
| 7.9.7 Aufreinigung von MBP Proteinen mittels Affinitätschromatographie..... | 160 |
| 7.9.8 Aufreinigung von MBP-Proteinen mittels Ionenaustauschchromatographie | 160 |
| 7.9.9 Die Bradford Quantifizierung von isolierten Proteinen | 160 |
| 7.10 Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen..... | 161 |
| 7.11 Statistische Auswertung..... | 162 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 8 | Anhang..... | 163 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis..... | 163 |
| 8.2 | Laborgeräte..... | 165 |
| 8.3 | Verbrauchsmittel..... | 166 |
| 8.4 | Chemikalien..... | 167 |
| 8.5 | Software..... | 169 |
| 8.6 | Literaturverzeichnis..... | 170 |
| 8.7 | Vorveröffentlichungen der Dissertation..... | 190 |
| 8.8 | Lebenslauf..... | 191 |

1 Zusammenfassung

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken) sind kommensale Bakterien, die human-spezifisch asymptomatisch den Nasopharynx in bis zu 70% der Individuen besiedeln. Durch die Transmigration der Pneumokokken in verschiedene Wirtsgewebe können Pneumokokken lokale Entzündungen wie eine Mittelohrentzündungen, Sinusitis, und ambulant erworbene Pneumonie und lebensbedrohliche invasive Erkrankungen wie eine Sepsis oder Meningitis auslösen (Bogaert *et al.*, 2004; Cartwright *et al.*, 2002). In der Peripherie des Gewebes befinden sich gleichmäßig verteilte professionelle Phagozyten und antigenpräsentierende Zellen (APCs) wie dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen, die in diesen Regionen als Wächterzellen agieren und für Antigene die erste immunologische Barriere darstellen. Pathogene Mikroorganismen haben verschiedene Strategien entwickelt um der Wirtszellimmunantwort zu entgehen. Über die Interaktion und Aktivierung von zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems durch *S. pneumoniae* und die Bedeutung einzelner bakterieller Faktoren ist wenig bekannt. In dieser Arbeit sollten in *in vitro* Infektionsversuchen die Erkennung von Pneumokokken durch Makrophagen und DCs, das bakterielle Überleben und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch infizierte DCs unter besonderer Berücksichtigung der bakteriellen Faktoren untersucht werden.

In den Infektionsexperimenten mit DCs und Makrophagen konnte zum einen die Schutzfunktion des Kapselpolysaccharids von *S. pneumoniae* bei der Assoziation bzw. Erkennung der Pneumokokken durch DCs und Makrophagen bewiesen werden. Pneumokokken mit einem hohen Anteil an Kapselpolysaccharid konnten der Internalisierung durch DCs und Makrophagen entkommen. Dagegen wurde die Interaktion der Pneumokokken mit DCs bzw. Makrophagen, d.h. die Assoziation und Phagozytose, nicht durch das zytotoxische und zytolytische Pneumolysin verändert. Pneumolysin produzierende Pneumokokken lösten unter den gewählten Bedingungen auch keine Apoptose oder Nekrose bei den DCs aus. Das PavA-Protein (pneumococcal adherence and virulence factor A) wurde bereits als wichtiger Virulenzfaktor von *S. pneumoniae* charakterisiert. Die Inaktivierung von PavA attenuierte die Bakterien sowohl im Sepsismodell als auch experimentellen Meningitismodell dramatisch (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005). PavA ist nicht direkt am Adhärenz- oder Virulenzprozess beteiligt und übernimmt wahrscheinlich eine modulierende Funktion von anderen bakteriellen Faktoren

auf der Bakterienoberfläche (Pracht *et al.*, 2005). Durch *in vitro* Infektionsstudien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Produktion von PavA Pneumokokken gegen die Erkennungsmaschinerie, Aktinzytoskelett-abhängige Phagozytose und intrazelluläre Prozessierung durch APCs schützt. Exogenes PavA reassozierte an Pneumokokken und reduzierte die bei der *pavA*-Mutante erhöhte Phagozytoserate wieder auf eine Ebene vergleichbar der Phagozytoserate des Wildtypstamms von *S. pneumoniae*. Die gesteigerte Internalisierung der *pavA*-Mutante in DCs korrelierte mit dem Auftreten erhöhter Mengen an phagolysosomalen Kompartimenten. Die Interaktion zwischen Pneumokokken und DCs regte die Zellen zur Ausreifung an und sowohl der PavA-produzierende Stamm als auch die *pavA*-Mutante lösten die Produktion von inflammatorischen Zytokinen bei DCs aus. Es wurde neben proinflammatorischen Substanzen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 exprimiert und sekretiert. Naive T-Zellen konnten durch Pneumokokken-infizierte DCs zur Proliferation angeregt werden. Für die *pavA*-Mutante erfolgte sowohl die Zytokinproduktion als auch die T-Zellaktivierung verspätet und in einer im Vergleich zum PavA-produzierenden Stamm verringerten Menge. Die durch exogenes PavA komplementierte *pavA*-Mutante induzierte ein Zytokinprofil, das dem Profil des PavA-produzierenden Wildtypstammes vergleichbar war. Zusammenfassend beweisen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse die Bedeutung und virulente Rolle von PavA während der Phagozytose und der intrazellulären Abtötung von *S. pneumoniae* durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Des Weiteren verursacht das Fehlen von PavA weniger schwerwiegende Erkrankungen und eine verminderte proinflammatorische Immunantwort im Wirt. Virulenzfaktoren, die durch ein funktionell aktives PavA-Protein moduliert werden können, repräsentieren vermutlich stark immunogene bakterielle Komponenten, die ein hohes Potenzial zur Aktivierung des Immunsystems besitzen. Daher sind diese bisher unbekanntes bakteriellen Faktoren unter Umständen vielversprechende Kandidaten für alternative oder neue Impfstoffe.

2 Summary

Streptococcus pneumoniae (pneumococci) are commensals of the human respiratory tract and colonize up to 70% of the individuals asymptotically in the oral cavity of humans. Pneumococci can also transmigrate into the lungs and after crossing the lung barrier they can spread via the bloodstream in the human body and cause local infections such as otitis media, sinusitis, pneumonia and more important, life-threatening invasive diseases such as sepsis and meningitis (Bogaert *et al.*, 2004; Cartwright, 2002). The epithelial cells and secreted mucus at mucosal surfaces functions as a physical barrier and prevent initially pneumococci dissemination into deeper tissues. In addition, the tissues are scattered with sentinel professional phagocytes and antigen presenting cells (APCs) including dendritic cells (DCs). DCs are involved in the regulation and activation of immune defenses upon stimulation in response to microbial signals (Janeway and Medzhitov, 2002). Immature DCs ingest via phagocytosis or macropinocytosis bacteria and process them for presenting the bacterial antigens to T-cells. The stimulation to mature DCs converts the cells into potent APCs, which is characterized by morphological, structural and functional changes (Reis e Sousa, 2001). Optimal antigen presentation occurs after migration of DCs into lymphoid tissues such as lymph nodes and the spleen, where they get able to prime specifically a high amount of naive T-cells in order to initiate adaptive immune responses upon bacterial infections (Cavrois *et al.*, 2008). Pathogens have evolved various strategies to escape host immune responses. Here, the important protective role of the capsular polysaccharide of *S. pneumoniae* for recognition and subsequent uptake by DCs is demonstrated. Highly encapsulated strains of pneumococci escape recognition and internalisation by DCs or murine macrophages. The expression of the cytotoxic and cytolytic pneumolysin did not cause differences in the interaction between pneumococci and APCs. The PavA-protein (pneumococcal adherence and virulence factor A) has been identified as a key virulence factor of *S. pneumoniae*. Deficiency in PavA impairs adherence of pneumococci to host epithelial and endothelial cells and attenuates virulence of pneumococci in mice infection models (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005). It is suggested that PavA does not contribute directly in adhesion or virulence, but is rather modulating other, yet unidentified, important virulence determinants of *S. pneumoniae* (Pracht *et al.*, 2005). The mechanisms of recognition, ingestion and intracellular fate of live pneumococci concerning the contribution of specific bacterial components within DCs

have not been studied in great detail. This study was focused to elucidate the contribution of PavA for the interaction with antigen presenting cells in detail. Infection assays of DCs with pneumococci demonstrated that the production of PavA by pneumococci is essential to protect pneumococci against recognition, actin cytoskeleton dependent phagocytosis and intracellular processing by DCs. Binding data also demonstrated that purified PavA reassociates to pneumococci and restored enhanced phagocytosis of the *pavA*-mutant to levels of wild-type pneumococci. Electron micrograph images indicated that the elevated levels of DCs ingested *pavA*-mutant bacteria were localized in membrane bound vesicles probably phagolysosomes. The pneumococci-DCs interaction caused maturation of DCs as measured by flow cytometry. Real time PCR and protein detection by multiplex cytokine detection indicated that wild-type pneumococci and isogenic *pavA*-mutants triggered production of pro-inflammatory cytokines from DCs such as IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, and TNF α and the anti-inflammatory cytokine IL-10. Pneumococci infected DCs also induced the proliferation of naive T-cells. In time kinetics the cytokine production and T-cell activation was delayed and decreased for the *pavA*-knockout strain. The *pavA*-mutant covered with exogenously provided PavA protein induced a DC cytokine profile similar to wild-type pneumococci.

In summary this study suggests that PavA is essential for pneumococci to escape phagocytosis and killing by innate immune cells. Moreover, the lack of a functional PavA causes less severe immune responses in the host. It is assumed that pneumococcal virulence factors modulated by a functional PavA represent immunogenic factors which may have a high potential as vaccine candidates. As a consequence, the loss of function of PavA in *S. pneumoniae* improves survival of the host and results in less severe immune responses to pneumococcal infections.

3 Einleitung

Bei der Immunologie bzw. Immunbiologie handelt es sich um die Lehre biologischer und biochemischer Grundlagen der körperlichen Abwehr von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen und anderen körperfremden Stoffen wie biologischen Toxinen und Umweltgiften. Sie ist damit eine wichtige Disziplin und Substanz der biologischen Forschung. Das Immunsystem stellt ein optimales System von zellulären und molekularen Prozessen dar, welches die Erkennung, Inaktivierung und Ausschaltung von Krankheitserregern bzw. körperfremden Substanzen verfolgt und realisiert. Diese Prozesse werden unter dem Begriff Immunantwort zusammengefasst. Aufgrund der zentralen Rolle des menschlichen Immunsystems bei einer Vielzahl von Erkrankungen ist die Immunologie in der medizinischen Forschung für das Verständnis, die Prävention, die Diagnostik und die Therapie von Krankheiten von großer Bedeutung. Die Infektionsbiologie ist eine interdisziplinäre Wissenschaft der biomedizinischen und mikrobiologischen Forschung. Im Zentrum steht die Erforschung der Biologie viraler, bakterieller, protozoaler und eukaryotischer Infektionsprozesse. Das Verständnis über die immunologischen, zellulären und molekularen Mechanismen, die bei Infektionen mit einem Erreger eine elementare Rolle spielen, ermöglicht die gezielte Entwicklung neuer therapeutischer und prophylaktischer Maßnahmen. Das Thema dieser Arbeit stellt den Schnittpunkt zwischen Immunologie und Infektionsbiologie dar. In Bezug auf den humanpathogenen Erreger *Streptococcus pneumoniae* soll hier die Interaktion und Wechselwirkung mit dem angeborenen humanen Immunsystem geklärt werden.

3.1 Bedeutung der angeborenen und adaptiven Immunität bei mikrobiellen Infektionen

Das Immunsystem der Säuger besteht aus zwei komplexen Komponenten, der angeborenen (innaten) und der erworbenen (adaptiven) Immunität. Die zahlreichen Zellen des Immunsystems entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Aus ihnen entwickeln sich die lymphatischen und myeloiden Vorläuferzellen, welche sich im Laufe ihrer Ausdifferenzierung auf bestimmte Funktionen spezialisieren. Lymphatische Vorläuferzellen werden zu T-Lymphozyten (T-Zellen), B-Lymphozyten (B-Zellen) oder lymphoiden natürlichen Killerzellen (NK). Aus den myeloiden Vorläuferzellen werden neben Erythrozyten und Blutplättchen auch

polymorphkernige Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile oder Basophile), Mastzellen oder Makrophagen gebildet (Janeway und Medzhitov, 2002; Abbas *et al.*, 2000).

Die angeborene Immunität stellt die erste Verteidigungslinie gegenüber Krankheitserregern dar. Als mechanische Barriere schützen Haut und Schleimhäute beispielsweise mit antimikrobiellen Enzymen vor dem Eindringen von pathogenen Mikroorganismen. Außerdem werden Erreger durch Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen (DCs) unspezifisch phagozytiert und abgetötet. Weiterhin besteht die angeborene Immunität aus einer Vielzahl von löslichen Antikörpern der Isotypen IgM, IgG, IgA und IgE, die mit geringer Affinität an Antigene binden. Dies reicht aus, um Komplementproteine zu aktivieren. Das Komplementsystem stellt eine komplexe Enzymkaskade dar, die zur Lyse von infizierten Zellen führt (Walport, 2001; Wurzner, 1997). Außerdem erleichtert die Maskierung durch Antikörper die Phagozytose durch Makrophagen bzw. dendritische Zellen. Dieser durch Antikörper unterstützte Erkennungsmechanismus wird auch Opsonisierung genannt (van Dijk *et al.*, 1981).

Bei einer Infektion folgt der unspezifischen angeborenen Immunität die Aktivierung der zweiten Immunabwehr. Hier tritt die adaptive Immunantwort in Kraft. Nach einer Infektion entstehen innerhalb weniger Tage antigenspezifische Zellen, die Pathogene wesentlich effektiver bekämpfen können als die Zellen des angeborenen Immunsystems. Die adaptive Immunität beruht auf einem humoralen und einem zellvermittelten Prinzip. Während die Hauptakteure des humoralen Teils antigenspezifische Antikörper sind, die von B-Zellen gebildet werden, besteht die zellvermittelte Immunität aus verschiedenen Subklassen von T-Zellen. Die Zellen der adaptiven Immunität müssen zunächst durch Antigenkontakt aktiviert werden. T-Zellen erkennen mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptidantigene, die von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC), präsentiert werden. Zu diesen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) gehören DCs, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen. Antigenpräsentierende Zellen können naive T-Zellen selektiv aktivieren, wodurch sie klonal proliferieren und sich zu verschiedenen Effektorzellen ausdifferenzieren. Diese können dann zytotoxische T-Zellen, die virusinfizierte Zellen oder Krebszellen direkt abtöten, oder T-Helferzellen darstellen, die andere Zellen des Immunsystems aktivieren (Moll, 1993). B-Zellen hingegen erkennen Antigene über membranständige Antikörper. Unter Mit Hilfe von spezifischen T-Helferzellen werden sie

zur Produktion antigenspezifischer Antikörper verschiedener Isotypen angeregt. Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der adaptiven Immunität ist die Bildung von antigenspezifischen T- und B-Gedächtniszellen, die zu einer lebenslangen Immunität gegenüber dem Erreger führen. Zur Induktion dieser komplexen immunologischen Systeme stellen APCs die wichtigste zelluläre Linie des Immunsystems dar.

3.2 Charakterisierung und Funktion von dendritischen Zellen

DCs und Makrophagen gehören zu den wichtigsten Vertretern der APCs des Immunsystems. DCs wurden erstmals im Jahre 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben. Sie wurden nach ihrem charakteristischen mikroskopischen Erscheinungsbild, welches durch zahlreiche astförmige Ausläufer an der Zelloberfläche definiert ist, benannt (griechisch: dendros, deutsch: Baum). 100 Jahre vor dieser Entdeckung wurden bereits spezifische DCs der Haut charakterisiert (Langerhans'sche Zellen). DCs sind entscheidend für die Aktivierung der primären T-Zell-vermittelten Immunantwort (Banchereau, und Steinman, 1998). Aufgrund ihrer unspezifischen Antigenerkennung stellen die Immunzellen eine wichtige Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität eines Organismus dar und spielen eine Schlüsselrolle in der Steuerung und der Regulation des Immunsystems.

Dendritische Zellen entstehen im Organismus im Knochenmark aus myeloidischen Vorläuferzellen und erreichen über den Blutkreislauf das nicht lymphatische Gewebe. Sie bilden in der Peripherie des Körpers ein dichtes Netzwerk an Wächterzellen aus. So sind sie auf nahezu allen Gewebearten, wie z.B. Epithelien des Darms, der Hautepidermis, der Atemwege, des Lungenparenchyms und in einigen interstitiellen Räumen einzelner Organe lokalisiert (Austyn, 1996). Die inaktiven unreifen dendritischen Zellen weisen dort ein charakteristisches Aussehen mit zahlreichen langen, fingerförmigen Fortsätzen auf.

Im Menschen wurden bislang drei unterschiedliche Arten von DCs identifiziert. Neben den Langerhans'schen Zellen, lokalisiert auf der Epidermis, und den so genannten dermalen dendritischen Zellen, welche aus myeloiden Vorläuferzellen stammen und in bestimmten Geweben der Haut, Lunge und Herz angesiedelt sind, gibt es die lymphoiden dendritischen Zellen, welche im Blut und lymphatischen Gewebe zu finden sind. Die drei Zelltypen unterscheiden sich, abgesehen vom Ursprungs- und Wirkungsort, in der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, durch welche sie spezifiziert werden können. Diese Proteine werden auch als CD-Moleküle („Cluster of Differentiation“) bezeichnet. Die

Kultivierung von DCs ist sehr erschwert, da die Anzahl an Zellen im Blut sehr gering ist. Daher wird eine bestimmte Methodik angewendet, um größere Mengen an DCs für die Kultivierung zu gewinnen. Durch gesteuerte Ausdifferenzierung von bestimmten Vorläuferzellen des Immunsystems, z.B. CD14 positive Monozyten aus peripherem Blut, können DCs unter Laborbedingungen gezüchtet werden. Monozyten sind durch die Blutabnahme leicht aus dem Körper zu gewinnen und stellen ein Vorkommen von ca. 10% aller isolierten Leukozyten dar. Durch die Zugabe von Interleukin-4 (IL-4) und GM-CSF („granulocytes-macrophages-colony-stimulating factor“) können diese zu DCs in Kultur ausdifferenziert werden (Freudenthal und Steinman, 1990). Die unreifen DCs produzieren das Integrin CD11c auf der Zelloberfläche und können über diesen Oberflächenmarker identifiziert werden (Shortman und Liu, 2002). Die Ausdifferenzierung zu unreifen DCs kann auch durch die Zugabe von IL-4 und IFN- γ (Interferon- γ) innerhalb von 24 h durchgeführt werden (Zhang *et al.*, 2008).

3.2.1 Regulation der adaptiven Immunantwort durch dendritische Zellen

In der Peripherie des Organismus liegen DCs im unreifen Zustand vor. Dabei besitzen sie die Fähigkeit bei einer Infektion körperfremde Antigene über bestimmte Rezeptoren zu binden und durch Phagozytose, Makropinozytose oder Endozytose aufzunehmen (Inaba *et al.*, 1993; Sallusto *et al.*, 1995; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). An der Oberflächenbindung sind Lektinrezeptoren wie Mannoserezeptor oder Scavenger Rezeptoren beteiligt. Durch andere Rezeptortypen, wie Fc- und Komplementrezeptoren, wird die Internalisierung bakterieller Produkte, welche durch Antikörper gebunden werden, induziert. Diesen Interaktionen folgt die Ausreifung der DCs. So konnte schon gezeigt werden, dass einige pathogene Mikroorganismen, wie *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Leishmania major*, *Mycobacterium bovis* und *Listeria monocytogenes* (Jantsch *et al.*, 2003; Unkmeir *et al.*, 2002; Moll *et al.*, 2003; Jiao *et al.*, 2002; Pron *et al.*, 2001) unter aktiven Zytoskelettveränderungen internalisiert werden können.

Die Oberflächenerkennung von Mikroorganismen durch DCs erfolgt durch spezifische Rezeptoren. Unterschiedliche Krankheitserreger werden aufgrund molekularer Signaturen, die konstitutiv von Pathogenen exprimiert werden und evolutionär hochkonserviert sind, durch DCs identifiziert (Janeway und Medzhitov, 2002). Diese werden als „pathogen-associated-molecular-pattern“ (PAMPs) bezeichnet und sind nicht mit Virulenzfaktoren

gleichzusetzen. Rezeptoren, welche PAMPs binden und die Ausreifung (Maturation) auslösen können, sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like receptors: TLRs). Von diesen sind zehn verschiedene im menschlichen Organismus bekannt, die neben Lipopolysacchariden (LPS), bakteriellen CpG-DNA-Motiven, Lipopeptiden, doppelsträngiger RNA und Flagellenproteinen viele weitere bakterielle und virale Produkte binden können (Takeda und Akira, 2005; Akira *et al.*, 2001). LPS wird über TLR4 erkannt, während Zellwandkomponenten von Gram-positiven Bakterien über TLR2 gebunden werden (Akira *et al.*, 2000). Neben der Interaktion mit Antigenen können auch andere Stimulatoren die so genannte Ausreifung von dendritischen Zellen auslösen (Banchereau *et al.*, 2000). Darunter fallen bei der Aktivierung die freiwerdenden Zytokine, wie Interferone, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und IL-1 (Montoya *et al.*, 2002; Gallucci *et al.*, 1999). Während ihrer Ausreifung erfahren die Zellen einige phänotypische und funktionelle Veränderungen. So erhöht sich die Zellstabilität in Form von morphologischen Veränderungen, die Expression von MHC-Klasse II-Molekülen und von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen, wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und CD40 (Cella *et al.*, 1999; Foy *et al.*, 1996). Außerdem verlieren die Zellen bei Aktivierung die Fähigkeit der Aufnahme von Antigenen, können aber die bereits aufgenommenen Substanzen prozessieren. Dabei werden die Bakterien in der Zelle proteolytisch in bestimmten Kompartimenten, wie Endosomen oder Phagolysosomen, die aus der Verschmelzung mit Lysosomen entstehen, abgebaut (Larsson *et al.*, 1999). Die mikrobiellen Peptide werden assoziiert an MHC Klasse II Moleküle durch die Zelle geschleust (van Niel *et al.*, 2008). Die Ausreifung geht einher mit der Migration der Zellen aus dem nicht lymphatischen in das lymphatische Gewebe, wie den Lymphknoten oder der Milz (Bertho *et al.*, 2005). Bestimmte Veränderungen in der Expression einiger Chemokinrezeptoren, wie CCR7, als auch von Adhäsionsmolekülen, wie CD40, CD54, CD80, CD86 und des Zytoskeletts, ermöglichen den Zellen zu ihrem Wirkungsort zu wandern (Harding *et al.*, 1992; Linsley und Ledbetter, 1993; Banchereau *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2004).

Nach der Ausreifung erreichen DCs über die Lymphe die Lymphknoten oder die Milz. Hier präsentieren sie über MHC-Klasse II bzw. MHC-Klasse I Oberflächenmolekülen den T-Zellen die prozessierten Antigene. Über MHC-Klasse I Moleküle werden intrazelluläre Antigene gebunden. Darunter fallen fakultativ intrazelluläre Bakterien und Viren. Diese

werden durch CD8-positive T-Zellen erkannt. Diese zytotoxischen T-Zellen lysieren nach ihrer Aktivierung die infizierte Zelle. Die Phagozytose von extrazellulärem Material, wie Bakterien, führt zur Präsentation durch MHC-Klasse II Moleküle. CD4-positive T-Zellen werden über das Schlüssel-Schloss-Prinzip an die präsentierten Antigene der APCs gekoppelt und spezifisch aktiviert. Außerdem werden durch die Aktivierung von APCs Zytokine ausgeschüttet. Dabei führt Interleukin 12 (IL-12) zur Aktivierung antigenspezifischer T-Helferzellen des Typ 1 (Th1-Zellen) IL-12 wird beispielsweise von dendritischen Zellen aufgrund eines TLR-Signals gebildet (O'Garra und Arrai, 2000). Th1-Zellen produzieren Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und IL-2 und lösen am Ort der Infektion eine Entzündung aus. Sie rekrutieren und aktivieren Makrophagen und induzieren die Bildung von antigenspezifischen IgG Antikörpern durch B-Zellen. IL-12 gilt somit als starker proinflammatorischer Mediator. Auch Makrophagen exprimieren bei einer Infektion IL-12. Makrophagen zeigen aber eher in der Peripherie bzw. im Blut und nicht in lymphatischem Gewebe Wirkung auf die T-Zell-Aktivierung. Fehlt das IL-12 bei dem Kontakt zwischen antigenpräsentierenden Zellen und den T-Zellen, z.B. durch ein fehlendes TLR-Signal, oder ist IL-10/IL-4 anwesend, so kommt es zur Bildung von T Helferzellen des Typ 2 (Th2-Zellen) (O'Garra und Arrai, 2000). Th2-Zellen bilden IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL 10, IL-13 und den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β) (Glimcher und Singh, 1999). Sie aktivieren antigenspezifische B-Zellen zur Produktion von IgE und IgG₁ Antikörpern. Mittels IgE kommt es zur Degranulation von Mastzellen und somit zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Die Ausprägung einer Th1-Immunreaktion ist vor allem zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen, wie Bakterien, Protozoen oder Viren, wichtig. Eine Th2-Reaktion hingegen bekämpft vor allem extrazelluläre Infektionen, z.B. durch extrazelluläre Bakterien, tritt jedoch auch bei allergischen Reaktionen auf. Th1- und Th2-Immunreaktionen regulieren sich gegenseitig. So verhindert IFN- γ von Th1-Zellen die Proliferation von Th2-Zellen (Gajewski und Fitch, 1988). Umgekehrt inhibieren IL-4 und IL-10 die Entstehung von Th1-Zellen und die Inflammation. Somit wird eine Immunreaktion auf einen mikrobiellen Erreger meistens entweder durch eine Th1- oder Th2-Reaktion dominiert (Mosmann und Sad, 1996).

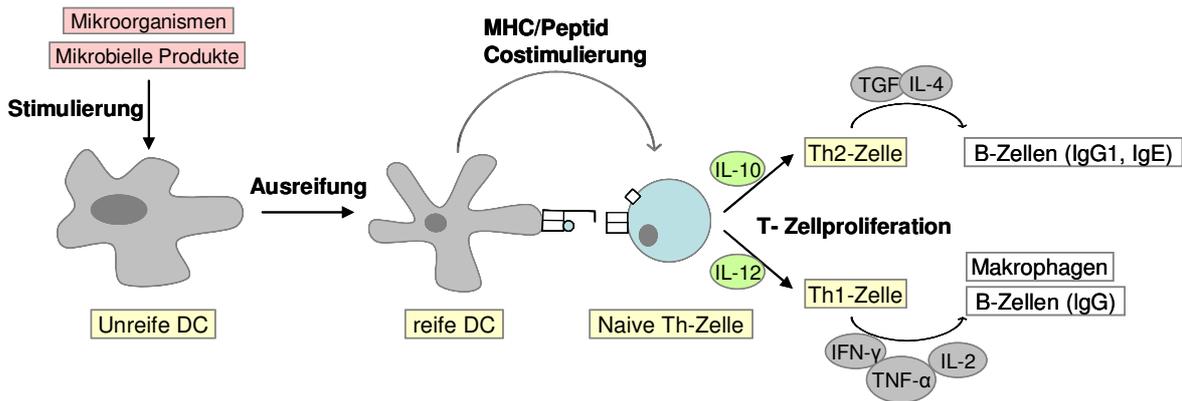


Abbildung 1: Immunologische Funktion von DCs während einer mikrobiellen Infektion. Dendritische Zellen werden durch spezifische mikrobielle Stimuli (rot dargestellt) zur Ausreifung angeregt. Reife DCs präsentieren naiven CD4-positiven Th-Zellen mikrobielle Antigen-Peptide über MHC-Klasse II Moleküle, lösen die T-Zell-Proliferation und somit die geeignete Immunantwort aus (Quelle: eigene Darstellung).

3.2.2 Das Prinzip des „trojanischen Pferdes“ bei mikrobiellen Erregern

Dendritische Zellen besitzen ein großes Spektrum an Erkennungs- und Aufnahmemechanismen von Fremdkörpern. Aufgrund der Fähigkeit zur Phagozytose werden viele Mikroorganismen nach einer Interaktion mit dendritischen Zellen in die Zellen aufgenommen und dadurch oftmals die Ausreifung der DCs ausgelöst. In manchen Fällen kann die intrazelluläre Prozessierung und die immunogene Antigenpräsentation an der Zelloberfläche durch bakterielle Überlebensstrategien unterdrückt werden. Die überlebenden Erreger dringen somit vom adaptiven Immunsystem unerkannt in der ausgereiften dendritischen Zelle in tieferes Gewebe vor. Diese Fähigkeit des Überlebens in der phagozytierenden Zelle stellt eine wichtige Funktion bei der pathogenen Besiedlung des Wirtes dar. Bei diesem Prinzip, vom Immunsystem unerkannt in den Organismus vorzudringen, um Infektionsherde zu bilden, werden dendritische Zellen als so genanntes „Trojanisches Pferd“, oder als Vehikel missbraucht. Bekannt ist die Nutzung dieser Besiedlungsstrategie für einige Viren, wie HIV-1, Ebola, Dengue und Cytomegalovirus (Geijtenbeek *et al.*, 2003; Steinman *et al.*, 2003). Das HI Virus-1 gelangt dadurch direkt an lymphatische Orte mit hoher T-Zelldichte, die sie dann direkt infizieren können. Auch Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* und *Leishmania amastigote* sind fähig, dendritische Zellen für ein optimales Überleben und eine große Ausbreitung im Wirtsorganismus zu nutzen (Tailleux *et al.*, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Colmenares *et al.*, 2002).

3.3 *Streptococcus pneumoniae*

Die Gattung *Streptococcus* umfasst 34 verschiedene Gram-positive Mikroorganismen, welche mikroskopisch als runde bzw. ovale Kokken auftreten. Sie sind unbewegliche Oxidase- und Katalase-negative Bakterien, welche fakultativ unter anaeroben Bedingungen proliferieren. Metabolisch gesehen sind sie obligate Gärer (Homo- oder Heterofermentation) und zählen zu den Milchsäurebakterien (*Lactobacillus*). Zu ihrer Energiegewinnung nutzen sie ausschließlich Kohlenhydrate, haben einen hohen Bedarf an Supplinen und können Laktose verwerten. Gemäß ihrer besonderen Fähigkeit α -, β - und γ -Hämolyse bei Erythrozyten zu verursachen, werden Streptokokken in bestimmte Gruppen unterteilt (Brown, 1937). Die Lancefield-Gruppierung (A bis V), eine serologische Einteilung der Streptokokken, basiert auf die unterschiedliche Zusammensetzung des Kapselpolysaccharids (Lancefield, 1933). Von großer medizinischer Bedeutung sind vor allem *Streptococcus pyogenes* (Gruppe A Streptokokken, GAS) und *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken), welche zur Normalflora der Haut und der Schleimhäute des Menschen zählen, aber auch lokale Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes, der Haut, sowie rheumatisches Fieber induzieren können. Weiterhin gilt *Streptococcus agalactiae* (Gruppe B Streptokokken, GBS) als Auslöser neonataler Meningitiden. *Streptococcus mutans* kommt im oralen Bereich des Menschen als kommensale Bakterien vor und gelten als Kariesauslöser.

3.3.1 Krankheitsbild, Ausbreitung und Epidemiologie von *S. pneumoniae*

Georg M. Sternberg isolierte bereits 1881 *S. pneumoniae* aus gesunden Trägern. Anhand *S. pneumoniae* wurde die natürliche Transformierbarkeit im Jahre 1928 (Griffith, 1928), die Penicillinwirkung, die Rolle der bakteriellen Kapsel und die immunogene Wirkung der Kapselpolysaccharide beschrieben (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Diese ovalen bis lanzettförmigen Kokken, die meist als Diplokokken oder kurze Ketten vorkommen, besitzen α -Hämolyseaktivität und in der Regel eine Kapsel (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Watson und Musher, 1990). Die Morphologie von bekapselten Stämmen zeigt bei der Kultivierung auf Blutagar glänzend aussehende Kolonien, dagegen haben Kolonien unbekapselte Stämme eine matt-raue Oberfläche. Über die chemische Feinstruktur der Kapsel, die Kapselpolysaccharide, konnten bis heute 91 unterschiedliche Serotypen von Pneumokokken identifiziert werden.

S. pneumoniae kommt asymptomatisch auf den Schleimhäuten des oberen respiratorischen Traktes bei 5-70% der gesunden Erwachsenen und bei mindestens 40% der gesunden Kleinkinder vor. *S. pneumoniae* ist allerdings auch ein humanpathogener Erreger ernster, invasiver Infekte, und stellt weltweit den häufigsten Erreger von ambulanten Pneumonien (Lungenentzündungen), sowie nach *Neisseria meningitidis* die zweithäufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis (Hirnhautentzündung) bei Erwachsenen dar (Burman *et al.*, 1985). Außerdem ist etwa die Hälfte aller vorkommenden Mittelohrentzündungen (Otitis media) auf *S. pneumoniae* Infektionen zurückzuführen (Tuomanen *et al.*, 1995). Schwere Pneumokokken-Infekte gehen häufig mit einer Bakteriämie und Sepsis einher (Lee *et al.*, 1991). Die Übertragung der Pneumokokken erfolgt über Aerosole. Durch viele Risikofaktoren wie beispielsweise eine vorausgegangene Infektion, z.B. durch *Haemophilus influenzae*, Defekte des Komplementsystems, kardiopulmonale Grundleiden, Asthma, HIV-Infektion, Alkoholismus oder Diabetes mellitus, wird dieser endogene Infekt ermöglicht (Centers for Disease Control and Prevention, 1997, Kayser *et al.*, 1997). Bei geschwächter Wirtsdisposition, bei Kleinkindern oder älteren Menschen, kolonisieren die Pneumokokken im Nasopharynx, und dringen in die Nebenhöhlen und in die Bronchien vor. Dort können sie eine Infektion auslösen oder über mehrere Wochen und Monate asymptomatisch im Wirt persistieren (Ekdahl *et al.*, 1997; Loda *et al.*, 1975). Durch die Dissemination des Bakteriums kommt es zu einer immunologischen Reaktion, zur Produktion von Antikörpern, die gegen die Kapselpolysaccharide gerichtet sind und folglich zur körpereigenen Abschwächung der Infektion. Im Fall einer Immunschwäche kommt es jedoch zu schwerwiegenden infektiösen Erkrankungen, wie der Bakteriämie und Sepsis oder lokalen Infektionen wie einer Mittelohrentzündung (Otitis Media) oder Sinusitis (Lee *et al.*, 1991; Tuomanen *et al.*, 1995).

Der erfolgreichen Kolonisierung des Nasopharynx geht die bakterielle Adhärenz an und Invasion in Epithelzellen voraus. Von dort aus können die Erreger über die Eustachische Röhre in das Mittelohr oder nach Versagen der spezifischen und unspezifischen Abwehr der Schleimhäute in die Lunge des Wirts gelangen (Loosli, 1949; Boulnois, 1992). Bei bis zu 25% aller Pneumokokken-Pneumonien erfolgt ein Übertritt der Bakterien in die Blutbahn mit Entwicklung einer Bakteriämie, indem sich die Erreger über den Blutkreislauf im Organismus ausbreiten. Wird die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen, kann

eine Meningitis ausgelöst werden (Tuomanen *et al.*, 1995). Die Meningen können alternativ auch direkt vom Nasopharynx aus infiziert werden (Boulnois, 1992). *Streptococcus pneumoniae* ist in der Lage, an periphere und mikrovaskuläre, im Gehirn lokalisierte Endothelzellen sowie an Pulmonal-, Pharynx- und Bronchialepithelzellen zu adhären und in diese einzudringen (Geelen *et al.*, 1993; Cundell *et al.*, 1995; Talbot *et al.*, 1996; Adamou *et al.*, 1998). Die an der Adhärenz und Invasion beteiligten Faktoren sind nicht vollständig bekannt. Für eine Reihe von Proteinen konnte allerdings ihre Beteiligung an der Bindung der Pneumokokken an der Oberfläche der Wirtszelle nachgewiesen werden. Bekapselte Stämme von *S. pneumoniae* zeigen oft eine verminderte Adhärenz an Zellkulturzellen (Talbot *et al.*, 1996). Dieser Effekt spricht für eine negative Wirkung der Polysaccharidkapsel auf den Anheftungsprozess, die jedoch nicht immer beobachtet werden konnte (Hammerschmidt *et al.*, 2005).

S. pneumoniae Infektionen treten gehäuft bei Kindern in den ersten drei Lebensjahren, bei älteren Erwachsenen über 60 Jahre und bei immunsupprimierten Menschen auf (Gray *et al.*, 1979; Garcia-Leoni *et al.*, 1992). Nach einer US-amerikanischen Studie haben 62% aller Kinder im Alter von 2 Monaten mindestens eine akute Mittelohrentzündung. In seltenen Fällen verursachen Pneumokokken auch Endokarditis und Perikarditis (Musher, 1992). Bei Kleinkindern im Alter von 6 bis 11 Monaten treten Pneumokokkeninfektionen am häufigsten auf, reduzieren sich im Erwachsenenalter und steigen im Alter von 50 bis 60 Jahren wieder stark an. Bei etwa 20 Millionen Infektionen pro Jahr verlaufen 1 Million aufgrund von Pneumokokken-Pneumonien und 750 000 aufgrund von Pneumokokken-Meningitis tödlich. In Deutschland werden jährlich die Pneumoniefälle auf 350 000 bis 500 000 geschätzt. Trotz der Entwicklung neuer Therapienansätze enden 5% der Pneumonien, 25-29% der Bakteriämien und bis zu 30% der Meningitiden, die durch Pneumokokken hervorgerufen wurden, tödlich (Mufson, 1990). In Entwicklungsländern sind Infektionen mit *S. pneumoniae* vor Durchfallerkrankungen die häufigste Todesursache bei Kindern unter 2 Jahre (Poland, 1999). Als stark virulent und infektiös gelten Pneumokokken der Serotypen 1, 2, 14, 18C, 19A und 6B, die bisher nicht aus der Normalflora isoliert werden konnten (Tuomanen *et al.*, 1995; Hanage *et al.*, 2005).

3.3.2 Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*

Die Kolonisierung des Wirts durch *S. pneumoniae* und die Dissemination des Pathogens ist sehr eng mit der Produktion bakterieller Virulenzfaktoren verbunden (Salyers und Whitt, 1994). Zu diesen Virulenzfaktoren von Pneumokokken gehören neben Proteinen auch Enzyme, Toxine und Kohlenhydratstrukturen, die in die Umgebung sekretiert oder auf der Bakterienoberfläche verankert werden. Neben immunmodulatorischen Eigenschaften ermöglichen die Oberflächenkomponenten die bakterielle Adhärenz und Invasion an wirtsspezifische Zielzellen (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Hammerschmidt, 2006). Die Anheftung von *S. pneumoniae* an Wirtsgewebe führt zum Auslösen der zellulären Aufnahme. Damit können unter Umständen Barrieren überwunden werden, um in tieferes Gewebe vorzudringen oder um intrazellulär zu persistieren. Alle klinisch virulenten Isolate von *S. pneumoniae* exprimieren das Zytotoxin Pneumolysin. Bei Pneumolysin handelt es sich um ein intrazelluläres Protein mit einem Molekulargewicht von 52,8 kDa, deren Sekretionsmechanismus unklar ist. Pneumolysin gehört zu der Protein-Familie der Thiol-aktivierten Toxine (Smyth und Duncan, 1978). Das Toxin ist bereits in niedrigen Konzentrationen zytotoxisch für eine Reihe von Zielzellen, wie z.B. für respiratorische Epithelzellen, bei denen der Zilienschlag gehemmt wird (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Steinfort *et al.*, 1989). Die Bindung an das Cholesterin der Plasmamembran von Wirtszellen induziert Transmembranporen und somit die Lyse der Zelle (Morgan *et al.*, 1994; Morgan *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1980). Abhängig von der geschädigten Wirtszelle kann es zu einem Eintritt von *S. pneumoniae* z.B. in das Blutssystem und damit zu einer Bakteriämie, oder im Falle des Überquerens der Blut-Hirn-Schranke zu einer Meningitis kommen (Rubins *et al.*, 1993; Rubins *et al.*, 1995; Zysk *et al.*, 2001).

Einer der wichtigsten und bedeutendsten Virulenzstrategien von *S. pneumoniae* ist die Ausbildung der Kapsel, die aus unterschiedlichen Polysacchariden besteht (Austrian, 1981). Die Kapselpolysaccharide, meist lineare Zuckerketten, sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft und enthalten unterschiedliche Mono-, Di- und Trisaccharide, sowie Aminozucker, Choline, Acetyl- und Phosphorylgruppen (van Dam *et al.*, 1990). Bekapselte *S. pneumoniae* verhalten sich im Tiermodell virulenter als deren kapsellose Variante (Watson und Musher, 1990). Es sind nur 20 der über 90 verschiedenen Serotypen für die Entwicklung von ca. 90% der

Pneumokokkenerkrankungen verantwortlich (Mulholland, 1999; Musher, 1992). Die Kapselpolysaccharide schützen den Erreger vor einer Komplement-vermittelten Opsonophagozytose (Fine, 1975; Giebink *et al.*, 1977; Roberts, 1996; Silvennoinen-Kassinen und Koskela, 1986). Dafür ist nicht die Quantität der produzierten Kapsel verantwortlich sondern die biochemische Struktur der Kapsel. Die Kapselexpression variiert bei *S. pneumoniae* durch eine spontane Phasenvariation, die zu einer opaquen oder transparenten Erscheinungsform der Kolonien führt (Weiser *et al.*, 1994). Pneumokokken mit transparentem Phänotyp, die weniger Kapselpolysaccharide produzieren, besiedeln die mukosalen Oberflächen des Nasopharynx. Hingegen zeigten Bakterien mit opakem Phänotyp ein höheres Virulenzpotenzial in systemischen Infektionen (Kim und Weiser, 1998; Weiser *et al.*, 1994; Overweg *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2001). Das Kapselpolysaccharid, welches die Zellwand der Pneumokokken umgibt, könnte zu einer Maskierung der Pneumokokkenoberfläche führen. Adhäsine und Invasine könnten somit bei der Interaktion mit dem Wirtsgewebe gehemmt werden (Overweg *et al.*, 2000). Die Menge des produzierten Kapselpolysaccharids variiert im Verlauf einer Infektion gemäß der Lokalisierung im Organismus (Hammerschmidt *et al.*, 2005).

Einige Populationen an bekapselten und unbekapselten Pneumokokken produzieren verzweigte Pili-Formationen auf der Bakterienoberfläche, welche von Genen der Pathogenitätsinsel *rlrA* kodiert werden (Barocchi *et al.*, 2006). Die einzelnen Untereinheiten dieser Strukturen sind kovalent miteinander verbunden (Telford *et al.*, 2006). Die Polymerisation des Pilus erfolgt über 3 verschiedene Transpeptidasen der Sortasen Familie, die ebenfalls von der *rlrA*-Insel kodiert werden (Lemieux *et al.*, 2008). Die Gene sind auf der Pathogenitätsinsel als Operon, welches als mobiles Element angesehen wird, organisiert (Scott und Zahner, 2006). Strukturanalysen über Immunogolddetektion in der Elektronenmikroskopie zeigten, dass die Hauptkomponente RrgB den Pilusschaft ausbildet (Hilleringmann *et al.*, 2008). RrgC bildet Clusterformen mit RrgA entlang des Pilus und gilt auch als das eigentliche Adhäsine der Pilusspitze (Hilleringmann *et al.*, 2008; Lemieux *et al.*, 2008). Der Pilus zählt zu den Virulenzfaktoren, da in Mausinfektionsmodellen die Pathogenitätsinsel *rlrA* einen großen Einfluss auf die Kolonisierung der Pneumokokken (Hava *et al.*, 2003). Neuere Studien zeigten außerdem eine funktionelle Verbindung zwischen auftretender Penicillinresistenz und dem Vorhandensein der Pilus-Pathogenitätsinsel in bestimmten

Pneumokokkenisolaten (Sjostrom *et al.*, 2007). Mittlerweile wurde eine zweite Pilusstruktur bei Pneumokokken beschrieben, welche an der Adhärenz und Kolonisierung des Wirtsorganismus beteiligt ist (Bagnoli *et al.*, 2008).

Eine wichtige Komponente der Pneumokokkenzellwand ist das Phosphorylcholin, über das die Gruppe der cholinbindenden Proteine auf der Bakterienoberfläche nicht kovalent verankert wird (Yother und White, 1994). Als Adhäsine vermittelt es die Bindung an den Wirtsrezeptor des Thrombozyten aktivierten Faktors („platelet-activating factors“, PAF) (Cundell *et al.*, 1995). Besonders bei unbekapselten Pneumokokken spielen die Komponenten der Zellwand eine große Rolle im Anheftungsprozess an die humanen Endothelzellen (Geelen *et al.*, 1993). Pneumokokken verfügen weiterhin über eine Reihe von Proteinen, die als Virulenzfaktoren identifiziert worden sind. Die Oberflächenproteine weisen eine Signalsequenz auf, durch die sie über die Zytoplasmamembran mittels des Sec-abhängigen Sekretionsweg exportiert werden können, und entweder in der Membran verankert oder vollständig in die Außenumgebung abgegeben werden. Die Verankerung erfolgt enzymatisch und kovalent durch Sortasen. Über das LPXTG-Motiv werden Proteine bzw. über das Lipidankermotiv werden Lipoproteine in der Pneumokokkenzellwand befestigt (Bergmann und Hammerschmidt, 2006; Fischetti *et al.*, 1990). Zu den virulenten Oberflächenproteinen von *S. pneumoniae* gehören die Cholin-bindenden Proteine (Autolysin, Pce/CbpE, CbpD, CbpG, PspA und PspC), Proteine mit dem LPXTG-Verankerungsmotiv (Hyaluronidase, NanA, die IgA1-Protease, ZmpC und HtrA), Lipoproteine (PsaA, PpmA und SlrA) und die untypischen Oberflächenproteine Enolase, GAPDH, PavA.

Die cholinbindenden Proteine haben einen modularen Aufbau und bestehen aus einer Signalsequenz, einer biologisch aktiven N-terminalen Region und der konservierten Cholin-bindenden Domäne, über die das Protein nicht-kovalent an das Phosphorylcholin der Zellwand gebunden wird (Yother und White, 1994). Sie werden stammabhängig exprimiert und weisen eine Variabilität von 13 bis 16 Proteinen auf. Das Autolysin LytA und die Phosphorylcholinesterase Pce (auch CbpE genannt) sind Beispiele für Cholin-bindende Proteine. LytA (N-Acetylmuraminsäure-L-Alanin-Amidase) führt in der stationären Phase zur Lyse der Bakterien, ist für die Zellseparation von Tochterzellen zuständig und weist eine Attenuierung im Tiermodell auf (Tomasz, 1970, Ronda *et al.*, 1987; Sanchez-Puelles *et al.*, 1986; Berry *et al.*, 1989). Die Phosphoryl-

cholinesterase Pce ist eine Metallo- β -Lactamase und entfernt enzymatisch endständiges Phosphorylcholin von den Teichon- und Lipoteichonsäuren der Bakterienwand. Dies führt zu Veränderungen des Koloniephänotyps, bei dem die Bindungsstellen für CBPs („Coline-binding-proteins“) auf der Bakterienzelle reduziert vorliegen (de Las *et al.*, 2001; Vollmer und Tomasz, 2001). Die quantitative Variation von Phosphorylcholin ist für die Kolonisierung des Nasopharynx und für die Invasivität relevant (Gosink *et al.*, 2000). Ein inaktives Pce führt zu einer höheren Virulenz im Sepsismodell von Mäusen (Vollmer und Tomasz, 2001). Außerdem vermittelt Phosphorylcholin die Bindung von Pneumokokken an den Rezeptor des Thrombozyten aktivierenden Faktors (PAF, platelet activating factor) der Wirtszellen (Cundell *et al.*, 1995).

Das CbpD ist eine Murein Hydrolase und CbpG eine putative Serinprotease (Gosink *et al.*, 2000). Beide Proteine spielen während der Kolonisierung von Pneumokokken eine wichtige Rolle. CbpD unterstützt LytA bei der Kompetenz-induzierten Zellyse und ist an der Freisetzung von Virulenzfaktoren beteiligt (Kausmally *et al.*, 2005; Guiral *et al.*, 2005).

Das hoch konservierte Protein PspA (Pneumococcal surface protein A) ist als Cholin-bindendes Protein für die Virulenz von großer Bedeutung (Crain *et al.*, 1990; Briles *et al.*, 1988). PspA kann das humane Eisen-Transporterprotein Laktoferrin binden, aber es nicht als Eisenquelle nutzen (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Die Expression von PspA blockiert den bakteriziden Effekt des Apo-Laktoferrins, indem es durch deren Bindung das aktive Zentrum des reduzierten Laktoferrins besetzt (Shaper *et al.*, 2004).

PspC (Pneumococcal surface protein C) wird auch als sekretorisches IgA Bindungsprotein (SpsA) oder als CbpA beschrieben. PspC ist ein multifunktionales Protein und vermittelt die Aufnahme von Pneumokokken in Epithelzellen des Nasopharynx. Es agiert als einziges Adhäsion der Pneumokokken und bindet humanspezifisch die Ektodomäne des polymeren Immunglobulinrezeptors (pIgR), die auch als sekretorische Komponente bezeichnet wird (Hammerschmidt *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2000). Dies führt zu einer Anheftung von *S. pneumoniae* an pIgR-exprimierende Epithelzellen und zum anderen zu einer Transmigration der Bakterien durch mukosale Epithelzellen (Elm *et al.*, 2004; Braathen *et al.*, 2006). PspC bindet außerdem Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie das Komplementprotein C3 und Faktor H (Smith und Hoststetter 2000; Dave *et al.*, 2004). Die Bindung von Faktor H erhöht die Adhärenz

an und die Invasion in humane Epithel- und Endothelzellen in Zellkulturversuchen, außerdem erhöht es die Virulenz der Pneumokokken in Mausinfektionsversuchen (Hammerschmidt *et al.*, 2007; Quin *et al.*, 2007).

Das PspC-ähnliche Protein Hic („Factor H-binding inhibitor of complement“, PspC 11.4) bindet ebenfalls Faktor H (Janulczyk *et al.*, 2000). Im Unterschied zu PspC wird Hic hauptsächlich von Pneumokokken des Serotyp 3 gebildet und enthält ein LPXTG-Motiv über das das Protein im Peptidoglykangerüst der Zellwand verankert wird. Die Bindung von Faktor H an Hic schützt vor der Aktivierung der Komplementkomponente C3b und somit vor der Opsonophagozytose der Pneumokokken. Des Weiteren erhöht sich die Überlebensrate der Erreger bei Expression von PspC oder Hic in einem systemischen Mausinfektionsmodell (Iannelli *et al.*, 2004).

Ein enzymatisches Oberflächenprotein mit LPXTG-Motiv und Signalsequenz ist die Hyaluronidase, welche die Hyaluronsäure der extrazellulären Matrix hydrolysiert. Dadurch wird die Ausbreitung der Pneumokokken im Gewebeverband gefördert (Berry *et al.*, 1994). Die Inaktivierung der Hyaluronidase zeigte außerdem eine verminderte Virulenz der Pneumokokken (Chapuy-Regaud *et al.*, 2003).

Weitere hoch konservierte Oberflächenproteine von *S. pneumoniae*, welche enzymatisch aktiv sind, sind die Neuraminidasen, die von den Genen *nanA* oder *nanB* kodiert werden. Diese Exoglykosidasen spalten die endständigen Sialinsäuren von Glykoproteinen, Glykolipiden und Oligosacchariden aus Zelloberflächen oder Körperflüssigkeiten des humanen Wirtes ab. Beide Komponenten, sowohl NanA als auch NanB, werden sekretiert, aber nur NanA weist das charakteristische LPXTG-Verankerungsmotiv auf (Camara *et al.*, 1994). NanA spielt eine wichtige Rolle in der Kolonisierung des Nasopharynx und des Mittelohres (Tong *et al.*, 2002). Die katalytische Aktivität der Neuramidase der Pneumokokken richtet sich auch gegen *Haemophilus influenzae* und *Neisseria meningitidis* (Shakhnovich *et al.*, 2002). Die Sialinsäuren schützen die Erreger vor der Komplement-vermittelten Phagozytose und stellen somit ein Virulenzfaktor für diese Bakterien dar. *S. pneumoniae* könnte somit einen Vorteil gegenüber den anderen Pathogenen während der Kolonisierung erzielen. Die hohe Diversität des *nanA*-Gens, hervorgerufen durch Rekombinationsereignisse, schützt außerdem vor der adaptiven Immunantwort des Wirtes (King *et al.*, 2005).

Pneumokokken produzieren vier Zink-Metalloproteasen mit LPXTG-Motiv, die IgA1-Protease, ZmpB, ZmpC und ZmpD. Die IgA1-Protease spaltet spezifisch humanes IgA1 und spielt eine Rolle bei Lungeninfektionen und Bakteriämie (Polissi *et al.*, 1998). Pneumokokken, die auf ihrer Oberfläche Serotyp-spezifisches IgA1 gebunden haben, zeigten in Gegenwart der IgA1-Protease eine erhöhte Adhärenz an humane Wirtszellen (Weiser *et al.*, 2003). Dabei neutralisieren die gebundenen Fab-Fragmente die negative Ladung der Kapsel, heben somit den anti-adhäsiven Effekt der Kapsel auf und das Phosphorylcholin der Zellwand der Pneumokokken kann mit dem PAF-Rezeptor interagieren. ZmpC (Zink-Metalloprotease C) spaltet das Proenzym der humanen Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) in ihre aktive Form. MMP-9 ist an der Degradation der Matrix und dem Öffnen der Blut-Hirn-Schranke für den Übertritt der Pneumokokken beteiligt. Im Pneumonie-Mausinfektionsmodell spielt ZmpC als Virulenzfaktor eine große Rolle (Oggioni *et al.*, 2003). Die HtrA (high-temperature requirement A) Protease wirkt temperaturabhängig als ein molekulares Chaperon oder eine Hitzeschock-induzierte Serinprotease. HtrA wird durch das CiaRH-Zweikomponentensystem reguliert, ist an der Resistenz von *S. pneumoniae* gegenüber oxidativem Stress beteiligt und spielt eine Rolle in der Kolonisierung des Nasopharynx von Ratten und bei der Induktion von Lungenentzündungen (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003).

Die Lipoproteine von *S. pneumoniae* sind innerhalb des Substrattransports und der bakteriellen Fitness von großer Bedeutung. Das Lipoprotein PsaA („Pneumococcal surface antigen A“) ist Teil eines ABC-Transportsystems, das Zink- und Manganionen transportiert (Dintilhac *et al.*, 1997). Die Inaktivierung von *pspA* hat eine reduzierte Adhärenz der Pneumokokken an Wirtszellen, eine verminderte Virulenz in einem intranasalen bzw. intraperitonealen Mausinfektionsmodell und eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress zur Folge (Marra *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2002). Die Inhibition von PsaA durch PsaA-Antikörper führte zur reduzierten Adhärenzfähigkeit von Pneumokokken an Epithelzellen des Nasopharynx (Romero-Steiner *et al.*, 2003). Außerdem zeigten Microrarray-Analysen eine erhöhte Expression von PsaA in Pneumokokken, welche an Epithelzellen des Nasopharynx adhärten (Orihuela *et al.*, 2004). Als Rezeptor für PsaA wurde E-Cadherin auf humanen Epithelzellen identifiziert (Anderton *et al.*, 2007)

Die Lipoproteine SlrA und PpmA gehören zur Familie der Peptidyl-Prolyl-Isomerasen (PPIasen), die an der Sekretion und Aktivierung von Oberflächenstrukturen beteiligt sind und stark immunogen sind (Adrian *et al.*, 2004). *SlrA*-defiziente Pneumokokken zeigten eine verminderte Bindungsaktivität an Wirtszellen, während die *ppmA*-Inaktivierung im Mausmodell zu einer erhöhten Überlebensrate von *S. pneumoniae* führte (Hermans *et al.*, 2006; Overweg *et al.*, 2000).

Das zytosolische Enzym α -Enolase der Glykolyse wird bei Pneumokokken auch an der Bakterienoberfläche lokalisiert. Pneumokokken binden über die Enolase humanes Plasminogen, welches als monomeres Proenzym der Serin-Protease Plasmin eine entscheidende Rolle in der Fibrinolyse, in der Homeostase und in der Degradation der extrazellulären Matrix spielt (Bergmann *et al.*, 2001; Collen *et al.*, 1975; Vassalli *et al.*, 1991). Neben der Enolase ist die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) ein weiterer Bindungspartner von Plasmin(ogen) (Bergmann *et al.*, 2004). Die Bindung von Plasmin(ogen) über die Enolase an Pneumokokken führt zu einer erhöhten Degradation der extrazellulären Matrix, zum Auflösen von Fibrin und zur Transmigration der Pneumokokken (Bergmann *et al.*, 2005). Diese Interaktion trägt zur Virulenz bei, indem das Eindringen der Pneumokokken in das Wirtsgewebe durch die proteolytische Wirkung des Plasmins erleichtert wird (Lottenberg *et al.*, 1994). Außerdem führte die Inaktivierung der Plasminogen-Bindungsstelle in der Enolase zu einer geringeren Virulenz der Pneumokokken im intranasalen Mausinfektionsmodell (Bergmann *et al.*, 2003).

3.3.3 Der Virulenzfaktor PavA

Das PavA (pneumococcal adhesion and virulence protein A) Protein ist neben der Enolase und GAPDH ebenfalls auf der Oberfläche der Bakterien lokalisiert, obgleich es in seiner Aminosäuresequenz weder ein Signalpeptid für den allgemeinen Sekretionsweg noch ein für Gram-positive Bakterien übliches C-terminales LPXTG-Motiv zur Verankerung an der Zellwand enthält (Navarre und Schneewind, 1994). Außerdem beinhaltet die Proteinsequenz von PavA keine Cholin-bindenden Repeats im C-terminalen Bereich, über die es an das Phosphorylcholin der Zellwand binden könnte (Yother und White, 1994). Die Oberflächenlokalisierung von PavA wurde mittels Immunelektronenmikroskopie bewiesen. Damit bildet PavA zusammen mit der Enolase und GAPDH von *S. pneumoniae* eine neue Klasse von Oberflächenproteinen (Chhatwal, 2002). Das *pavA*-Gen kommt in allen 64

getesteten klinischen Isolaten von *S. pneumoniae* vor, die 21 verschiedene Serotypen repräsentieren, und stellt somit ein hoch konserviertes Protein für *S. pneumoniae* dar (Holmes *et al.*, 2001). PavA besteht aus 551 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 63,3 kDa. Die Aminosäuresequenz von PavA weist eine 67% Homologie zu dem Fibronectin-bindenden Protein Fbp54 aus *Streptococcus pyogenes* und eine 74% Homologie zu dem Protein FbpA aus *Streptococcus gordonii* auf (Courtney *et al.*, 1994). Rekombinantes PavA bindet über den C-Terminus an immobilisiertes humanes Fibronectin, eine Komponente der extrazellulären Matrix des Wirtsorganismus (Holmes *et al.*, 2001). Die Zugabe von rekombinantem PavA-Protein blockiert die Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes Fibronectin. Hingegen zeigt die Zugabe des C-terminal verkürzten PavA-Proteins (42 kDa) keinen Einfluss auf diese Bindung. Des Weiteren weisen PavA-defiziente Pneumokokken eine um 50% reduzierte Bindung an immobilisiertes Fibronectin auf, was darauf hin deutet, dass PavA nicht das einzige Fibronectin-bindende Protein von *S. pneumoniae* ist (Holmes *et al.*, 2001). Neben der Eigenschaft, an Fibronectin zu binden, spielt PavA eine wichtige Rolle bei der Pathogenität von *S. pneumoniae*. PavA-defiziente Pneumokokken zeigen eine um das 10⁴-fache verminderte Virulenz in einem systemischen Infektionsmodell der Maus. Dabei weist die Inaktivierung des *pavA*-Gens in *S. pneumoniae* keine Auswirkung auf die Wachstumsrate, die Zellmorphologie, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Bakterienoberfläche und die Produktion der Virulenzfaktoren Pneumolysin, Autolysin, PspA und PsaA auf (Holmes *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde PavA in einer „signature tagged Mutagenese“ (STM) als Virulenzfaktor in einem Pneumonie-Mausinfektionsmodell identifiziert (Lau *et al.*, 2001). Außerdem zeigten Pneumokokken mit einem inaktivierten *pavA*-Gen eine signifikant geringere Virulenz im untersuchten Maus-Meningitis-Modell, als auch eine verminderte Adhärenzfähigkeit an Epithel- bzw. Endothelzellen (Pracht *et al.*, 2005). Eine Adhäsinfunktion konnte bei PavA nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Homologie zu FbpA von *L. monocytogenes* könnte PavA ebenso über eine Chaperon- sowie eine Eskortfunktion für andere Virulenzfaktoren verfügen, die großen Einfluss auf die Kolonisierung von Pneumokokken haben (Dramsı *et al.*, 2004).

3.4 Immunologische Reaktionen bei *S. pneumoniae*-Infektionen

Über einige der aufgezeigten Virulenzfaktoren von Pneumokokken ist die immunogene Wirkung bekannt. Die Zellwandkomponente Phosphorylcholin bindet an das C-reaktive Proteine und aktiviert somit das Komplementsystem des angeborenen Immunsystems (Mold *et al.*, 2002). Außerdem können Lipoteichonsäuren durch TLR2 („Toll-like“-Rezeptor 2) auf der Wirtszelle erkannt werden (Schroder *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 1999). Aufgereinigtes Peptidoglykan interagiert intrazellulär mit Nod1/Nod2 (Travassos *et al.*, 2004). Weiterhin binden Zellwandkomponenten von Pneumokokken an LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) im Serum, stimulieren Monozyten zur Produktion von Interleukin-1 und lösen über bestimmte Signalkaskaden die Expression von NF- κ B, TNF- α , Interleukin-6 und -8 aus (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989; Bergeron *et al.*, 1998; Heumann *et al.*, 1994; Saukkonen *et al.*, 1990; Spellerberg *et al.*, 1996). Pneumolysin aktiviert den klassischen Weg der Komplementkaskade, bindet unspezifisch an die Fc-Fragmente von Immunglobulin G und verringert die Migration von Neutrophilen (Paton, 1996, Mitchell *et al.*, 1991; Paton und Ferrante, 1983). Darüber hinaus stimuliert Pneumolysin die Produktion von Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1 β in humanen Monozyten und induziert die Freisetzung von TNF- α und Interleukin-6 über TLR4, Toll-like Rezeptor 4 (Houldsworth *et al.*, 1994; Malley *et al.*, 2003). PspA wirkt stark immunogen und verleiht im Mausmodell einen hohen Immunschutz (McDaniel *et al.*, 1994). Die Inaktivierung von PspA führt zu einer verminderten Virulenz und einer erhöhten Komplement-vermittelten Phagozytose der Bakterien (Ren *et al.*, 2004). PspA inhibiert die Aktivierung und die Anlagerung von C3 über den klassischen Komplementweg bzw. die Anheftung von C3b und damit die alternative Komplementkaskade (Ren *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2004; Tu *et al.*, 1999). Die Bindung von Faktor H an Hic schützt vor der Aktivierung von C3b und damit vor der Komplement-vermittelten Opsonophagozytose von *S. pneumoniae* (Jarva *et al.*, 2004). Gleichzeitig induzieren *htrA*-defiziente Mutanten während einer Pneumonie geringere Mengen der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 und TNF- α in der Maus verglichen mit dem isogenen Wildtyp (Sebert *et al.*, 2002; Mascher *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2004).

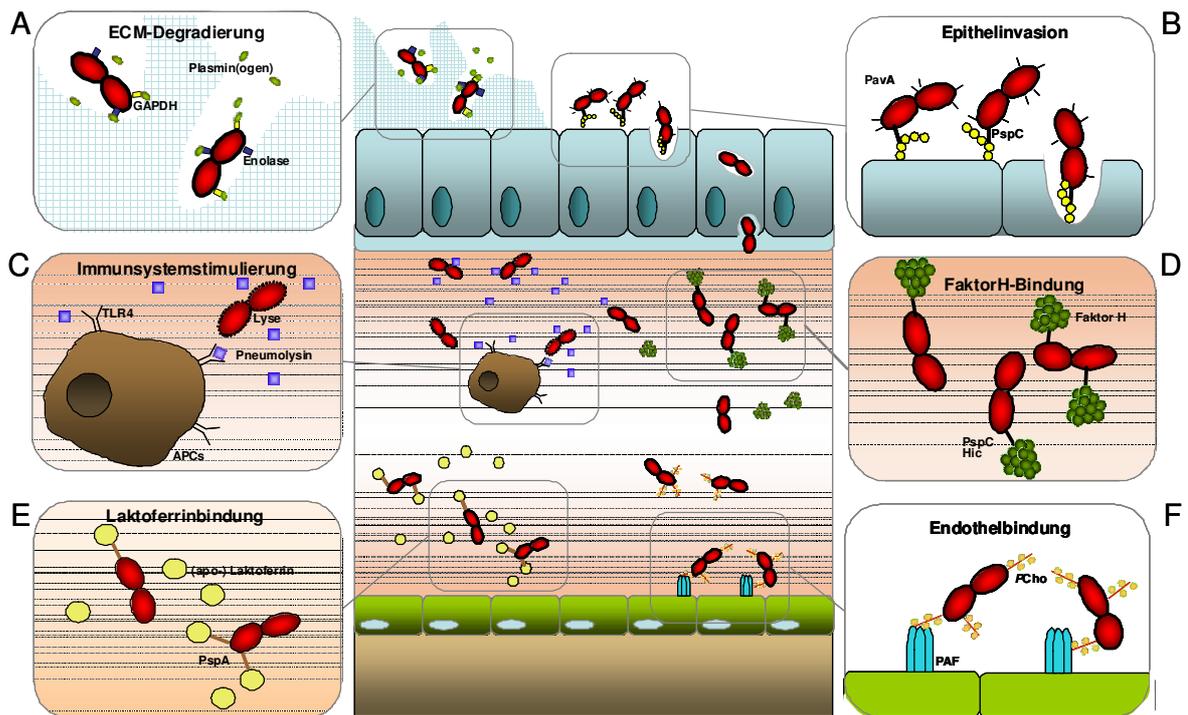


Abbildung 2: Übersicht über Virulenzstrategien von *S. pneumoniae*. Die Bindung von humanen Plasminogen an die bakterielle α -Enolase (A) unter Degradierung der extrazellulären Matrix ermöglicht den Pneumokokken die Interaktion über Oberflächenproteine wie PspC an den pIgR des Epithels (blau) zu binden und zu invadieren (B). Im Blutkreislauf (rosa) können sie lösliches Faktor H über PspC bzw. Hic binden, was die Adhärenz an das Endothel (grün) des Gewebes steigert (D). Die Ausschüttung von Pneumolysin führt bei APCs über die Bindung an TLR4 zu deren Stimulierung und fördert somit die Bildung von einem Entzündungsherd im Organismus (C). Zur Hemmung der bakteriziden Wirkung von Apolaktoferrin können Pneumokokken über PspA Laktoferrin binden (E). Die Endothelbesiedlung wird durch die Bindung an PAF über Pcho gewährleistet (F). (Quelle: verändert übernommen aus Hammerschmidt, 2006)

3.5 Die Interaktion von Streptokokken mit DCs

Das angeborene Immunsystem ist mit vielen hoch potenten Zellen ausgestattet, welche auf die Erkennung und Vernichtung von Fremdkörpern spezialisiert sind. Aufgrund der konstitutiven Verteilung in der Gewebesperipherie gelten DCs als erste immunologische Barriere für pathogene Erreger. Bei der bakteriellen Besiedlung des Wirtes ist eine Begegnung mit DCs somit unausweichlich. Für eine erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes und die Überwindung dieser unspezifischen Erkennungsmaschinerie durch DCs, entwickeln und verwenden pathogene Erreger bestimmte bakterielle Mechanismen. Auf der Erregerseite werden einige bakterielle Faktoren als starke immunogene Substanzen beschrieben, welche in der alternativen Vakzinisierungsentwicklung als lohnende

Kandidaten gelten könnten. DCs stellen in der heutigen Zeit aufgrund ihrer alterierenden immunologischen Funktionen wichtige Trägerkandidaten für die Entwicklung der Immuntherapie in der Pneumokokkenbekämpfung dar. Der medizinischen Immunisierung gegen *S. pneumoniae*, als auch gegen andere bekapselte Bakterien (*Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*), liegt die Generierung von Antikörpern gegen Kapselpolysaccharide zugrunde. Für einzelne Kapselpolysaccharide (Pneumokokken Serotyp 1) konnte eine Antigenpräsentation an CD4-positive T-Zellen über den MHC Klasse II Komplex durch DCs bewiesen werden (Stephen *et al.*, 2007; Kalka-Moll *et al.*, 2002). Aufgereinigte Kapselpolysaccharide von Pneumokokken interagieren mit DCs, werden sowohl durch Makropinozytose als auch durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert und intrazellulär prozessiert. Sowohl die Erkennung und als auch die Endozytose lösen aber keine Ausreifung und Zytokinproduktion aus (Meltzer und Goldblatt, 2006). Die Interaktion von Kapselbestandteilen der Pneumokokken erfolgt über den Makrophagen Mannose Rezeptor der DCs (Zamze *et al.*, 2002). Internalisierte Antigene, wie aufgereinigte Proteine, werden intrazellulär in ihrer nativen Form gelagert bis die DC durch ein zweiten Stimulus zur Ausreifung angeregt wird (Turley *et al.*, 2000). Die Stimulierung von DCs durch Hitze-inaktivierte Pneumokokken führte zu einer TNF- α , IL-10 und IL-12 Produktion, zur Ausreifung und zur Antigenpräsentation in naiven Mäusen (Colino und Snapper, 2002). IL-10 unterstützt dabei die Antikörperproduktion gegen Komponenten von inaktivierten Pneumokokken (Colino und Snapper, 2003). Die Interaktion von DCs und Pneumokokken kann auf zwei verschiedene Wege zur zellulären Apoptose führen. Pneumolysin löst die schnelle die Caspase unabhängige Apoptose aus. Die verzögerte Apoptose hingegen ist Caspase abhängig und tritt erst nach der vollständigen DC-Ausreifung ein. Dabei scheinen interagieren Kapselkomponenten von Pneumokokken mit Toll-like Rezeptoren (TLRs) zu interagieren und über den MyD88 Signaltransduktionsweg die Apoptose der DCs zu induzieren (Colino und Snapper, 2003). Im Fall von *Streptococcus pyogenes* Infektionen im Mausmodell tragen DCs durch Antigenpräsentation über MHC Klasse II und durch IL-12 und TNF- α Produktion verstärkt zur Induktion der spezifischen Immunabwehr bei (Loof *et al.*, 2007). Die Beteiligung des MyD88 Signaltransduktionsweg über verschiedene TLRs Kombinationen (TLR2/6) gewährleisten ein großes Erkennungsspektrum gegenüber des Pathogens und erlauben eine schnelle und effiziente Immunantwort (Loof *et al.*, 2008). *S. pyogenes* kann außerdem

intrazellulär in phagozytierenden Zellen, wie Makrophagen und polymorphkernigen mononukleare Neutrophile (PMNs), persistieren ohne prozessiert und abgetötet zu werden (Medina *et al.*, 2003b). Sie treten intrazellulär unter phänotypischen Veränderungen aus dem Phagosom ins Zytoplasma über (Medina *et al.*, 2003a). *Streptococcus gordonii* wird als Vakzinierungs-Kandidat verschiedener pathogener Antigene erforscht. Dieses Bakterium induziert in hohem Maße DC-Ausreifung und Zytokinausschüttung wichtiger inflammatorischer Moleküle, aber auch IL-10 (Corinti *et al.*, 1999). Der Endocarditis auslösende Streptokokken Stamm *Streptococcus mutans* induziert bei Monozyten die Ausdifferenzierung zu IL-12 produzierenden DCs, welche nach deren Stimulierung schnell ausreifen (Hahn *et al.*, 2005). Außerdem schleusen die somit aktivierten DCs in hohem Maße sehr schnell IL-1 β aus, welches zum erhöhten Endocarditis Risiko führt (Hahn *et al.*, 2007).

3.6 Antibiotikaresistenzen und Therapiemöglichkeiten für *S. pneumoniae*

In erster Linie wird bei der Behandlung von Pneumokokkeninfektionen Penicillin als Antibiotikum verwendet (Musher, 1992). Weiter können die Erreger mit anderen Antibiotika wie Ampicillin, Cephalosporin, Chloramphenicol oder Fluoroquinolon bekämpft werden. In den letzten Jahren sind vermehrt Stämme von *S. pneumoniae* aufgetreten, die eine Penicillin-Resistenz (z.B. in Südafrika, Spanien oder Ungarn) oder sogar Multiresistenzen zeigten. Diese Entwicklung beruht auf Modifikationen im Genom des Erregers. Dabei werden die Penicillin-Bindeproteine (Pbp) so verändert, dass eine geringere Affinität und Empfindlichkeit zu den Penicillinen entsteht (Tomasz und Munoz, 1995). Diese Proteine sind für die Biosynthese des Mureins notwendig. Seit fast 20 Jahren werden hochgradig resistente Isolate weltweit mit steigender Tendenz identifiziert. In den USA sind bereits 20 bis 30%, in Frankreich 40% und in Spanien, Ungarn, Rumänien sogar 45% der isolierten Pneumokokken gegenüber Penicillin resistent. Im Jahr 2000 wiesen mehr als 20% der Pneumokokkenisolate in Deutschland eine Erythromycinresistenz auf (Doern, 2001; Geslin, *et al.*, 1998; Marton, 1992; Fenoll *et al.*, 1998; Reinert *et al.*, 2004). Die Ursachen, die Ausbreitung und die Zunahme von Antibiotikaresistenzen sind vielfältig. Zum Einen führt die unkontrollierte und wiederholte Einnahme von Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum zu einer Selektion von multiresistenten Stämmen, die sich durch hohe Mobilität des Menschen überregional ausbreiten können. Außerdem erfolgt aufgrund der natürlichen Transformierbarkeit von Pneumokokken ein horizontaler

Gentransfer, der sehr schnell zur Verbreitung und Neukombination der Resistenzgene führen kann.

Alternativ zur Antibiotikabehandlung besteht die Möglichkeit der aktiven Immunisierung mit dem Pneumokokken-Vakzin PneumovaxTM (Merck Research Laboratories, USA). Es beinhaltet aufgereinigte Kapselpolysaccharide von 23 der am häufigsten vorkommenden Serotypen, welche systemische Infektionen auslösen. 85% bis 90% aller isolierten Pneumokokken in Europa und den USA weisen die in dem Impfstoff vorhandenen Kapselantigene auf (Kayser *et al.*, 1997). Die Wirksamkeit des PneumovaxTM liegt bei Kindern älter als 2 Jahren und bei Erwachsenen zwischen 61% und 75% (Butler, 1997; Fedson, 1998). Allerdings ist dieses Vakzin bei Kindern unter 2 Jahren nicht langfristig wirksam, da es keine T-Zell-abhängige Immunantwort induziert (Poland, 1999; Kato *et al.*, 2000). Aus diesem Grund wurde ein neuer Pneumokokken-Konjugatimpfstoff entwickelt, der nach ersten Studien einen hohen Schutz vor invasiven Infektionen bei Kleinkindern bereitstellt (Black *et al.*, 2000). Hierbei wurden aufgereinigte Polysaccharide an ein stark immunogenes Trägerprotein, dem Diphtherie-Toxin, gekoppelt, das nach der Immunisierung eine T-Zell-abhängige Immunantwort auslösen kann (Goldblatt, 2000). Der 7-valente Konjugatimpfstoff PrevnarTM (Wyeth, USA) enthält verbreitete Kapselpolysaccharide von 7 verschiedenen Serotypen und deckt damit die aus Patienten isolierten Pneumokokken Serogruppen 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F und 23F zu 85% in den USA, 60% bis 70% in Europa und 55% in Asien ab (Pelton *et al.*, 2003).

Allgemein kann bei Kapselpolysaccharid-Vakzinen nur gegen die im Impfstoff enthaltenen Serotypen eine Immunreaktion hervorgerufen werden. Deshalb richtet sich in der Forschung das Interesse auf die Untersuchung der immunogenen Wirkung von Proteinen, die allen Serotypen von *S. pneumoniae* gemeinsam sind, wie z.B. das Pneumolysin oder das Pneumococcal Surface Protein A (PspA). Beide konnten in Tierversuchen mit Mäusen Schutz gegenüber verschiedenen Serotypen hervorrufen (Paton und Ferrante, 1983; McDaniel *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1994).

Hinsichtlich der auszulösenden Immunität im Rahmen einer Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Toxinen werden einige interessante Möglichkeiten, wie dendritische Zellen als natürliche Hilfsstoffe einzusetzen, entwickelt (Steinman und Pope, 2002). So kann die Zahl an dendritischen Zellen im Organismus gesteigert, oder die Ausreifung dieser durch die kontrollierte Zufuhr bestimmter Indikatoren induziert werden.

Außerdem können Antigene gezielt auf dendritische Zellen angesetzt werden, welche dann prozessiert und über MHC-I bzw. MHC-II Komplex dem Immunsystem präsentiert werden. Für die immunologische Erkennung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen oder durch Makrophagen werden auch dendritische Zellen in der Krebstherapie eingesetzt. Dabei wird das Prinzip der Antigen-beladenen dendritischen Zellen verfolgt. Durch bestimmte Antigene, welche aus verschiedenen Krebsarten hergeleitet worden sind, werden unreife dendritische Zellen zur Reifung stimuliert und dem Organismus zugeführt. (Engelman, 2003). Antigen-Gene werden über DNA-Transfektion in die Zellen gebracht. Die DCs exprimieren und prozessieren das Fremdprotein, das folglich an der Zelloberfläche präsentiert wird. Zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen bedarf es einer Th1-Antwort, welche über die Präsentation von zytosolischen Antigenen über MHC-Klasse I erfolgt. Auch in der Infektionsforschung nehmen DCs als alternativen Therapieansatz eine große Rolle ein. Durch langjährige Zufuhr von Antibiotika entwickeln viele pathogene Mikroorganismen Resistenzen, welche zu einer Umstellung der verwendeten Behandlungen führen. Somit erfährt die antibiotische Therapie bei Infektionskrankheiten ernstzunehmende Grenzen, die es gilt durch die Entwicklung von neuen Bekämpfungstrategien zu überbrücken. Die Therapieansätze mit Hilfe von DCs wurden bereits mehrfach in Tiermodellen getestet und versprechen große Erfolge.

3.7 Zielsetzung der Arbeit

Pneumokokken besiedeln durch Adhärenz und Invasion humane Gewebszellen. Die Anheftung an Wirtszellen ist eine Voraussetzung dafür, dass die Bakterien innerhalb des Wirtsorganismus vordringen können, um im Zielgewebe schwerwiegende Krankheiten auslösen zu können. Dabei treffen Pneumokokken auf unspezialisierte Wächterzellen des Immunsystems, die Eindringlinge erkennen und zerstören. Zur erfolgreichen Kolonisierung des Wirtes müssen Pneumokokken Strategien entwickeln, um diese Hürde zu überwinden. Bestimmte Virulenzfaktoren der Pneumokokken vermitteln den Kontakt an Wirtszellen und induzieren u.U. die Invasion in die Zellen. Einige dieser Strukturen wurden bereits als immunogen eingestuft, da sie sehr stark das Immunsystem *in vivo* in der Maus aktivieren. Wie Pneumokokken dennoch dem hoch reaktiven angeborenen und erworbenen Immunsystem entgehen können und welche bakteriellen Faktoren dafür wichtig sind, wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Die hier aufgeführten Experimente sollten zur detaillierten Aufklärung der zellulären Bekämpfung von Pneumokokken dienen.

Hinsichtlich der wichtigen immunologischen und therapeutischen Funktion von dendritischen Zellen, sollte die Art der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und APCs, im Speziellen DCs, untersucht und charakterisiert werden. Dafür sollten humane DCs aus Monozyten effizient für Phagozytoseexperimente und immunologische Analysen unter Kulturbedingungen gezüchtet werden. Durch *in vitro* Infektionsversuche sollte die Erkennung von *S. pneumoniae* durch APCs und deren Aufnahme in die Immunzellen aufgeklärt werden. Dabei sollte der Einfluss wichtiger Virulenzfaktoren von Pneumokokken, wie der Kapselpolysaccharide, des Toxins Pneumolysin und in der Hauptsache Pava näher charakterisiert werden. Pava ist ein bedeutender Virulenzfaktor der Pneumokokken und spielt eine wichtige Rolle *in vivo* im Sepsis- und Meningitis Maus-Modell. Ziel dieser Forschungsarbeit war es die potenzielle virulente und biologische Funktion von Pava bei der Kolonisierung und der Interaktion von Pneumokokken mit APCs zu untersuchen. Ausgehend von den Studien sollte die Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Pneumokokken-stimulierte DCs identifiziert werden. Das intrazelluläre Schicksal und die Lokalisation von Pneumokokken in humanen DCs sollten über CLSM („confocal laser scanning microscopy“) und in Infektionsversuchen in der Zellkultur aufgedeckt werden. Diese Untersuchungen sollen letztlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese von Infektionen durch *S. pneumoniae* beitragen. Die vollständige Aufklärung der Funktionen bakterieller Faktoren kann bei der Suche nach alternativen Therapieansätzen helfen immunogene konservierte Zielproteine zu finden. So könnten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae*, wie beispielsweise Pava, in der Zukunft eine Rolle bei innovativen Impfmethode gegen Pneumokokkenerkrankungen spielen.

4 Ergebnisse

4.1 Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von DCs

In dieser Arbeit wurden *in vitro* Infektionsexperimente mit humanen DCs durchgeführt. Die Kultivierung der primären Immunzellen erfolgte mit Hilfe eines standardisierten Protokolls. Aus peripherem humanem Blut wurden CD14-exprimierende Monozyten isoliert und mit Hilfe ihrer Adhärenzfähigkeit selektioniert. Durch die regelmäßige Zugabe von GM-CSF und IL-4 erfolgte die kontrollierte Differenzierung zu CD11c-produzierenden DCs. Bei vollständiger Ausdifferenzierung zu DCs exponieren die Zellen kein CD14 an der Zelloberfläche und werden als CD14-negativ beschrieben. Dieses spezifische Expressionsmuster der Zellen wird zur Charakterisierung mit zytometrischen Messungen der Oberflächenstruktur verwendet. Zur Überprüfung der DC-Zellkultur wurde alle 24 h der DC-Kultivierung die Existenz von CD14 und CD11c nach extrazellulärer Antikörperdetektion im Durchflusszytometer erfasst und quantifiziert.

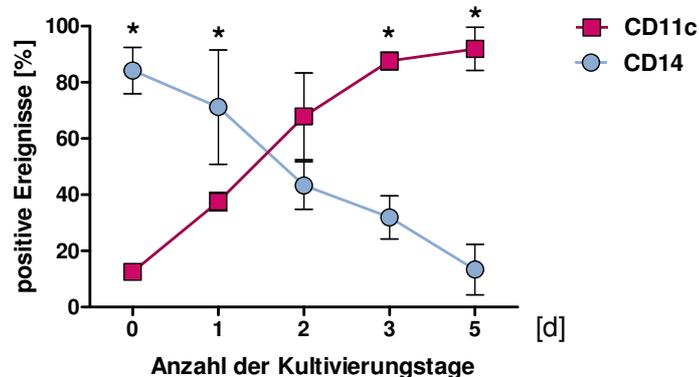


Abbildung 3: Differenzierung von CD14-positiven Monozyten zu CD11c-positiven DCs. Monozyten wurden per Adhärenz selektioniert (Tag 0) und mit GM-CSF und IL-4 zur DC-Differenzierung stimuliert. Das charakteristische Oberflächenmuster der Zellen wurde durch extrazelluläre Antikörperdetektion von CD14 bzw. CD11c zytometrisch für jeden Tag der Aufzucht bestimmt. Dafür wurde von 10000 gemessenen Ereignissen der Prozentsatz CD11c- bzw. CD14-positiver Zellen berechnet. * $p < 0,05$

| Aufzuchtstage [d] | CD14-positive Ereignisse [%] | CD11c-positive Ereignisse [%] | p-Werte |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|---------|
| 0 | 84,2 ± 8,28 | 12,53 ± 1,76 | 0,0001 |
| 1 | 71,18 ± 20,38 | 37,5 ± 3,29 | 0,0475 |
| 2 | 43,3 ± 8,47 | 67,9 ± 15,42 | 0,0689 |
| 3 | 31,97 ± 7,64 | 87,58 ± 3,13 | 0,0046 |
| 5 | 13,35 ± 9,01 | 91,92 ± 7,67 | 0,0002 |

Tabelle 1: Anzahl an CD14-positiven Monozyten und CD11c-positiven DCs. Der Anteil an positiven Ereignissen nach angegebener Kultivierungsdauer wurde prozentual mit Standardabweichung dargestellt.

Nach der Isolierung von Monozyten aus peripherem Blut konnten am gleichen Tag (Tag 0) 84,2% CD14-positive und 12,53% CD11c-positive Ereignisse detektiert werden (Abbildung 3, Tabelle 1). Die Zugabe von GM-CSF und IL-4 führte an Tag 1 zu einem Anteil von 71,18% an CD14- und 37,5% an CD11c-positiven Zellen. An Tag 2 erhöhte sich der Anteil an DCs auf 67,9%. Im Gegensatz dazu verringerte sich der Prozentsatz an Monozyten um 40%, auf 43,3%. Proportional zur Kultivierungsdauer erhöhte sich der Anteil an vorliegenden DCs und umgekehrt verringerte sich die Anzahl gemessener Monozyten. Nach 5 Tagen konnten 91,91% CD11c- und 13,35% CD14-positive Zellen in Kultur nachgewiesen werden (Abbildung 3, Tabelle 1). Zu diesem Zeitpunkt wurden die vollständig ausdifferenzierten DCs geerntet und für weitere Experimente im unreifen Zustand eingesetzt.

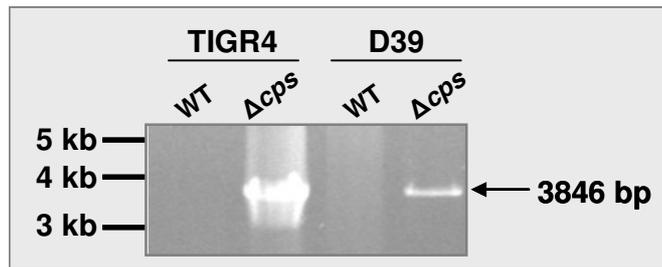
4.2 Die Rolle des bakteriellen Kapselpolysaccharids bei der Interaktion von *S. pneumoniae* mit Makrophagen und DCs

Die Kapselpolysaccharide von *S. pneumoniae* stellen einen der wichtigsten Virulenzfaktoren dar (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Die Anheftung und die Invasion von Pneumokokken an Epithel- bzw. Endothelzellen werden während der Kolonisierung von der Kapselexpression beeinflusst. Pneumokokken zeigen im Verlauf einer Infektion eine Modulationsfähigkeit bei der Kapselproduktion, was die Adhärenz an das Wirtsgewebe garantieren kann (Weiser *et al.*, 1994; Hammerschmidt *et al.*, 2005). Im Bezug auf die Interaktion mit DCs ist bereits bekannt, dass aufgereinigte Kapselpolysaccharide von Pneumokokken phagozytiert werden, was jedoch zu keiner alterierenden Immunantwort führt (Meltzer und Goldblatt, 2006).

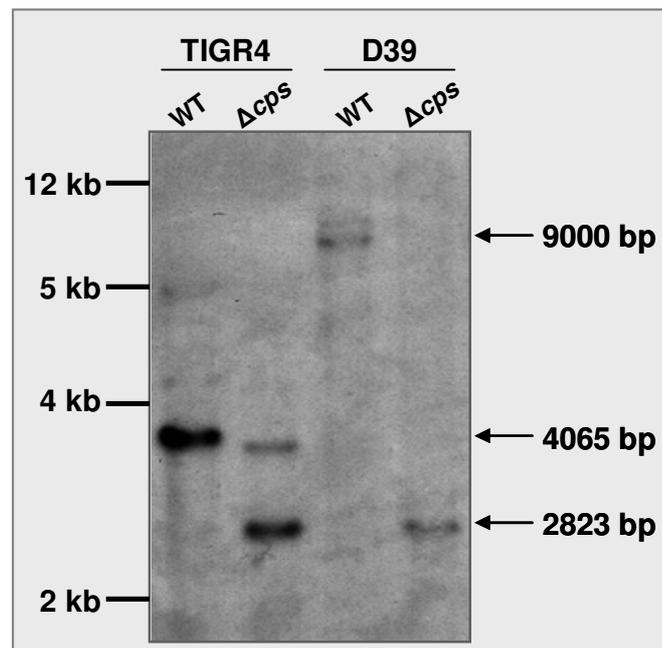
4.2.1 Herstellung einer Kapsel-defizienten Mutante von *S. pneumoniae* D39

Zur Untersuchung des Einfluss der Kapsel bei der Interaktion von Pneumokokken und APCs während einer Infektion, wurde zunächst die Kapselpolysaccharid-defiziente Mutante D39 Δ *cps* des bekapselten Stammes D39 (Serotyp 2) hergestellt. Die bereits kapsellose Mutante des bekapselten TIGR4 (Serotyp 4; erhalten von F. Ianelli, Siena) wurde durch die Deletion des Kapselgenkomplex generiert. Dieser mutierten Region wurde zu Selektionszwecken ein Kanamycinreistenzgen eingefügt. Der Bereich wurde zusammen mit den flankierenden DNA-Sequenzen der benachbarten Gene *dexB* und *aliA* mittels einer PCR amplifiziert. Der Pneumokokkenstamm D39 wurde mit dem resultierenden PCR-Produkt unter Standardbedingungen transformiert. Die erhaltenen Mutanten wurden auf Kanamycin-haltigen Blutagarplatten bei 37°C kultiviert. Das lineare DNA-Fragment wurde durch homologe Rekombination in das Genom des D39 Stammes integriert und führte zur Deletion des Kapselgenkomplex. Die Generierung der Transformanten wurde in der PCR überprüft (Abbildung 4 A). Die PCR erfolgte mit den Oligonukleotiden *dexBF2* und *aliAR1*. Im Fall einer Deletion entsteht ein Genprodukt von 3846 kb. Mit der Southern-Blot-Analyse wurde durch spezifische Sondenhybridisierung die Mutagenese des Kapselgenkomplex nachgewiesen. Dabei wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *HindIII* fragmentiert und mit einer *dexB*-spezifischen DNA-Sonde überprüft (Abbildung 4 B). Die DNA-Sonde wurde mit den Oligonukleotiden *dexBF2* und *dex19Frevers* in einer PCR hergestellt. Phänotypisch wurde die Kapselproduktion nach einer speziellen Ruthenium-Kapsel-Fixierung in der Transmissions-Elektronenmikroskopie verifiziert (Abbildung 4 C). Die PCR-Amplifikation des Kapselgenlokus der Pneumokokken mit den Primern *dexBF2* und *aliAR1* ergab im Falle der kapsellosen Variante des TIGR4 und der Transformante ein PCR-Produkt der Größe 3,8 kb (Abbildung 4 A). Im Vergleich dazu konnte bei den bekapselten Varianten von TIGR4 und D39 kein PCR-Produkt nachgewiesen werden (Abbildung 4 A). Bekapselte Stämme weisen den Kapselgenlokus einer Gesamtgröße von ca. 25 kb im Genom von TIGR4 und D39 auf. Bei dieser Größe konnte unter den gegebenen PCR-Bedingungen kein Produkt amplifiziert werden.

A



B



C

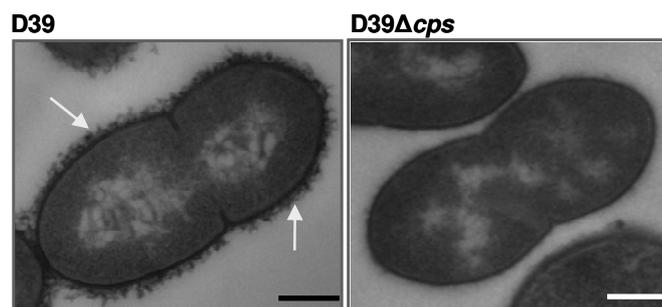


Abbildung 4: Charakterisierung der Deletion des Kapselgenkomplex (*cps*) bei Pneumokokken. Durch die Agarosegelelektrophorese (1%) wurden die PCR-Produkte der Amplifikation des Pneumokokkengenoms mit *dexBF2* und *aliAR1* aufgetrennt (A). In der Southern-Blot-Analyse wurden die DNA-Fragmente nach *dexBF2/dex19F* revers-Sondenhybridisierung visualisiert (B). Analysiert die chromosomale DNA des bekapselten TIGR4, unbekapselten TIGR4 Δcps , bekapselten D39 und der Transformante von D39 Δcps . In TEM wurde der bekapselte D39 und die Transformante D39 Δcps phänotypisch untersucht. Kapselstrukturen wurden mit Pfeilen markiert. Die Skalierungsbalken entsprechen 0,5 μm .

Die Southern-Blot-Analyse zeigte sowohl bei der Transformante des Stammes D39 als auch beim Kontrollstamm TIGR4 Δ cps (Abbildung 4 B) ein Hybridisierungssignal im Bereich von 2,8 kb. Bei den bekapselten Stämmen TIGR4 und D39 (Abbildung 4 B) trat, abweichend von den unbekapselten Varianten, ein Signal bei ca. 4 kb für TIGR4 bzw. 9 kb für D39 auf. Durch Transmissions-elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen konnte die Produktion der Kapsel des D39-Stamm eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 4 C, markiert mit Pfeilen). Die Deletionsmutante D39 Δ cps wies keine Kapselstrukturen auf (Abbildung 4 C). Aufgrund der dargestellten Ergebnisse der Kontroll-PCR und der Southern-Blot-Analyse konnte molekularbiologisch die Deletion der Kapselgene bei der D39 Transformante bewiesen werden. Die fehlende Kapselproduktion der Transformante wurde außerdem anhand von phänotypischen Untersuchungen in der TEM dargestellt. Bei der Serotypisierung der D39 Δ cps-Mutante konnte durch die fehlende Reaktion mit einem serotypspezifischen Antiserum die vollständige Deletion von D39 Δ cps bestätigt werden.

4.2.2 Einfluss der Pneumokokkenkapsel auf die Interaktion mit APCs

In den folgenden experimentellen Untersuchungen sollte der Einfluss der Kapselproduktion auf die Interaktion von *S. pneumoniae* mit unreifen DCs und J774-Makrophagen aufgeklärt werden. Dafür wurden murine J774-Makrophagen und aus humanen Monozyten gezüchtete DCs mit *S. pneumoniae* verschiedener Serotypen infiziert. Bekapselte (NCTC10319, ATTC11733, D39) und unbekapselte (R800, D39 Δ cps) Pneumokokkenstämme wurden in *in vitro* Infektionsversuchen mit einer MOI („Multiplicity of infection“) von 50 Bakterien pro Zelle eingesetzt. Nach 30 min Infektionsdauer wurden extrazelluläre Bakterien mit Gentamicin und Penicillin G abgetötet. Die Quantifizierung der überlebenden intrazellulären Bakterien erfolgte durch die Bestimmung der CFUs (Colony Forming Units = Kolonie bildende Einheiten) nach Kultivierung auf Blutagarplatten (Abbildung 5 A, B). Außerdem wurde sowohl die Adhärenz an DCs als auch die Aufnahme in DCs der aufgeführten Serotypen untersucht. DCs wurden mit D39, der Kapselmutante D39 Δ cps, NCTC10319 und ATCC11733 für 60 min infiziert und für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit den Antikörpern anti-Pneu-anti-Kaninchen und anti-Kaninchen-Alexa 488 bzw. Alexa 568 markiert. Nach der Doppelimmunfluoreszenzfärbung erschienen extrazelluläre Bakterien als gelb- und intrazelluläre Bakterien als rot-fluoreszierende Mikroorganismus. Zur Darstellung wurden

im konfokalen Fluoreszenzmikroskop repräsentative Infektionsausschnitte der Zellen ausgewählt und digitalisiert (Abbildung 5 C).

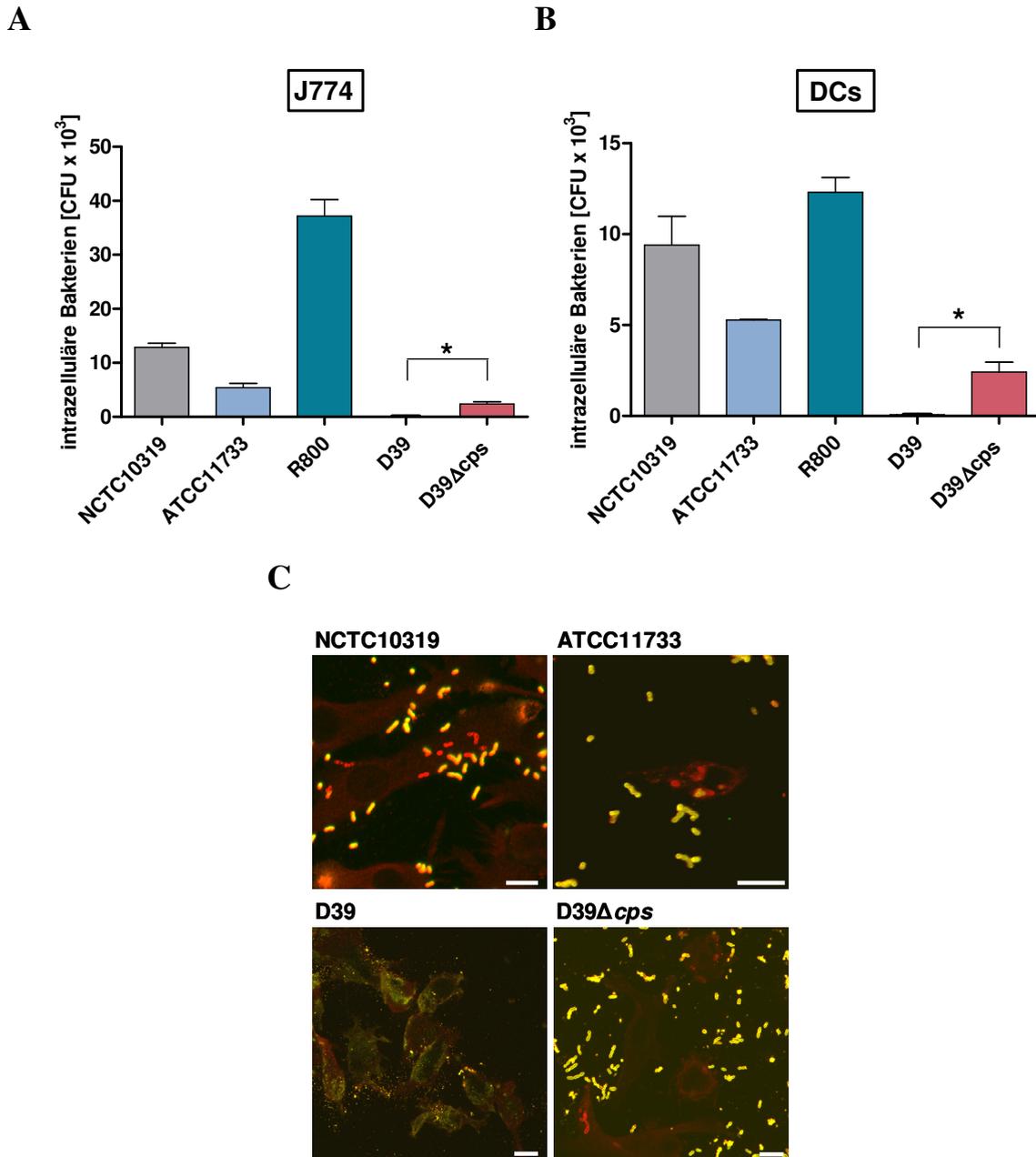


Abbildung 5: Einfluss der Kapsel auf die Interaktion von *S. pneumoniae* und APCs. Murine J774-Makrophagen (A) und humane DCs (B) wurden mit bekapselten Pneumokokken des Serotyps 35A (NCTC10319), des Serotyps 2 (ATCC11733 und D39) und mit den unbekapselten Stämmen R800 und D39Δcps für 30 min infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden durch Antibiotikabehandlung eliminiert. Die CFUs pro 1×10^5 infizierter Zellen internalisierter Bakterien wurden auf Blutagarplatten quantifiziert (A und B). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (C) zeigen eine 60-minütige Infektion von humanen DCs mit NCTC10319, ATCC11733, D39 und D39Δcps. Extrazelluläre Bakterien erscheinen gelb während intrazelluläre Pneumokokken rot leuchten. Die dargestellten Skalierungsbalken entsprechen einer tatsächlichen Länge von 10 μm . * $p < 0,04$

Der unbekapselte Stamm R800 zeigte in beiden Fällen der getesteten Zelltypen die höchste Internalisierungsrate in DCs bzw. Makrophagen der untersuchten Serotypen (Abbildung 5 A und B). Bei J774-Zellen konnte mit $37,18 \times 10^3$ Bakterien die dreifache Menge an internalisierten R800-Pneumokokken im Vergleich zu humanen DCs mit $12,3 \times 10^3$ Pneumokokken nachgewiesen werden. Der schwach bekapselte Stamm NCTC10319 zeigte mit $9,4 \times 10^3$ CFUs bei DCs und mit $12,9 \times 10^3$ Bakterien bei J774-Zellen nach R800 die zweit höchste Internalisierungsrate unter den verwendeten Bakterienstämmen (Tabelle 2). Die bekapselten Pneumokokkenstämme des Serotyps 2 (ATCC11733 und D39) wurden mit geringster Effizienz in beide untersuchten Zelltypen aufgenommen. Vom Stamm D39 wurden insgesamt nur 50 bzw. 60 internalisierte Bakterien in insgesamt 1×10^5 DCs bzw. J774-Zellen nachgewiesen. Im Vergleich dazu wurde bei der Deletion der Kapsel von D39 ($D39\Delta cps$) mit 2310 CFUs bei J774-Zellen bzw. 2420 bei DCs eine signifikant gesteigerte Aufnahme in die Zellen beobachtet. In der Fluoreszenzmikroskopie von infizierten DCs konnten bei NCTC10319, ATCC11733 und $D39\Delta cps$ sowohl adhärenzte (gelb) als auch intrazelluläre Pneumokokken (rot) nachgewiesen werden (Abbildung 5 C). Die Anzahl aufgenommener Pneumokokken war für die bekapselten Stämme NCTC10319 und ATCC11733 gleichwertig. Phänotypisch konnten beim ATCC11733 Stamm intrazelluläre Zusammenlagerungen von Pneumokokken beobachtet werden. Internalisierte NCTC10319 Bakterien lagen hingegen vereinzelt vor. Beim stark bekapselten Stamm D39 konnten weder adhärenzte noch intrazelluläre Bakterien nachgewiesen werden.

| S. p. Stämme | Intrazelluläre Bakterien [CFU x 10 ³] pro 1x 10 ⁵ Zellen | |
|-----------------|---|--------------|
| | J774-Zellen | DCs |
| NCTC10319 | 12,9 ± 1,45 | 9,4 ± 2,73 |
| ATCC11733 | 5,4 ± 1,54 | 5,27 ± 0,07 |
| R800 | 37,18 ± 6,07 | 12,30 ± 1,42 |
| D39 | 0,06 ± 0,05 | 0,05 ± 0,02 |
| $D39\Delta cps$ | 2,31 ± 0,82 | 2,42 ± 1,22 |
| P – Werte (D39) | 0,0349 | 0,0119 |

Tabelle 2: Anzahl intrazellulärer Pneumokokken mit unterschiedlicher Kapselproduktion in APCs. Die CFUs von Pneumokokken aus 1×10^5 Wirtszellen wurden nach 30 min Infektion und einstündiger Antibiotikabehandlung nach Ausplattierung auf Blutagarplatten bestimmt.

Bei klinisch relevanten und invasiven Pneumokokken Isolaten handelt es sich um bekapselte Varianten von *S. pneumoniae*. Während der Wirtskolonisierung kann die Kapsel durch Phasenvariation gezielt reguliert werden. Die Effizienz der Aufnahme von Pneumokokken war bei unbekapselten Pneumokokken am höchsten. Die stark bekapselten Stämme konnten durch APCs nicht erkannt bzw. internalisiert werden. Zur experimentellen Untersuchung verschiedener Virulenzfaktoren bezüglich der Interaktion mit Immunzellen wurde als Modellstamm der bekapselte Stamm *S. pneumoniae* NCTC10319 des Serotyps 35A verwendet. Dadurch wird in allen nachfolgenden Untersuchungen die physiologische Natur der pathogenen Pneumokokken durch die Existenz der Kapsel berücksichtigt.

4.3 Die Rolle des bakteriellen Pneumolysins bei der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und APCs

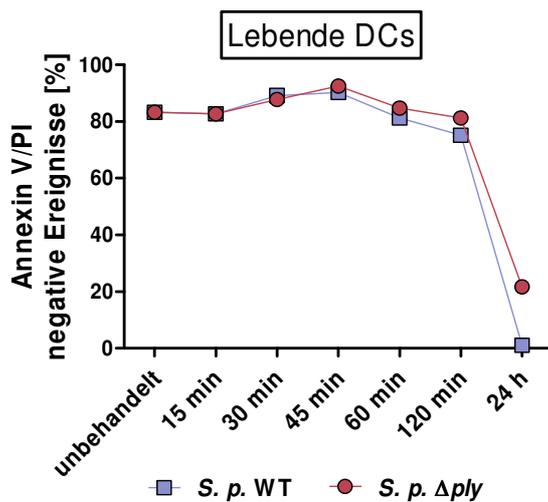
Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken ist das Zytotoxin Pneumolysin. Durch das lytischwirkende Toxin können Wirtszellen während der Kolonisierung von *S. pneumoniae* geschädigt werden. Pneumolysin begünstigt somit das Vordringen des Bakteriums im Wirtsorganismus. Außerdem sind die starke immunogene Wirkung des Toxins und die Fähigkeit der Caspase-abhängigen Apoptoseinduktion bekannt. Der Einfluss von Pneumolysin auf die Anheftung und die Aufnahme von Pneumokokken durch DCs bzw. J774-Makrophagen wurde bisher nicht untersucht. In den folgenden Versuchen wurde daher zunächst die Rolle von Pneumolysin bei der Interaktion zwischen Pneumokokken und APCs aufgeklärt.

4.3.1 Apoptoseinduktion von DCs durch Pneumolysin-produzierende Pneumokokken

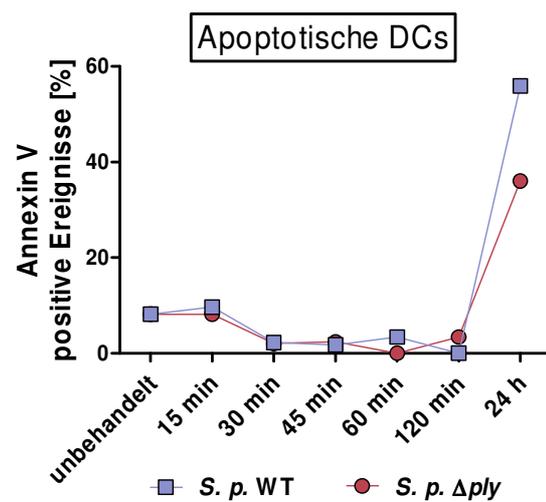
Während der Kolonisierung des Wirtes durch *S. pneumoniae* führt die Pneumolysinseznierung zur Lyse der Wirtszellen. Die Zelllyse wird bei eukaryotischen Zellen durch Bildung von Membranporen induziert. Außerdem kann der automatisierte Zelltod, die sogenannte Apoptose, über Caspase-abhängige bzw. -unabhängige Signaltransduktionswege eingeleitet werden (Colino und Snapper, 2003b). Weiterhin können die Wirtszellen in einen nekrotischen und lysierten Zustand versetzt werden. Mit der Induktion der Apoptose wird eine Translokation von Phosphatidylserin (PS) auf die Außenseite der Zellmembran ausgelöst. Das PS kann spezifisch durch das Protein Annexin V gebunden werden. Zur zytometrischen Detektion des programmierten Zelltods wurde

FITC-konjugiertes Annexin V eingesetzt werden. Mit dem Einbau von durchlässigen Membranporen setzt die Nekrose ein. Zum Nachweis der Nekrose wird der DNA-interkalierende Farbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. PI diffundiert in die beschädigte Zelle und färbt sie rot-fluoreszierend an. Zytometrisch erscheinen apoptotische Zellen für FITC-Annexin V positiv und für PI negativ. Nekrotische Zellen sind sowohl FITC-Annexin V und als auch PI positiv. Lebende Zellen hingegen sind in beiden Fluoreszenzbereichen ungefärbt. Über diese Methode können alle drei Zustände einer eukaryotischen Zelle zytometrisch erfasst und quantifiziert werden. Im Folgenden wurde der zelllytische Einfluss von Pneumolysin-sekretierendem *S. p.* WT und Pneumolysin-defizienten Pneumokokken *S. p.* Δply auf DCs bezogen auf die Apoptose- bzw. Nekroseinduktion im Durchflusszytometer untersucht. Dazu wurden DCs mit Pneumokokken für 15, 30, 45, 60, 120 min und 24 h mit einer MOI von 50 Bakterien pro Zelle stimuliert. Die infizierten Zellen wurden mit den Substanzen Annexin V-FITC (grün) und Propidiumiodid (rot) inkubiert. Zur Detektion der zellulären Zustandsformen wurde das Apoptosis Staining Kit© von Amersham verwendet und als Kontrolle unbehandelte DCs eingesetzt. Im Durchflusszytometer wurden die prozentualen Anteile der positiven bzw. negativen Ereignisse der Annexin V-FITC/PI Färbung gemessen und ausgewertet.

A



B



C

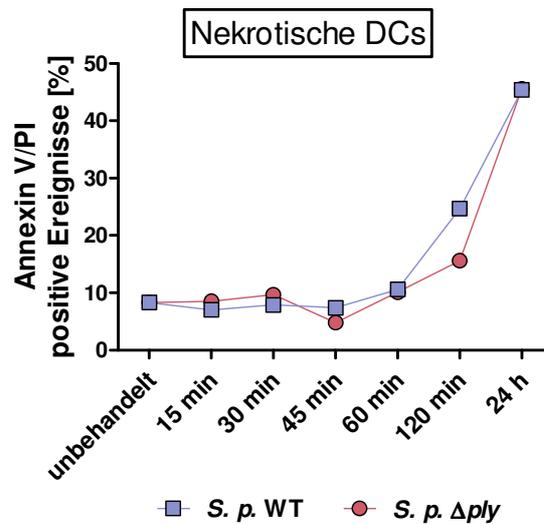


Abbildung 6: Zytometrische Bestimmung lebender, apoptotischer und nekrotischer DCs nach Stimulierung mit Pneumokokken in Abhängigkeit von Pneumolysin. DCs wurden mit *S. p.* WT und *S. p. Δply* für die aufgeführte Infektionsdauer stimuliert und mit Annexin V-FITC und PI inkubiert. Unbehandelte DCs wurden als Kontrolle verwendet. Lebende Zellen erschienen in beiden Detektionsbereichen als negative Ereignisse (A), apoptotische als Annexin V positive aber PI negative Ereignisse (B) und nekrotische Zellen als positive Ereignisse (C).

Der Anteil der Annexin V/PI negativen Ereignisse (lebende DCs) veränderte sich nach 15 min bis 120 min Infektionsdauer nicht (Abbildung 6 A). Bei fortlaufender Infektion verringerte sich die Rate lebender DCs, die mit *S. p. Δply* stimuliert wurden, von 81,3% auf 21,7% und beim Pneumolysin-produzierenden Stamm *S. p. WT* sogar von 75,2% auf 1,0% (Abbildung 6 A, Tabelle 3). Die Anzahl Annexin V-FITC-positiver Ereignisse der stimulierten Zellen blieb bis 120 min Infektionsdauer unverändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 6 B). Zwischen 120 min und 24 h stieg die Apoptoserate bei *S. p. Δply*-stimulierten Zellen von 3,4% auf 36,1%, im Fall des Pneumolysin-produzierenden Stammes *S. p. WT* sogar von 0,0% auf 55,9% (Abbildung 6 B, Tabelle 3). Die Anzahl Annexin V/PI positiver Ereignisse (nekrotische Zellen) zeigte eine Steigerung ab 60 min Infektionsdauer (Abbildung 6 C). Ab 120 min Infektionsdauer stieg der Anteil nach Stimulierung mit dem Pneumolysin-produzierenden Stamm *S. p. WT* von 10,6% auf 24,7% an, wobei nach dieser Zeit kein Anstieg der Apoptoserate zu erkennen war. Ohne Pneumolysin konnten nur 15,6% nekrotische Zellen nach 120 min nachgewiesen werden (Abbildung 6 C, Tabelle 3). Weiterhin stieg die Anzahl nekrotischer Zellen nach deren Stimulierung über 24 h unabhängig von der

Pneumolysinproduktion der Pneumokokken auf 45,4% bzw. 45,6% an (Abbildung 6 C, Tabelle 3).

| Infektion | Lebende Zellen [%] | | Apoptotische Zellen [%] | | Nekrotische Zellen [%] | |
|-------------|--------------------|----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| | <i>S. p.</i> WT | <i>S. p.</i> Δ <i>ply</i> | <i>S. p.</i> WT | <i>S. p.</i> Δ <i>ply</i> | <i>S. p.</i> WT | <i>S. p.</i> Δ <i>ply</i> |
| unbehandelt | 83,3 | 83,3 | 8,2 | 8,2 | 8,3 | 8,3 |
| 15 min | 82,7 | 82,7 | 9,7 | 8,2 | 7,0 | 8,5 |
| 30 min | 89,2 | 87,8 | 2,3 | 2,1 | 7,9 | 9,7 |
| 45 min | 90,3 | 92,5 | 1,8 | 2,4 | 7,4 | 4,8 |
| 60 min | 81,3 | 84,8 | 3,4 | 0,0 | 10,6 | 10,1 |
| 120 min | 75,2 | 81,3 | 0,0 | 3,4 | 24,7 | 15,6 |
| 24 h | 1,0 | 21,7 | 55,9 | 36,1 | 45,4 | 45,6 |

Tabelle 3: Quantifizierung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen DCs nach Stimulierung mit Pneumokokken mittels Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz fluoreszierender Zellen wurde von 10000 Ereignissen berechnet.

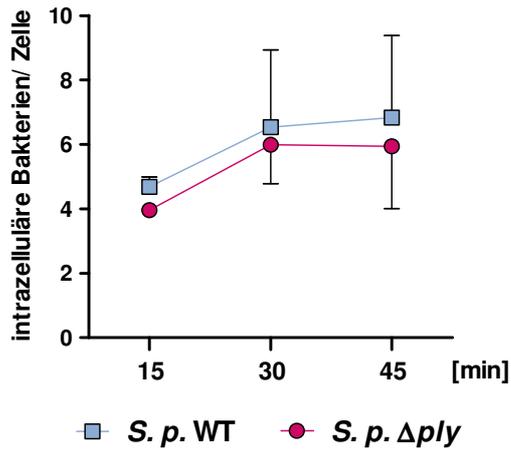
Die Ergebnisse bewiesen die Induktion von Apoptose und Nekrose bei DCs durch Pneumokokken unter den gegebenen Versuchsbedingungen ab einer Infektionsdauer von 120 min. Das Maximum der Apoptose und der Nekrose wurde nach 24 h erreicht. Außerdem führte die Sezernierung von Pneumolysin nach 24 h zu einer Erhöhung geschädigter Zellen, die sowohl apoptotisch als auch nekrotisch erschienen. Für weiterführende Infektionsversuche mit DCs wurde somit eine Infektionsdauer zwischen 15 min und 45 min gewählt, um eine Schädigung der Zellen ausschließen zu können.

4.3.2 Einfluss von Pneumolysin auf die Internalisierung von *S. pneumoniae* durch APCs

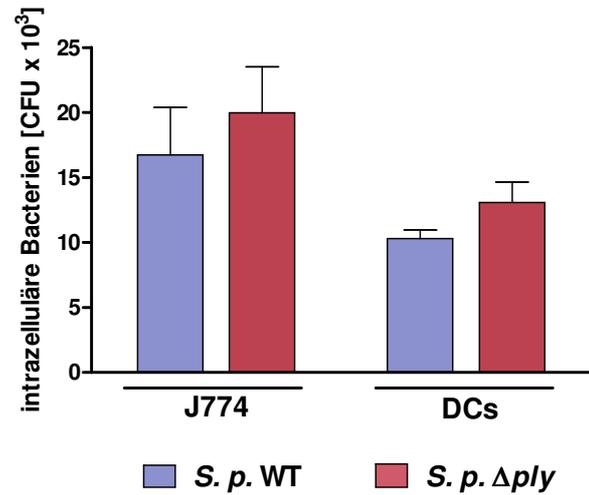
Da Pneumolysin in den frühen Zeitpunkten der *in vitro* Infektionen keine Auswirkungen auf die Lebendrate der Zellen hatte, wurde im Folgenden der Einfluss des Toxins auf die Interaktion von Pneumokokken und APCs in *in vitro* Infektionsversuchen untersucht (Abbildung 6). DCs und J774-Zellen wurden mit dem Pneumokokken Stamm *S. p.* WT und der isogenen Pneumolysin-defizienten Mutante *S. p.* Δ *ply* mit einer MOI von 50 infiziert (Abbildung 7). Nach der DC-Stimulierung über 15, 30 und 45 min wurden die intrazellulären Pneumokokken mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektiert (Abbildung 7 A). Die Quantifizierung der intrazellulären Bakterien erfolgte durch das Auszählen der fluoreszierenden Pneumokokken im Fluoreszenzmikroskop. Die

Bestimmung der Anzahl intrazellulär überlebender Pneumokokken wurde nach 30 min Infektionsdauer und antibiotischer Abtötung von extrazellulären Bakterien für 1 h durchgeführt (Abbildung 7 B). Auf Blutagarplatten wurden die CFUs ausgewertet, die aus 1×10^5 Zellen isoliert wurden.

A



B



C

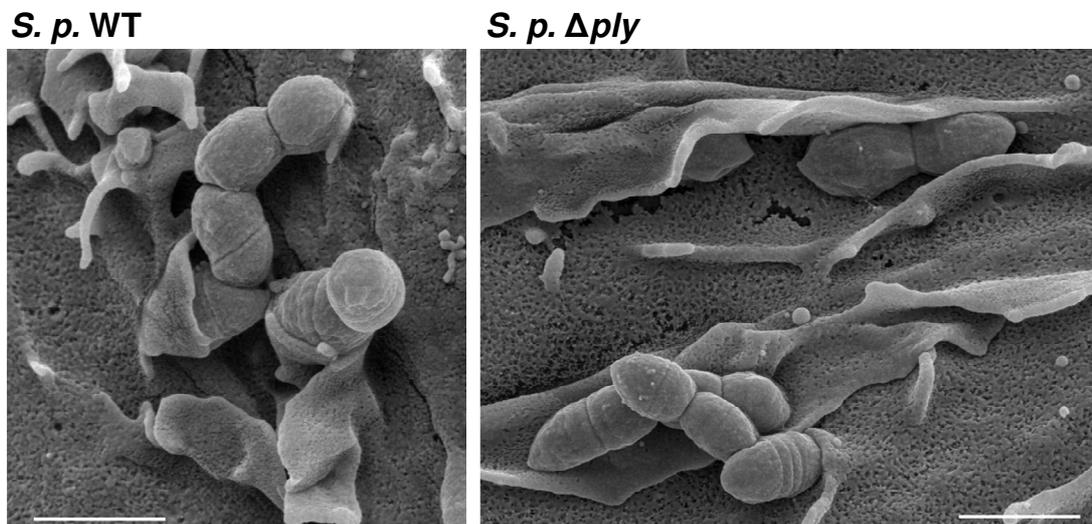


Abbildung 7: Einfluss von Pneumolysin auf die Internalisierung von *S. pneumoniae* durch APCs. DCs und J774-Zellen wurden mit den Pneumokokkenstämmen *S. p. WT* und *S. p. Δply* mit infiziert. In DCs aufgenommene Bakterien wurden über Doppelimmunfluoreszenzfärbung detektiert und nach 15, 30 und 45 min quantifiziert (A). Extrazelluläre Bakterien wurden nach 30 min Infektion mit Antibiotika abgetötet. Die Anzahl internalisierter Bakterien wurde durch die Bestimmung der CFUs pro 1×10^5 DCs bzw. J774-Makrophagen dargestellt (B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine 30-minütige Infektion von DCs mit Pneumokokken (C). Die Skalierungsbalken entsprechen einer Länge von 1 μm .

Die Aufnahme der Bakterien erfolgte bereits nach 15 min Infektionsdauer und lag bei 4,68 Bakterien pro DC für den Pneumolysin-produzierenden Stamm *S. p.* WT. Die Aufnahme der Mutante *S. p. Δply* war im Vergleich dazu mit 3,96 Bakterien pro DC leicht erniedrigt, was als nicht signifikant eingestuft wurde. Nach 30 min Infektionsdauer erhöhte sich die Aufnahmerate um ca. 2 Bakterien pro Zelle unabhängig von der Pneumolysinseznernierung der Bakterien (Abbildung 7 A, Tabelle 4). Nach 45 min stagnierte die Anzahl der internalisierten Bakterien. Dabei wurden in Anwesenheit von Pneumolysin ein Bakterium mehr aufgenommen als in Abwesenheit von Pneumolysin. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Pneumokokkenstämmen waren jedoch nicht signifikant (Tabelle 4).

In Antibiotika-Protektions-Versuchen konnte nach 30 min Infektionsdauer bei J774-Zellen für *S. p. Δply* eine Aufnahmerate von $19,97 \times 10^3$ CFUs in Makrophagen bestimmt werden. Im Vergleich dazu wurden bei *S. p.* WT-Infektionen ca. 3000 Bakterien weniger intrazellulär nachgewiesen (Abbildung 7 B, Tabelle 4). Bei Phagozytoseversuchen von DCs konnte diese Tendenz auch beobachtet werden. Von *S. p.* WT wurden $10,3 \times 10^3$ Bakterien in DCs aufgenommen und von *S. p. Δply* wurden $13,07 \times 10^3$ Bakterien durch DCs internalisiert. Der Unterschied zwischen den getesteten Stämmen ist nach Kalkulation der *p*-Werte mit 0,5 nicht signifikant. Die Kapazität der Aufnahme durch J774-Makrophagen war im Vergleich zu den DCs für beide untersuchten Pneumokokkenstämme um 6000 Bakterien erhöht. Elektronenmikroskopisch konnte die Adhäsion und Internalisierung einzelner Diplokokken von *S. p.* WT und *S. p. Δply* in DCs visualisiert werden (Abbildung 7 C). Zelluläre Membranstrukturen umlegen die Pneumokokken, die mit der Zelle an der Oberfläche interagieren.

| <i>S. pneumoniae</i> | Anzahl intrazellulärer Bakterien in DCs nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung | | | Anzahl intrazellulärer Bakterien in J774 [CFU x 10 ³] | Anzahl intrazellulärer Bakterien in DCs [CFU x 10 ³] |
|----------------------|--|-------------|-------------|---|--|
| | 15 min | 30 min | 45 min | | |
| <i>S. p.</i> WT | 4,68 ± 0,31 | 6,53 ± 2,40 | 6,84 ± 2,54 | 16,74 ± 3,64 | 10,30 ± 0,66 |
| <i>S. p. Δply</i> | 3,96 ± 0,16 | 5,99 ± 1,2 | 5,94 ± 1,93 | 19,97 ± 3,54 | 13,07 ± 1,55 |
| <i>p</i> -Werte | 0,49 | 0,55 | 0,43 | 0,83 | 0,5 |

Tabelle 4: Quantifizierung der Internalisierung von Pneumokokken in Abhängigkeit von Pneumolysin. DCs und J774-Zellen wurden mit *S. p.* WT und *S. p. Δply* infiziert. Die Aufnahmerate der Bakterien wurde mit Doppelimmunfluoreszenzfärbung in Zeitabhängigkeit bzw. mit Antibiotika-Protektions-Methode nach 30 min Infektionsdauer ermittelt.

Die Resultate der Phagozytoseversuche von Pneumokokken mit DCs und J774-Makrophagen zeigten keinen signifikanten Einfluss von Pneumolysin auf die Interaktion bzw. Aufnahme von Pneumokokken durch APCs unter den gegebenen Bedingungen. Als Modellstamm wurde für die weiterführenden Untersuchungen der Pneumolysin-defiziente Stamm *S. p. Δply*, um den Einfluss anderer Virulenzfaktoren der Pneumokokken fokussieren und den zusätzlichen zelllytischen Effekt des Pneumolysins ausschließen zu können.

4.4 Die Rolle von PavA bei der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und APCs

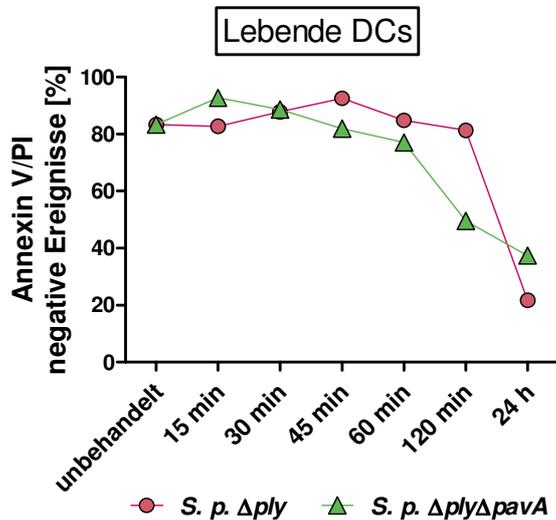
Der Virulenzfaktor PavA, das pneumococcal adhesion and virulence protein A, von *S. pneumoniae* wird als hoch konserviertes Oberflächenprotein beschrieben, welches weder ein Signalpeptid noch ein LPXTG-Motiv für die Verankerung in der Zellwand aufweist. PavA kann Fibronectin binden und ist für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtes *in vivo* verantwortlich (siehe 3.3.3). Die eigentliche Funktion dieses Proteins bezüglich der Pathogenität von Pneumokokken wurde bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die Rolle von PavA bei der immunologischen Erkennung von Pneumokokken durch APCs ist noch unbekannt. Zur Aufklärung der Funktionalität von PavA werden folgende Versuche beschrieben, die den Einfluss von PavA auf die Interaktion von Pneumokokken und APCs detailliert untersuchen.

4.4.1 Apoptoseinduktion in DCs durch PavA-produzierende Pneumokokken

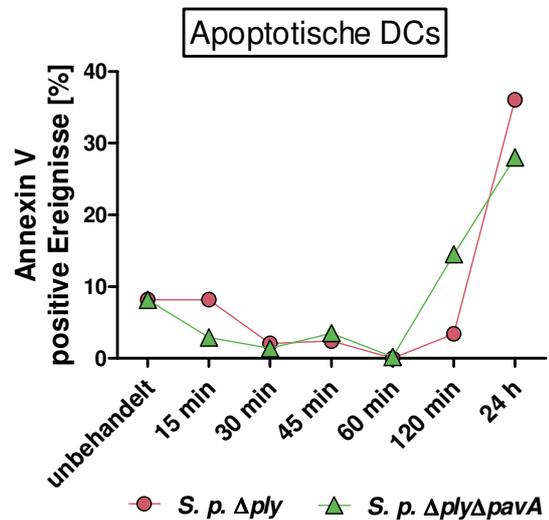
Der Virulenzfaktor PavA ist im Meningitis- und im murinen Sepsis-Modell für die erfolgreiche Kolonisierung des Organismus wichtig. Trotz der enormen Wirkung auf die Kolonisierung von Pneumokokken ist die Rolle, die PavA innerhalb der Pneumokokken Pathogenität einnimmt, nicht vollständig geklärt. Durch die bakterielle Induktion der Apoptose bei immunologischen Zellen werden APCs strategisch ausgeschaltet, um Entzündungsherde bzw. die bakterielle Eliminierung durch das Immunsystem zu unterbinden. Gleichzeitig können apoptotische Zellen durch Makrophagen erkannt werden, was wiederum zu einer erhöhten Immunantwort führt. Im Folgenden wurde der zelllytische Einfluss von PavA-produzierenden *S. p. Δply* und PavA-defizienten *S. p. ΔplyΔpavA* auf DCs bezogen auf die bakteriellen Apoptose- bzw. Nekroseinduktion zytometrisch untersucht. In den Versuchen wurden Pneumolysin-defiziente Stämme verwendet, um den zelllytischen Pneumolysineffekt auszuschließen. Die infizierten Zellen wurden mit

Annexin V-FITC und PI gefärbt. Den prozentualen Anteil der positiven und negativen Ereignisse der einzelnen Farbbereiche wurden zytometrisch gemessen und ausgewertet.

A



B



C

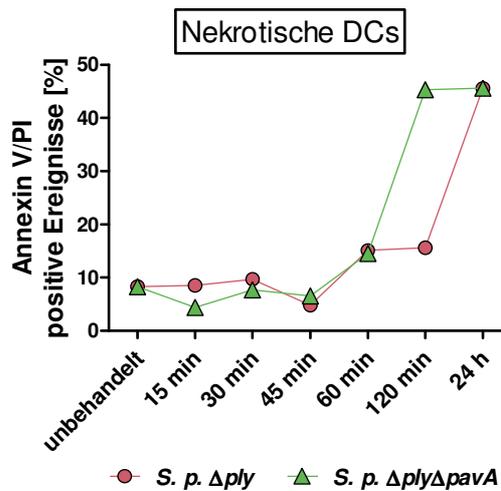


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Detektion von lebenden, apoptotischen und nekrotischen DCs in Abhängigkeit von PavA. DCs wurden mit *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* stimuliert und mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Als Kontrolle wurden unbehandelte DCs gemessen. Im Durchflusszytometer erschienen lebende Zellen negativ (A) und nekrotische Zellen positiv (C). Apoptotische Zellen (B) wurden als Annexin V positive PI negative Ereignisse nachgewiesen. Für die Auswertung wurden jeweils 10000 Ereignisse gemessen.

Der Anteil an Annexin V/PI negativen Ereignissen reduzierte sich nach der Stimulierung mit *S. p. ΔplyΔpavA* ab 30 min Infektionsdauer sukzessiv von 88,6% auf 49,5% nach 120 min, und nach 24 h auf 37,4% (Abbildung 8 A, Tabelle 5). Der PavA-produzierende Stamm *S. p. Δply* wies zwischen 120 min und 24 h eine Reduktion der lebenden Zellen von

ca. 60%, d.h. von 81,3% auf 21,7%, auf (Abbildung 8 A, Tabelle 5). Die apoptotische Induktion begann bei der *pavA*-Mutante nach 120 min. Dabei stieg die Anzahl Annexin V-positiver Ereignisse von 2,9% nach 15 min auf 14,5% nach 120 min und nach 24 h sogar auf 28% (Abbildung 8 B, Tabelle 5). Beim Vergleichstamm *S. p. Δply* wurde die Apoptose zwischen 120 min und 24 h induziert und stieg von 3,4% auf 36,1% (Abbildung 8 B, Tabelle 5). Bei der Messung der Nekrose konnte eine Erhöhung des Anteils bei der *pavA*-Mutante von 6,5% nach 45 min auf 14,5% nach 60 min und auf 45,3% nach 120 min beobachtet werden (Abbildung 8 C, Tabelle 5). Der Anteil nekrotischer Zellen blieb mit 45,6% nach 24 h unverändert. Der Kontrollstamm *S. p. Δply* zeigte eine vergleichsweise verzögerte Nekroseinduktion nach 120 min mit 15,6% und nach 24 h von 45,6% (Abbildung 8 C, Tabelle 5).

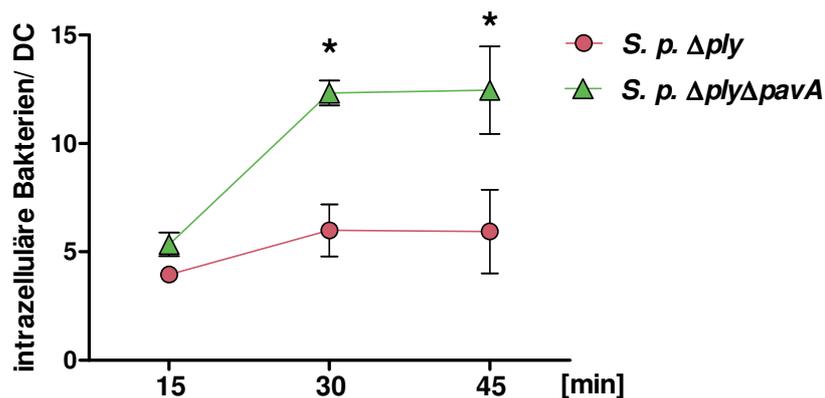
| Infektion | Negative Ereignisse [%] | | Annexin V positive Ereignisse [%] | | positive Ereignisse [%] | |
|-------------|-------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | <i>Δply</i> | <i>ΔplyΔpavA</i> | <i>Δply</i> | <i>ΔplyΔpavA</i> | <i>Δply</i> | <i>ΔplyΔpavA</i> |
| unbehandelt | 83,3 | 83,3 | 8,2 | 8,2 | 8,3 | 8,3 |
| 15 min | 82,7 | 92,7 | 8,2 | 2,9 | 8,5 | 4,4 |
| 30 min | 87,8 | 88,6 | 2,1 | 1,4 | 9,7 | 7,7 |
| 45 min | 92,5 | 81,9 | 2,4 | 3,5 | 4,8 | 6,5 |
| 60 min | 84,8 | 77,0 | 0,0 | 0,2 | 15,1 | 14,5 |
| 120 min | 81,3 | 49,5 | 3,4 | 14,5 | 15,6 | 45,3 |
| 24 h | 21,7 | 37,4 | 36,1 | 28,0 | 45,6 | 45,6 |

Tabelle 5: Quantifizierung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen DCs nach Pneumokokkenstimulierung in Abhängigkeit des bakteriellen PavA-Proteins. DCs wurden mit *S. pneumoniae* infiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an positiven bzw. negativen Zellen von jeweils 10000 gemessenen Ereignissen.

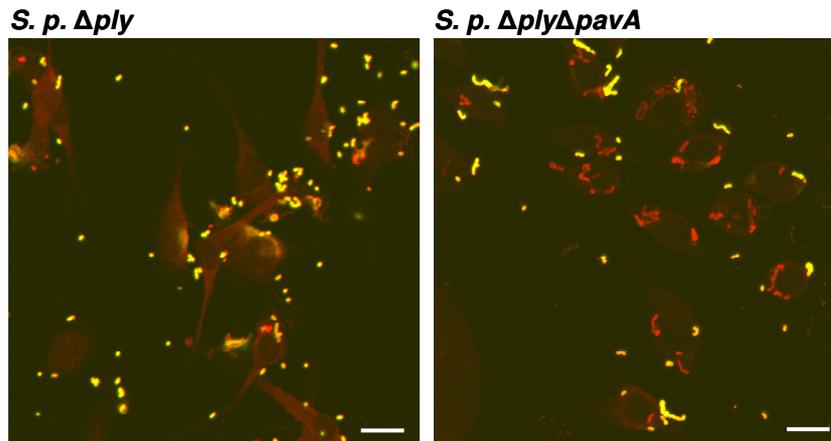
Die Ergebnisse zeigten, dass die Induktion von Apoptose und Nekrose bei DCs unter den gegebenen Versuchsbedingungen bei Abwesenheit von PavA früher (zwischen 60 min und 120 min Infektion) erfolgte als bei Anwesenheit von PavA (hier zwischen 120 min und 24 h). Die Maximal-Werte von apoptotischen Zellen waren nach 24 h Infektionsdauer signifikant höher, wenn Pneumokokken PavA produzierten, während die Anzahl an nekrotischen Zellen 24 h nach der Infektion gleich blieb. Die Expression von PavA führte somit zu einer verspäteten Induktion der zellulären Apoptose.

4.4.2 Einfluss von PavA auf die Internalisierung von *S. pneumoniae* in APCs

Da Pneumolysin keinen Einfluss auf die Interaktion von Bakterien und Immunzellen hatte (Abbildung 7), wurde zur Aufklärung der Bedeutung von PavA die Pneumolysindefiziente Mutante als Modellstamm verwendet. DCs und J774 Zellen wurden mit *S. p. Δply* und der PavA-Deletionsmutante *S. p. ΔplyΔpavA* mit einer MOI von 50 infiziert (Abbildung 9). Nach der Stimulierung der DCs mit *S. pneumoniae* über 15, 30 und 45 min Infektionsdauer wurden extra- und intrazelluläre Pneumokokken mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung mikroskopisch quantifiziert (Abbildung 9 A, B). Die Internalisierung der Bakterien durch DCs erfolgte bereits nach 15 min Infektionsdauer. Der PavA-produzierenden Stamm *S. p. Δply* wurden 3,96 Bakterien pro Zelle internalisiert. Die Aufnahme von *S. p. ΔplyΔpavA* war im Vergleich dazu um 1,4 Bakterien pro DC erhöht (Abbildung 8 A, Tabelle 6). Nach 30 min Infektionsdauer mit *S. p. Δply* stieg die Aufnahmerate in DCs um ca. 2 Bakterien. Bei Abwesenheit von PavA erhöhte sich die Aufnahme nach 30 min Infektion um ca. 7 Bakterien pro Zelle. Diese Werte stagnierten mit andauernder Infektionszeit bis 45 min. Der Unterschied zwischen den einzelnen Pneumokokkenstämmen war nach statistischer Auswertung bei 30 und 45 min signifikant (Tabelle 6).

A

B



C

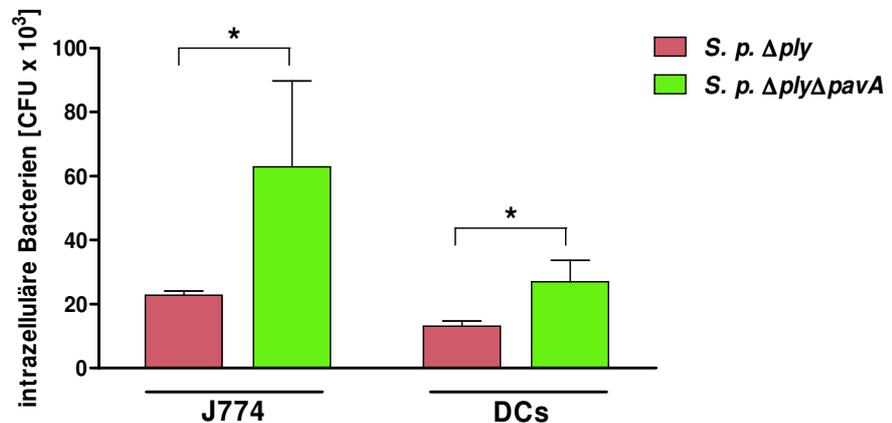


Abbildung 9: Einfluss von PavA auf die Interaktion von *S. pneumoniae* APCs. DCs wurden mit *S. p. Δply* und der isogenen *pavA*-Mutante *S. p. ΔplyΔpavA* infiziert. Die Bestimmung intrazellulärer Bakterien in DCs erfolgte mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung (A, B). Die Immunfluoreszenzen zeigen in einer 30 minütigen Infektion von DCs adhärenente Bakterien in gelb und intrazelluläre in rot (B). Integrierte Skalierungsbalken entsprechen einer realen Länge von 10 μm. In Antibiotika-Protektions-Methoden wurden nach 30 min Infektionsdauer von J774-Zellen und DCs die CFUs pro 1 x 10⁵ Zellen quantifiziert (C). **p* < 0,03

In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte der signifikante Unterschied zwischen dem *S. p. Δply* und der *pavA*-Mutante getesteten Pneumokokkenstämmen nach 30 min DC-Infektion beobachtet werden (Abbildung 9 B). Die mit *S. p. ΔplyΔpavA*-infizierten DCs zeigten eine höhere Anzahl an intrazellulären Bakterien (rot-fluoreszierend) im Vergleich zur *S. p. Δply*-Infektion.

| <i>S. p.</i> Stämme | Anzahl intrazellulärer Bakterien in DCs nach Doppelimmunfluoreszenzfärbung | | | Anzahl intrazellulärer Bakterien in J774 [CFU x 10 ³] | Anzahl intrazellulärer Bakterien in DCs [CFU x 10 ³] |
|------------------------|--|-------------|-------------|---|--|
| | 15 min | 30 min | 45 min | | |
| <i>S. p. Δply</i> | 3,96 ± 0,16 | 5,99 ± 1,2 | 5,94 ± 1,93 | 22,73 ± 1,33 | 13,07 ± 1,55 |
| <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> | 5,35 ± 0,54 | 12,3 ± 0,58 | 12,5 ± 2,02 | 62,8 ± 19,97 | 26,95 ± 6,66 |
| <i>p</i> -Werte | 0,05 | 0,005 | 0,02 | 0,03 | 0,01 |

Tabelle 6: Quantifizierung der Internalisierung von Pneumokokken in Abhängigkeit von PavA. Die Anzahl internalisierter *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* in DCs wurde mittels DIF pro Zelle angegeben. In Antibiotika-Protektions-Versuchen wurden die CFUs pro 1 x 10⁵ Zellen nach 30 min Infektionsdauer ermittelt.

Die Bestimmung der Anzahl intrazellulärer Pneumokokken in J774-Zellen und DCs erfolgte nach 30 min Infektion und der antibiotischen Behandlung von extrazellulären Bakterien (Abbildung 9 C). Auf Blutagarplatten wurden die CFUs pro 1 x 10⁵ Zellen ausgezählt.

In Antibiotika-Protektions-Versuchen von 30 min Infektionsdauer zeigte der Mutantenstamm *S. p. ΔplyΔpavA* sowohl in J774-Zellen eine signifikant gesteigerte Aufnahmerate im Vergleich zu *S. p. Δply* (Abbildung 9 C, Tabelle 6). Im Vergleich zur Internalisierung durch J774-Zellen war die Kapazität der Aufnahme bei DCs war in beiden Fällen der getesteten Pneumokokkenstämme erniedrigt.

Bei der Expression von PavA der Pneumokokken konnte eine schwache Anheftung bzw. Internalisierung sowohl durch J774-Zellen als auch durch DCs nachgewiesen werden. Die Produktion von PavA durch Pneumokokken führte somit unter den gegebenen methodischen Bedingungen zu einer erniedrigten Phagozytose durch DCs bzw. Makrophagen. Die Aufnahmerate von Pneumokokken durch J774-Zellen war im Vergleich zur Internalisierung durch DCs erhöht.

4.5 Beteiligung des zellulären Zytoskeletts an der Internalisierung von Pneumokokken in APCs

Die Existenz intrazellulärer Bakterien in Wirtszellen liegt einem bestimmten zellulären Aufnahme- bzw. einem bakteriellen Invasionsmechanismus zugrunde. Bei der bakteriellen Invasion in eukaryotische Zellen, wie Epithel- bzw. Endothelzellen, werden zelluläre Mechanismen verwendet, um ein unerkanntes und effizientes Vordringen des Bakteriums innerhalb des Wirtsorganismus zu bewirken. Endozytose, Phagozytose und Pinozytose

stellen zelluläre Aufnahmemechanismen dar. Die kontrollierte Umgestaltung des zellulären Zytoskeletts ist für die Ausführung dieser Mechanismen essentiell. Dabei spielen Aktinfilamente eine wichtige Rolle. Aktinfilamente sind die Hauptbestandteile des Zytoskeletts und bilden das stützende Gerüst der Zelle. Außerdem sind sie durch gezielte Polymerisierung und Depolymerisierung stark modellierbar, verleihen der Zelle eine definierte Form und Mobilität. Durch das Zellgift Cytochalasin D kann die Polymerisierung der Aktinfilamente inhibiert werden. Neben den Aktinfilamenten stellen Mikrotubuli eine weitere wichtige Struktursubstanz von eukaryotischen Zelle dar. Sie stabilisieren die Zelle und sind für intrazellulären Transport verantwortlich. Durch das Zelltoxin Nocodazol können Mikrotubuli inaktiviert werden.

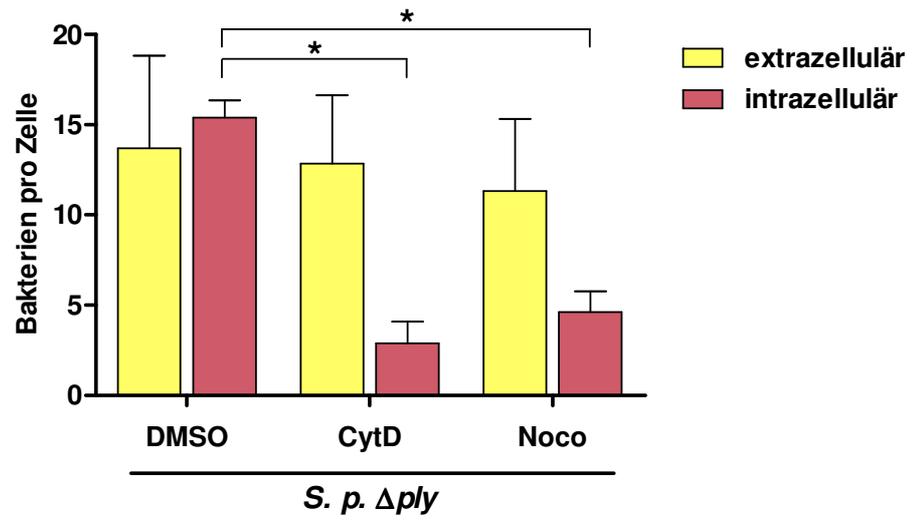
4.5.1 Einfluss des Zytoskeletts von Makrophagen auf die Interaktion mit *S. pneumoniae*

Die Beteiligung von Aktinfilamenten und Mikrotubuli am Aufnahmeprozess von Pneumokokken in J774-Makrophagen wurde mittels *in vitro* Infektionsversuchen detailliert untersucht. J774-Zellen wurden mit Zytoskelettinhibitoren Cytochalasin D (CytD) bzw. Nocodazol (Noco) präinkubiert. Die verwendeten Toxine lagen gelöst in DMSO vor, was bei RT in hohen Konzentrationen eine zytotoxische Wirkung verursacht. Die vorbehandelten Zellen wurden mit dem Pneumokokkenstamm *S. p. Δply* für 1 h mit einer MOI von 50 infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen mit äquivalenten Mengen an DMSO vorbehandelt und mit Pneumokokken inkubiert. Nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung der infizierten Zellen wurden mikroskopisch sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Bakterien quantifiziert. Zusätzlich wurde das Zytoskelett mit Phalloidin-Alexa 488 angefärbt.

Die Anzahl der adhärenenten Bakterien bei DMSO-behandelten Zellen wurde durch die Cytochalasin D-Vorbehandlung der Zellen nicht signifikant beeinträchtigt (Abbildung 10, Tabelle 7). Die Behandlung mit Nocodazol wies eine leichte, aber nicht signifikante Erniedrigung der Adhärenz auf. Nach der Inhibition der Aktinfilamente durch Cytochalasin D wurden im Vergleich zur Kontrolle mit 15,40 Bakterien pro Zelle 2,89 Bakterien von den Makrophagen aufgenommen. Bei der Inaktivierung der Mikrotubuli durch Nocodazol lagen 4,62 Bakterien pro Zelle intrazellulär vor (Abbildung 10 A, Tabelle 7). In der Fluoreszenzmikroskopie konnten sowohl adhärenente als auch intrazelluläre Bakterien bei der Infektion mit *S. p. Δply* nachgewiesen werden (Abbildung

10 B). Bei der Cytochalasin D-Behandlung waren nur noch adhärenente Bakterien aber keine phagozytierten Bakterien zu erkennen. Dagegen konnte bei der Noco-Behandlung auch einige intrazelluläre Pneumokokken nachgewiesen werden. Diese lagen in geringerer Menge als bei der unbehandelten Kontroll-Infektion vor.

A



B

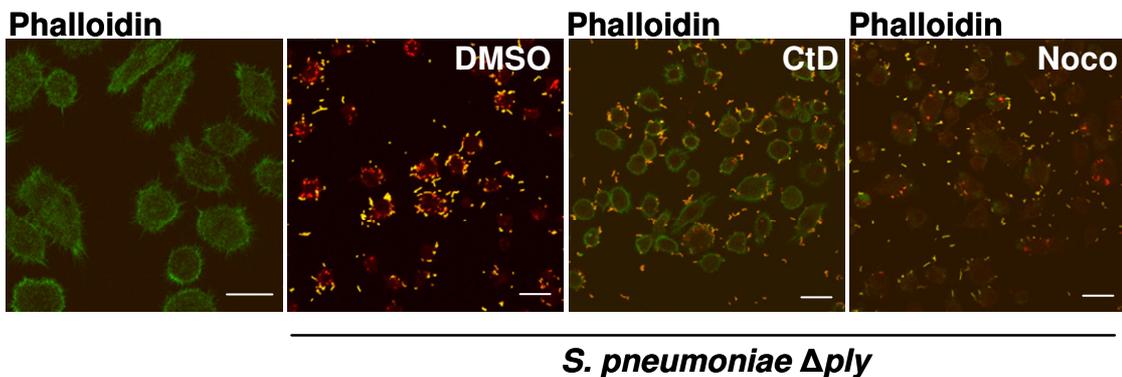


Abbildung 10: Einfluss des Zytoskeletts auf die Aufnahme von Pneumokokken durch J774-Zellen. Makrophagen wurden mit 250 nM CytD (30 min) und 10 μ M Noco (1 h) behandelt und mit *S. p. Δply* für 30 min infiziert. Die Anzahl extra- bzw. intrazellulärer Pneumokokken wurden nach einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung mittels Fluoreszenzmikroskopie bestimmt (A). Repräsentative Ausschnitte zeigen adhärenente Bakterien gelb und intrazelluläre Bakterien rot (B). Zytoskelettstrukturen wurden mit Phalloidin Alexa 488 (grün) angefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit äquivalenten Mengen an DMSO vorbehandelt und mit Pneumokokken infiziert. * $p < 0,001$

Die Zelltoxin-behandelten Zellen zeigten sowohl für Cytochalasin D und Nocodazol eine signifikante Reduktion der Aufnahme von Pneumokokken. Die Behandlungen beeinflussten die Adhärenz von Pneumokokken an die Zellen nicht. Den stärkeren Effekt der Aufnahmereduktion wurde durch die Inkubation mit Cytochalasin D erzielt.

| J774-Zellen | <i>S. p. Δply</i> | | <i>p</i> -Werte (gegen DMSO Kontrolle) | |
|-------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|------------------------|
| | extrazelluläre Bakterien pro Zelle | intrazellulärer Bakterien pro Zelle | extrazellulär | intrazellulär |
| DMSO | 13,69 ± 5,1 | 15,40 ± 0,93 | - | - |
| CytD | 12,85 ± 3,77 | 2,89 ± 1,2 | 0,6 | 4,7 x 10 ⁻⁵ |
| Noco | 11,32 ± 4 | 4,62 ± 1,15 | 0,24 | 1,3 x 10 ⁻³ |

Tabelle 7: Quantifizierung von J774-assoziierten *S. p. Δply* in Abhängigkeit von der Zytoskelettaktivität. Nach Doppelimmunfluoreszenzfärbungen wurde die Anzahl adhärenter und intrazellulärer Pneumokokken im Fluoreszenzmikroskop bestimmt.

4.5.2 Einfluss des Zytoskeletts von DCs auf die Internalisierung von Pneumokokken

Bisher wurde gezeigt, dass sowohl die Aktinfilamente als auch die Mikrotubuli der Makrophagen an der Internalisierung von Pneumokokken durch J774-Zellen beteiligt sind. Die Adhärenz der Bakterien wird dadurch aber nicht beeinträchtigt (siehe 4.5.1). Demzufolge wurde die Beteiligung des Zytoskeletts der DCs an der Aufnahme von Pneumokokken durch DCs untersucht. DCs wurden mit den Zytoskelettinhibitoren Cytochalasin D oder Nocodazol präinkubiert. Die behandelten DCs wurden mit den Stämmen *S. p.* WT, *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* mit einer MOI von 50 für 1 h infiziert. Als Kontrolle wurden DMSO-behandelte Zellen eingesetzt. Die Quantifizierung intrazellulärer und überlebender Bakterien erfolgte nach Behandlung der infizierten Zellen mit Antibiotika (Abbildung 11 A).

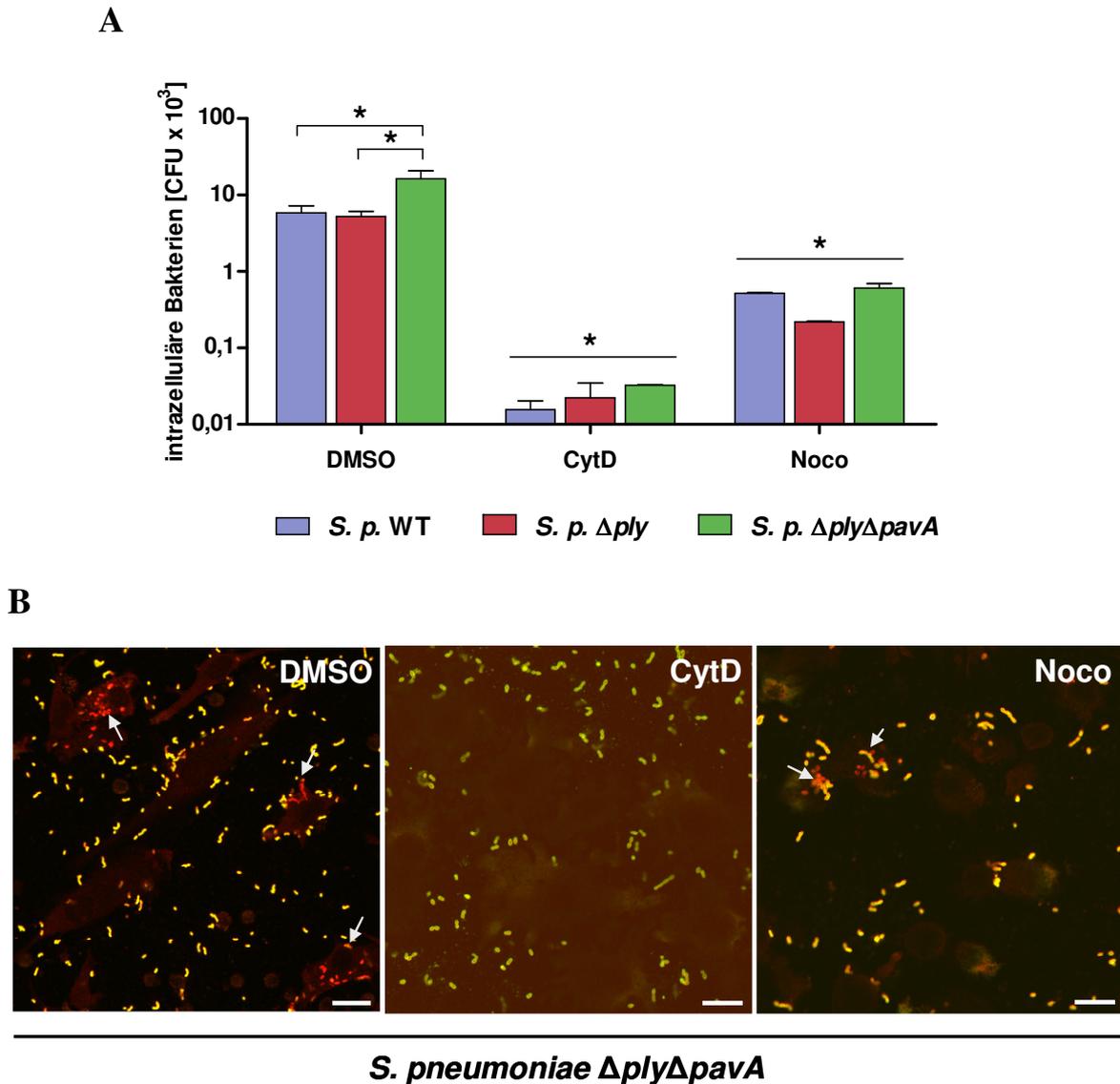


Abbildung 11: Einfluss des Zytoskeletts von DCs auf die Internalisierung von Pneumokokken. DCs wurden mit DMSO, Cytochalasin D (CytD) oder Nocodazol (Noco) vorbehandelt und mit dargestellten Pneumokokkenstämmen infiziert. Nach einer Infektionsdauer von 30 min wurden extrazelluläre Bakterien durch antibiotische Behandlung abgetötet und die intrazellulären CFUs pro 1×10^5 DCs bestimmt (A). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen DC-Infektionen mit *S. p.* $\Delta ply\Delta pavA$ für 1 h. Extrazelluläre Bakterien erscheinen gelb und intrazelluläre Pneumokokken rot (B, Pfeile). Die Skalierungsbalken entsprechen einer Länge von $10 \mu\text{m}$ * $p < 0,02$

Wie in 4.4.2 bereits beschrieben, wurde der Stamm *S. p.* $\Delta ply\Delta pavA$ mit $16,31 \times 10^3$ CFUs dreimal stärker in DCs aufgenommen als *S. p.* WT mit $5,88 \times 10^3$ CFUs und *S. p.* Δply mit $5,22 \times 10^3$ CFUs (Abbildung 11 A, Tabelle 8). Bei der Inkubation mit Cytochalasin D verringerte sich die Internalisierung vom Wildtyp und von der *ply*-Mutante auf 20 CFUs und von der *pavA*-Mutante auf 30 CFUs. Die Inhibition der Mikrotubuli durch Nocodazol führte zu einer verminderten Aufnahme des Wildtypstammes mit 520 CFUs, von *S. p.* Δply

mit 220 CFUs und von *S. p.* $\Delta ply\Delta pavA$ mit 610 CFUs. Die Unterschiede zwischen DMSO-Kontrolle und der Toxinbehandlungen der Zellen waren bezogen auf die Internalisierung der Pneumokokken signifikant. In der Fluoreszenzmikroskopie von DMSO-behandelten und mit *S. p.* $\Delta ply\Delta pavA$ infizierten DCs konnten mehrere intrazelluläre Bakterien pro Zelle detektiert werden (Abbildung 11 B, markiert durch Pfeile). Cytochalasin D-präinkubierte Zellen wiesen nur adhärenente Pneumokokken auf. Dagegen erschienen bei Nocodazol-behandelten DCs vereinzelt intrazelluläre Bakterien.

| <i>S. p.</i> | Anzahl intrazellulärer Bakterien [CFU x 10 ³] | | | <i>p</i> -Werte (CytD gegen DMSO) | <i>p</i> -Werte (Noco gegen DMSO) | <i>p</i> -Werte (gegen $\Delta ply\Delta pavA$) |
|-------------------------------|--|--------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | DMSO | CytD | Noco | | | |
| WT | 5,88 ± 1,35 | 0,02 ± 0,005 | 0,52 ± 0,011 | 2,8 x 10 ⁻⁵ | 1,7 x 10 ⁻³ | 8,2 x 10 ⁻⁴ |
| Δply | 5,22 ± 0,93 | 0,02 ± 0,013 | 0,22 ± 0,003 | 8,5 x 10 ⁻⁵ | 5,5 x 10 ⁻³ | 1,3 x 10 ⁻² |
| Δply $\Delta pavA$ | 16,31 ± 4,46 | 0,03 ± 0,001 | 0,61 ± 0,091 | 3,2 x 10 ⁻³ | 1,8 x 10 ⁻² | - |

Tabelle 8: Internalisierte Pneumokokken nach Inhibition von Komponenten des Zytoskeletts bei DCs. Nach antibiotischer Behandlung der Zellen erfolgte die Quantifizierung von intrazellulären Bakterien durch die Bestimmung der CFUs von 10⁵ DCs. DMSO-behandelte Zellen wurden als Kontrollen verwendet.

Sowohl die Inhibition der Aktinfilamente als auch der Mikrotubuli führten zu einer signifikant reduzierten Aufnahme der Pneumokokken durch DCs unabhängig von der Produktion der Virulenzfaktoren Pneumolysin und PavA. Die gehemmte Internalisierung war im Fall nach der Cytochalasin D-Behandlung ca. um das 10- bis 20-fache stärker als bei der Nocodazol-Behandlung der Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits in 4.5.1 gehemmte Phagozytose von Pneumokokken nach der Toxinbehandlung von J774-Zellen.

4.6 Prozessierung von Pneumokokken durch Makrophagen und DCs

Pneumokokken werden nach der Anheftung durch J774-Zellen und DCs internalisiert. Die bakterielle Kapsel (siehe 4.2.2) und PavA-Produktion (siehe 4.4.2) führt zu einer eingeschränkten zellulären Erkennung durch Makrophagen und DCs. Physiologisch erfolgt nach der Phagozytose von Fremdmaterial in APCs die intrazelluläre Prozessierung von bakteriellen Antigenen. Die Bakterien werden in der Zelle proteolytisch in Endosomen zersetzt und abgebaut. Die Antigene werden über bestimmte Rezeptoren an der Oberfläche

der Zellen dem adaptiven Immunsystem präsentiert. In manchen Fällen kann die intrazelluläre Prozessierung und die immunogene Antigenpräsentation an der Zelloberfläche durch bakterielle Überlebensstrategien unterdrückt werden (siehe 3.2.2). Bekannt ist diese Fähigkeit bereits für *Mycobacterium tuberculosis* und *Leishmania amastigote*. Im Folgenden sollte das intrazelluläre Schicksal von Pneumokokken in J774-Zellen und DCs untersucht werden.

4.6.1 Überleben intrazellulärer *S. pneumoniae* in Makrophagen

Zur Aufklärung möglicher Überlebensstrategien von Pneumokokken in APCs, wurden J774-Makrophagenzellen für 30 min mit dem Pneumokokkenstamm *S. p. Δply* infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden mit Gentamicin und Penicillin G abgetötet. Die Lebendanzahl internalisierter Bakterien wurde durch die Bestimmung der CFUs auf Blutagarplatten quantifiziert. Um das intrazelluläre Überleben der Bakterien zu erfassen, wurden die infizierten Zellen ohne Antibiotika für weitere 1, 2, 3, 4 und 5 h inkubiert. Die Dauer der Stimulierung von J774-Zellen durch Pneumokokken addiert sich somit auf 1,5, 2,5, 3,5, 4,5, 5,5 und 6,5 h. Als Kontrolle wurde die Anzahl phagozytierter Bakterien direkt nach antibiotischer Behandlung bestimmt. Dies entsprach einer Stimulierungszeit von 1,5 h entspricht.

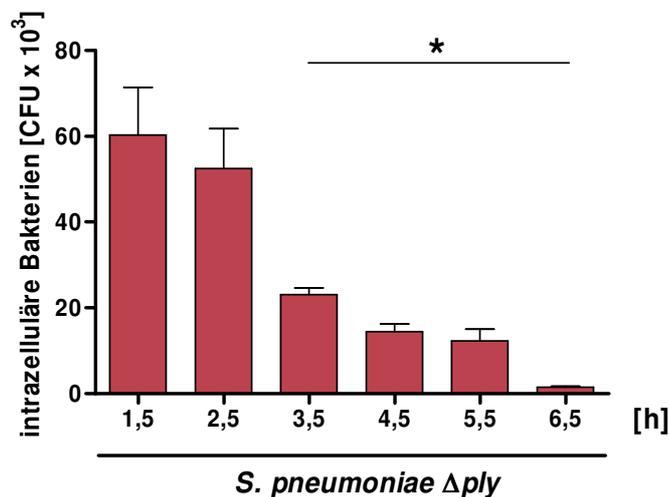


Abbildung 12: Intrazelluläres Überleben von Pneumokokken in J774-Zellen. J774-Makrophagen wurden mit *S. p. Δply* infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden abgetötet und die Lebendanzahl an intrazellulären Bakterien über die Bestimmung der CFUs ermittelt. Dargestellt ist die Dauer der Stimulierung durch Pneumokokken ermittelt aus der Infektionsdauer von 30 min, der Antibiotikabehandlung für 1 h und der verlängerten Inkubationsdauer von 1, 2, 3, 4 und 5 h. * $p < 0,04$

Die Anzahl der überlebenden intrazellulären Bakterien wurde mit andauernder Inkubation der infizierten Zellen reduziert (Abbildung 12, Tabelle 9). Von 1,5 h bis 2,5 h kam es zu keiner signifikanten Reduktion der überlebenden Bakterien. Nach 3,5 h verringerte sich die Anzahl der CFUs von $52,5 \times 10^3$ auf $23,1 \times 10^3$. Dies entsprach einer Verringerung um 66%. Nach 4,5 h und 5,5 h konnten nur noch $14,4 \times 10^3$ bzw. $12,3 \times 10^3$ CFUs detektiert werden. Nach 6,5 h wurde das Minimum von 1500 CFUs erreicht (Abbildung 12, Tabelle 9). Die Anzahl der isolierten intrazellulären Bakterien minimierte sich innerhalb von 4 h Postinkubation um 80% bzw. innerhalb von 5 h um 97,5%.

| Stimulierung [h] | <i>S. p. Δply</i> [CFU x 10 ³] pro 1x 10 ⁵ J774-Zellen | p – Werte (1,5 h zu x h) |
|------------------|---|--------------------------|
| 1,5 | 60,3 ± 15,7 | - |
| 2,5 | 52,5 ± 13,15 | 0,32 |
| 3,5 | 23,1 ± 2,12 | 0,04 |
| 4,5 | 14,4 ± 2,55 | 0,028 |
| 5,5 | 12,3 ± 3,82 | 0,026 |
| 6,5 | 1,5 ± 0,42 | 0,017 |

Tabelle 9: Quantifizierung der lebenden intrazellulären Pneumokokken in J774-Zellen. Die Zeit der Stimulierung ergibt sich aus der Infektionszeit von 30 min, der Antibiotikabehandlung von 1 h und einer weiteren Inkubationsdauer der Zellen von 0 (entspricht 1,5 h) bis 5 h (entspricht 6,5 h).

4.6.2 Einfluss von PavA auf die Überlebensrate intrazellulärer Pneumokokken in DCs

Zur Aufklärung des intrazellulären Verhaltens von Pneumokokken in DCs wurden die Zellen für 30 min mit *S. p. Δply* oder *S. p. ΔplyΔpavA* infiziert. Der Einfluss des Virulenzfaktors PavA wurde dabei berücksichtigt. Extrazelluläre Bakterien wurden mit Gentamicin und Penicillin G abgetötet. Nach weiteren 1, 2, und 3 h wurde die Anzahl intrazellulärer Bakterien ermittelt. Dargestellt wurden die CFUs pro 1×10^5 DCs nach der der Stimulierung von 1,5, 2,5, 3,5 und 4,5 h.

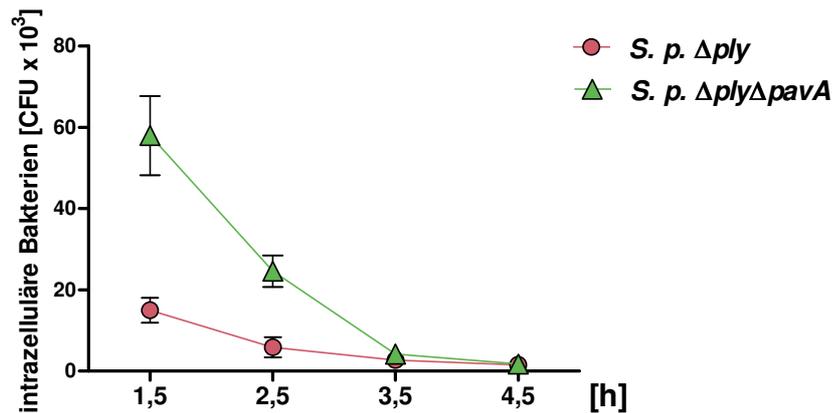


Abbildung 13: Anzahl überlebender intrazellulärer Pneumokokken in DCs in Zeitabhängigkeit. DCs wurden mit den dargestellten Pneumokokkenstämmen infiziert und nach 30 min extrazelluläre Bakterien durch Antibiotikabehandlung eliminiert. Die infizierten Zellen wurden für 1, 2 und 3 h weiter inkubiert. Die Anzahl intrazellulär überlebender Bakterien pro 1×10^5 DCs wurde über die Bestimmung der CFUs auf Blutagarplatten ermittelt und in Abhängigkeit der angegebenen Stimulierung dargestellt.

S. p. Δply und *S. p. ΔplyΔpavA*-Infektionen zeigten in der Kinetik eine Dezimierung der überlebenden intrazellulären Pneumokokken (Abbildung 13, Tabelle 10). Die Produktion von PavA führte mit $15,8 \times 10^3$ CFUs für *S. p. Δply* zu einer signifikant erniedrigten Internalisierung in DCs im Vergleich zu *S. p. ΔplyΔpavA* nach 1,5 h Infektion (siehe 4.4). Nach einer weiteren Stunde (Zeitpunkt 2,5 h) konnten bei *S. p. ΔplyΔpavA* $24,6 \times 10^3$ CFUs und bei *S. p. Δply* $5,04 \times 10^3$ CFUs nachgewiesen werden. Somit wurde in Anwesenheit von PavA eine Erniedrigung von 66% und bei Abwesenheit von PavA eine Reduktion von 57% erreicht. Nach 3,5 h konnten für *S. p. ΔplyΔpavA* $4,25 \times 10^3$ und für *S. p. Δply* $2,74 \times 10^3$ CFUs bestimmt werden. Innerhalb von 3 h Postinkubation reduzierte sich bei *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* die intrazelluläre Anzahl lebender Bakterien auf 1590 bzw. 1750 CFUs. Die Dezimierung von *S. p. ΔplyΔpavA* konnte nach 4,5 h somit auf 96,7% und bei *S. p. Δply* auf 88% berechnet werden.

| Stim. [h] | <i>S. p. Δply</i> [CFU x 10 ³] | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> [CFU x 10 ³] | <i>p</i> – Werte |
|-----------|--|---|-----------------------|
| 1,5 | 15,8 ± 2,33 | 58,0 ± 9,79 | $8,77 \times 10^{-7}$ |
| 2,5 | 5,87 ± 2,4 | 24,6 ± 3,89 | 0,038 |
| 3,5 | 2,74 ± 0,37 | 4,25 ± 1,91 | 0,013 |
| 4,5 | 1,59 ± 0,88 | 1,75 ± 0,07 | 0,015 |

Tabelle 10: Anzahl intrazellulärer Bakterien in DCs. Die angegebene Stimulierung (Stim.) von DCs geht aus der Infektionszeit von 30 min, der Antibiotikabehandlung von 1 h und einer weiteren Inkubationsdauer der Zellen von 0 (entspricht 1,5 h) bis 3 h (entspricht 4,5 h) hervor. Die Werte geben die CFU x 10³ pro 1×10^5 DCs an.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten eine drastische Eliminierung von *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA*. Bei der Mutante *S. p. ΔplyΔpavA* wurde die stärkste Reduktion lebender Pneumokokken erzielt. Die intrazelluläre Überlebensrate von *S. p. Δply* lag bei 12%, bei *S. p. ΔplyΔpavA* nur bei 3,3%. Bei Abwesenheit von PavA wurden intrazelluläre Pneumokokken wirkungsvoller durch DCs prozessiert als bei Anwesenheit von PavA. Im Vergleich zur Prozessierung durch J774-Zellen (siehe 4.6.1) wurden die Pneumokokken durch DCs schneller und effizienter abgetötet.

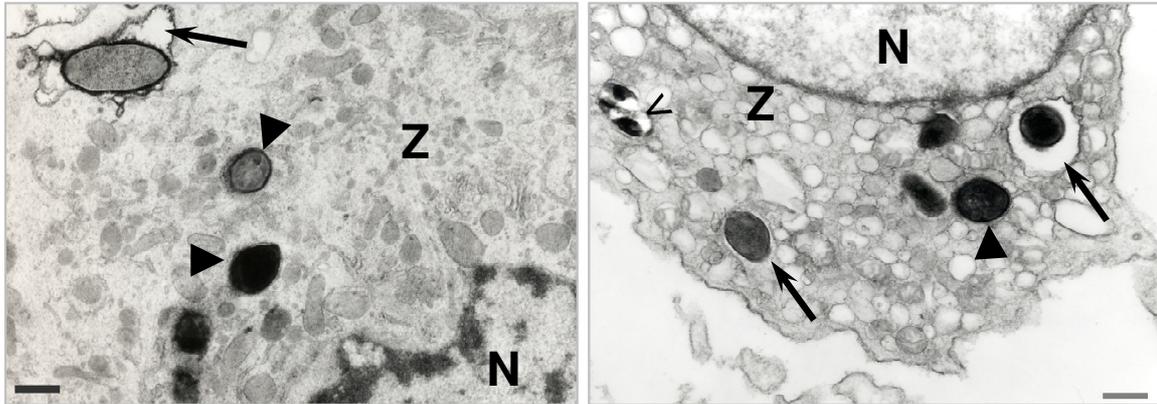
4.6.3 Lokalisierung intrazellulärer Pneumokokken in DCs

Die Prozessierung von internalisierten Bakterien in professionellen Phagozyten erfolgt unter physiologischen Bedingungen durch den Transport in Phagosomen, Phagolysosomen bzw. Endosomen. Durch die Verschmelzung mit Lysosomen werden die Vesikel angesäuert, was neben proteolytischer Aktivitäten zum Zersetzungsprozess der internalisierten Fremdkörper führt. Während der Prozessierung befinden sich die Bakterien in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Zur Aufklärung der intrazellulären Vorgänge während einer Pneumokokkeninfektion wurden infizierte DCs mittels CLSM (konfokale-laser-scanning-Mikroskopie) sowie mittels TEM (Transmissions-Elektronenmikroskopie) unter Berücksichtigung der PavA-Produktion in den Zellkompartimenten lokalisiert. DCs wurden mit *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* für 30 min infiziert. Durch konfokale Lasermikroskopie wurden intrazelluläre Kompartimente mit speziellen Antikörpern detektiert. Dafür wurden infizierte Zellen nach der Fixierung (3% PFA/PBS) mit 0,1% Triton-Lösung behandelt und endosomale Kompartimente durch Antikörperreaktionen mit anti-LAMP-1-Antikörper und anti-Kaninchen-Alexa 488 IgG detektiert. Zell-assoziierte Bakterien wurden rot-fluoreszierend dargestellt.

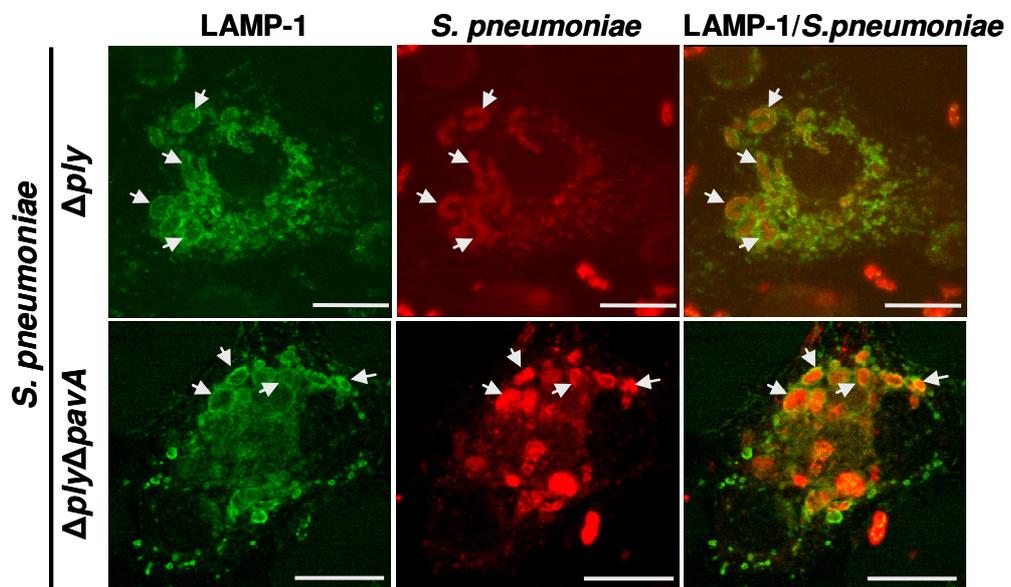
A

S. p. Δply

S. p. ΔplyΔpavA



B



C

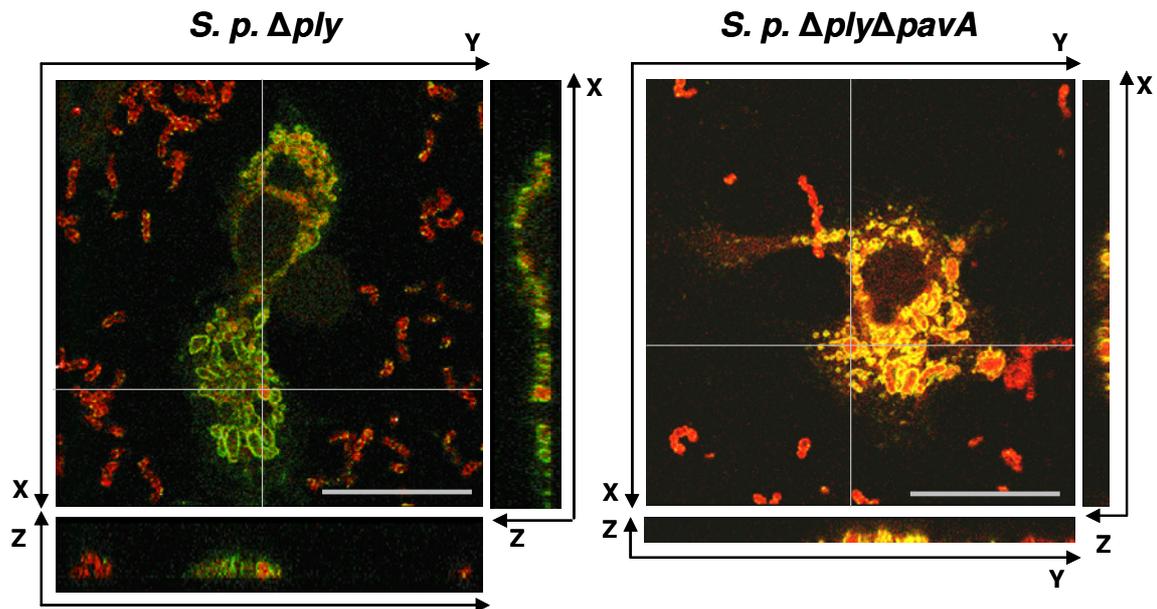


Abbildung 14: Lokalisation von intrazellulären Pneumokokken in DCs. DCs wurden mit *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* für 30 min infiziert und für die entsprechende Mikroskopie fixiert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (A) zeigen Zellschnitte mit Nukleus (N), Zytosol (Z), intrazellulären Pneumokokken (►), Vakuol-bildende Strukturen (→) und Zusammenlagerung mehrerer intrazellulärer Pneumokokken (<). Die dargestellten Skalierungsbalken entsprechen einer Größe von 1 μm . Bei Doppelimmunfluoreszenzfärbungen erscheinen die Endosomen durch LAMP-1-Detektion grün und assoziierte Bakterien rot (B, C). Markiert sind intrazelluläre Bakterien (→). Die Balken stellen hier eine Länge von 10 μm dar.

Die elektronenmikroskopische Analyse der infizierten DCs zeigte intrazellulär lokalisierte Bakterien (Pfeilmarkierungen, Abbildung 14 A). Einige Bakterien wurden von membranbildenden Strukturen umgeben (→) und einige Pneumokokken lagen frei im Zytosol vor (►). Außerdem konnte die Ausbildung leerer Vesikel beobachtet werden. Bei *S. p. ΔplyΔpavA* wurden sogar mehrere Pneumokokken in einem Kompartiment nachgewiesen werden (>). Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten sowohl für *S. p. Δply* als auch für *S. p. ΔplyΔpavA*-Infektionen intrazelluläre Bakterien (Abbildung 14 B, C). LAMP-1 wurde diffus verteilt über die ganze Zelle detektiert. Konzentrierte Anhäufungen von LAMP-1 wurden um intrazelluläre Pneumokokken herum lokalisiert (→). Bei *S. p. ΔplyΔpavA* wurden Bakterienzusammenlagerungen innerhalb eines Vesikels beobachtet, was die Analysen in der Elektronenmikroskopie unterstützte. Bei *S. p. Δply*-infizierten DCs wurden vereinzelte oder als Ketten angeordnete intrazelluläre Pneumokokken in der CLSM nachgewiesen. Diese wurden zum Großteil von LAMP-1

kolokalisiert. Somit konnte intrazelluläre Pneumokokken bereits nach 30 min Infektion in späten Endosomen lokalisiert werden.

4.7 Ausreifung von DCs nach der Infektion mit *S. pneumoniae*

Pneumokokken werden unter Mitwirkung des Zytoskeletts durch DCs phagozytiert. Intrazellulär werden sie in endosomalen Kompartimenten prozessiert. Unter physiologischen Bedingungen werden DCs durch die Phagozytose von Pathogenen oder Antigenen zur Ausreifung angeregt. Dabei verändern sie phänotypische und funktionelle Strukturen. Morphologische Umgestaltungen der Zellen erhöhen die Zellstabilität. Die Expression von kostimulierenden Faktoren und die Produktion antigenpräsentierender Oberflächenmoleküle (MHC-Klasse II) unterstützen die Funktion von DCs das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Der Ausreifungsstatus von DCs kann aufgrund der induzierten Umstrukturierungen der Zelloberfläche durch Antikörperdetektion zytometrisch bestimmt werden. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob Pneumokokken den Ausreifungsprozess von DCs induzieren und fördern können. Die Produktion wichtiger Oberflächenmarker wie CD25, CD83, CD86 und HLA-DR (eine Untereinheit des MHC-Klasse II Komplexes) wurde mit spezifischen Antikörper quantifiziert.

4.7.1 Anregung zur DC-Maturation durch *S. pneumoniae*

Zur Detektion der Maturation der DCs durch Pneumokokken, wurden extrazelluläre *S. p. Δply* nach 30 minütiger Infektion abgetötet. Die infizierten Zellen wurden ohne Antibiotika für weitere 2, 8 oder 18 h zur optimalen Ausreifung stimuliert. Die Oberflächenmarker CD25, CD83, CD86 und HLA-DR wurden mit spezifischen Antikörpern, gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen PE bzw. FITC, detektiert. Die Quantität der exprimierten Ausreifungsmarker wurde nach zytometrischer Messung bestimmt. Die Population der DCs wurde eingegrenzt und der prozentuale Anteil gefärbter Ereignisse berechnet. Diese wurden mit der mittleren Durchschnittsfluoreszenz (MFI) multipliziert, um die ausgehende Gesamtfluoreszenz der Ereignisse zu ermitteln. Die Produktion der Marker bei unstimulierten DCs wurde als Kontrollwert verwendet.

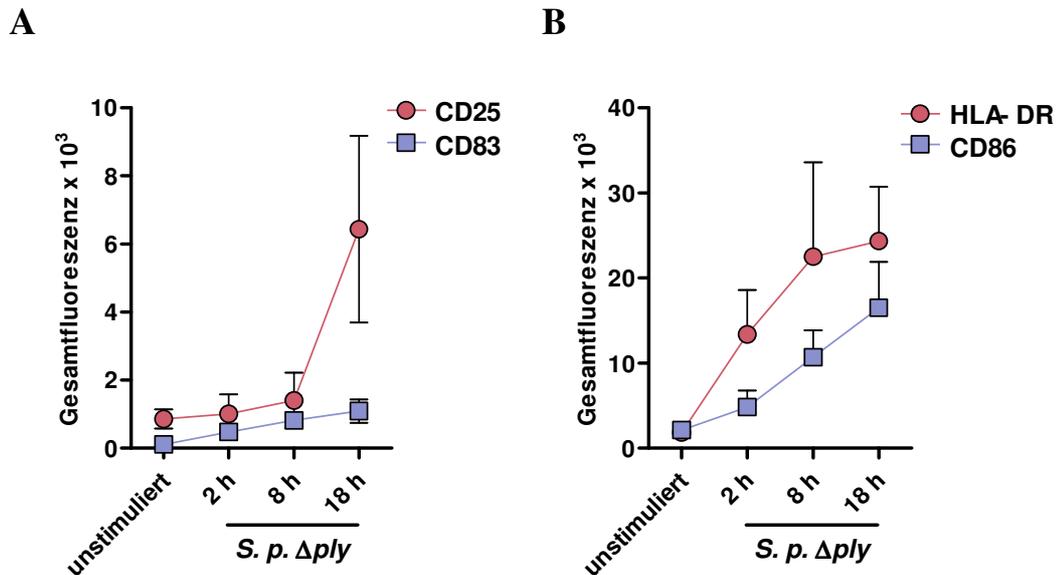


Abbildung 15: Produktion von zellulären Ausreifungsmarkern nach DC-Stimulierung mit *S. p. Δply*. Nach 30 minütiger Infektion von DCs mit *S. p. Δply* für 30 min wurden extrazelluläre Pneumokokken abgetötet. Durch spezifische Antikörper wurde die Produktion von Ausreifungsmarkern wie CD25, CD83, HLA-DR und CD86 auf DCs mittels Zytometrie detektiert. Als Kontrolle wurden die Marker von unstimulierten DCs gemessen. Dargestellt ist die Gesamtfluoreszenz der einzelnen Oberflächenmarker aller positiven Ereignisse berechnet aus dem Produkt MFI x % positiver Ereignisse.

Nach der Stimulierung mit Pneumokokken erhöhte sich die Gesamtfluoreszenz der DCs bei allen untersuchten Ausreifungsmarkern mit andauernder Infektion (Abbildung 15). Die Induktion von HLA-DR erfolgte bereits nach einer 2 h-Stimulierung mit *S. p. Δply* und erreichte nach 18 h den Maximalwert innerhalb der Kinetik (Abbildung 15 B, Tabelle 11). Somit produzierten die DCs nach 18 h Stimulierung durch Pneumokokken die 12-fache Menge an HLA-DR Molekülen als nicht stimulierte DCs. Bei CD25 erfolgte erst nach 18 h eine signifikante Steigerung der Produktion im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Pneumokokkenstimulierung konnte eine 7-fache Menge an CD25-Marker quantifiziert werden (Abbildung 15 A, Tabelle 11). Die Expression von CD86 erhöhte sich stetig auf einen Maximalwert von $16,53 \times 10^3$ Gesamtfluoreszenz nach 18 h (Abbildung 15 B, Tabelle 11). Bei CD83 wurde eine leichte Steigerung von 110 auf 1090 Gesamtfluoreszenz nach 18 h Infektion mit Pneumokokken nachgewiesen (Abbildung 15 A, Tabelle 11).

| Infektion | Gesamtfluoreszenz [MFI x %] x 10 ³ | | | |
|--------------|---|-------------|--------------|--------------|
| | CD25 | CD83 | CD86 | HLA-DR |
| unstimuliert | 0,86 ± 0,28 | 0,11 ± 0,03 | 2,14 ± 0,99 | 1,86 ± 0,39 |
| 2 h | 1,01 ± 0,57 | 0,48 ± 0,21 | 4,86 ± 1,94 | 13,37 ± 5,23 |
| 8 h | 1,40 ± 0,82 | 0,82 ± 0,20 | 10,71 ± 3,19 | 22,53 ± 11,1 |
| 18 h | 6,44 ± 2,74 | 1,09 ± 0,35 | 16,53 ± 5,39 | 24,36 ± 6,35 |

Tabelle 11: Menge an Ausreifungsmarkern bei unstimulierten DCs und bei *S. p. Δply* stimulierten DCs. Die Gesamtfluoreszenz dargestellter Oberflächenmarker auf DCs wurde zytometrisch nach bestimmten Stimulierungszeiten gemessen.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten, dass *ply*-defizienten Pneumokokken DCs zur Ausreifung anregen. Am stärksten wurde bei stimulierten DCs die Expression von HLA-DR und CD86 induziert. Weniger stark exprimierten DCs den Marker CD25. Am schwächsten wurde die Expression von CD83 nachgewiesen. Als optimale Stimulierungsdauer erwies sich 18 h. Diese Dauer wurde in weiterführenden Untersuchungen als Standard eingesetzt.

4.7.2 Rolle von PavA bei der Ausreifung von DCs

Aufgrund der verstärkten Aufnahme (siehe 4.4) und intrazellulären Prozessierung (siehe 4.6.2) des PavA-defizienten Pneumokokkenstammes *S. p. ΔplyΔpavA* in DCs wurde der Einfluss von PavA auf die Induktion der DC-Ausreifung getestet. DCs wurden 30 min mit *S. p. Δply* oder *S. p. ΔplyΔpavA* infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden abgetötet und die infizierten DCs ohne Antibiotika für weitere 18 h zur optimalen Stimulierung fortlaufend inkubiert. Der Ausreifungsstatus der Zellen wurde über die Quantifizierung von CD25, CD83, CD86 und HLA-DR im Durchflusszytometer bestimmt (siehe 4.7.1). Als Kontrolle wurden unstimulierte DCs eingesetzt. Als Induktionskontrolle wurden DCs mit 0,5 µg/ml LPS (*E. coli*) für 48 h inkubiert und somit zur Ausreifung angeregt.

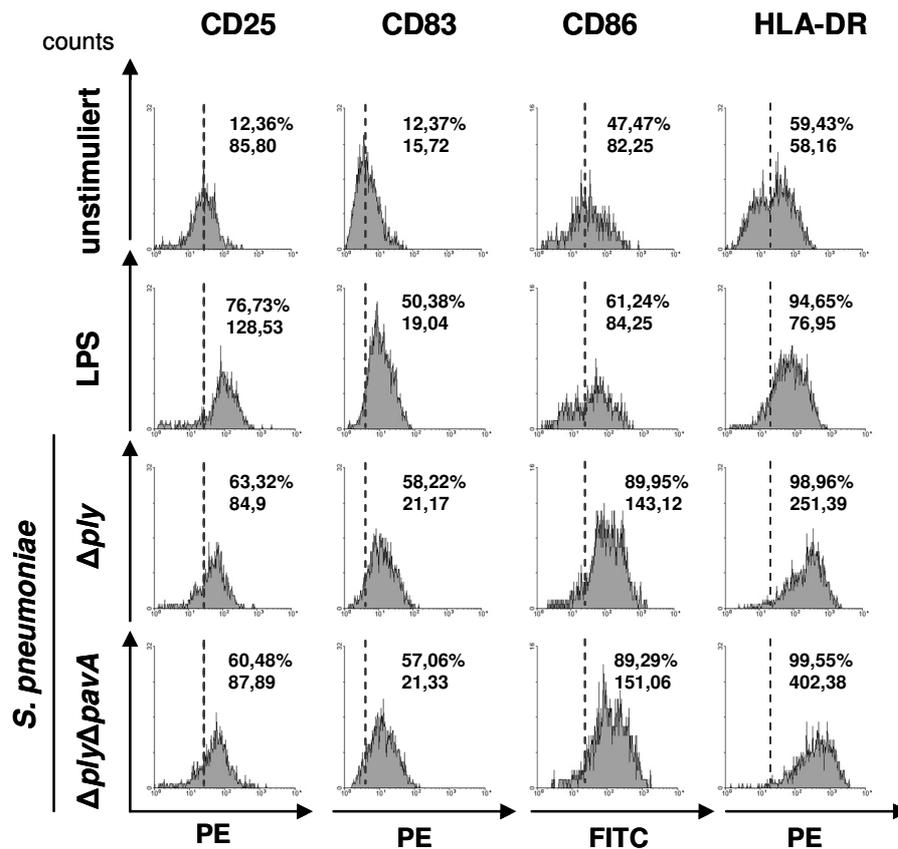


Abbildung 16: Oberflächenexpression von zellulären Ausreifungsmarkern auf DCs in Abhängigkeit von *PavA*. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden Expressionsprofile bestimmter Oberflächenmarker von unstimulierten, LPS- und *S. p. Δply* bzw. *S. p. ΔplyΔpavA* stimulierten (18 h) DCs durch Antikörperdetektion bestimmt. Die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums ist durch den Fluoreszenzwert (GMFI) und den Prozentsatz positiver Ereignisse in repräsentativen Histogrammen definiert. Das Fluoreszenzmaximum bei unstimulierten DCs wird als Referenzwert (perforierte Linie) verwendet.

Die Stimulierung von DCs durch Pneumokokken führte sowohl bei *S. p. Δply* als auch bei *S. p. ΔplyΔpavA* (nach 18 h) zur Erhöhung der DC-Ausreifungsmarker (Abbildung 16). Eine Verschiebung der Fluoreszenz-Maxima konnte im Vergleich zu den unstimulierten DCs in allen drei Fällen der Stimuli, LPS, *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* nachgewiesen werden. Pneumokokken regten im Vergleich zur LPS-Induktion die CD86 und HLA-DR Expression verstärkt an. CD83 wurde bei allen Stimuli gleich stark produziert. Die CD25 Expression konnte durch Pneumokokken induziert werden, wobei die Induktion durch LPS effizienter war.

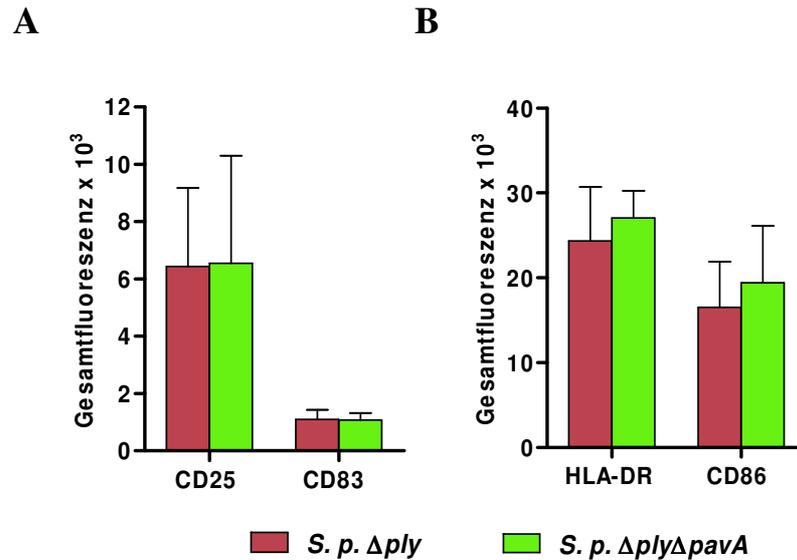


Abbildung 17: Nachweis von Ausreifungsmarkern auf Pneumokokken-infizierten DCs in Abhängigkeit von PavA. Nach einer Stimulierung von 18 h wurde die Induktion zellulärer Oberflächenmarker CD25, CD83 (A), CD86 und HLA-DR (B) mittels durchflusszytometrischer Messungen quantitativ als Gesamtfluoreszenz bestimmt.

S. p. Δply induzierte die gleiche Menge an CD83-Molekülen wie *S. p. ΔplyΔpavA* (Abbildung 17 A). CD25 wurde nach CD83 am schwächsten exprimiert (Abbildung 17 A, Tabelle 12). CD86 und HLA-DR hingegen wurden am stärksten induziert (Abbildung 17 B). Die HLA-DR Expression erreichte sogar einen Wert von $24,36 \times 10^3$ für *S. p. Δply* bzw. mit $27,04 \times 10^3$ für *S. p. ΔplyΔpavA* (Abbildung 17 B). Unterschiede der Markerexpression konnten bei CD25 bzw. CD83 in Abhängigkeit der PavA-Produktion nicht beobachtet werden (Abbildung 17). Im Fall von CD86 und HLA-DR konnte eine leichte Erhöhung von jeweils 3000 an Gesamtfluoreszenz für *S. p. ΔplyΔpavA* stimulierte DCs im Vergleich zu *S. p. Δply* gemessen werden. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

| Oberflächenmarker | Gesamtfluoreszenz [MFI x %] x 10 ³ | |
|-------------------|---|------------------------|
| | <i>S. p. Δply</i> | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> |
| HLA-DR | 24,36 ± 6,35 | 27,04 ± 3,22 |
| CD25 | 6,43 ± 2,74 | 6,55 ± 3,75 |
| CD83 | 1,09 ± 0,35 | 1,07 ± 0,25 |
| CD86 | 16,53 ± 5,39 | 19,42 ± 6,68 |

Tabelle 12: Quantifizierung von Ausreifungsmarkern von Pneumokokken-stimulierten DCs. Die zytometrisch ermittelten Werte stellen die Gesamtfluoreszenz der DCs im positiven Bereich der Fluoreszenzsignale dar.

Die Ausreifung von DCs konnte sowohl durch LPS als auch durch Pneumokokken signifikant induziert werden. Die Menge produzierter Oberflächenmarker variierte innerhalb der getesteten Marker aber nicht innerhalb der untersuchten Pneumokokkenstämme. Die Ausreifung von DCs wurde somit nicht durch die Produktion von PavA beeinträchtigt. LPS-stimulierte DCs zeigten sogar geringere Mengen an Oberflächenmarker bei HLA-DR, CD86 und CD83 als Pneumokokken-infizierte DCs. CD25 wurde bei allen Stimuli gleichwertig exponiert.

4.8 Zytokingenexpression und Zytokinfreisetzung durch Pneumokokken-stimulierte DCs

DCs leiten während der Ausreifung unter physiologischen Bedingungen eine morphologische Umgestaltung der Zelle ein. Damit erlangen sie die Fähigkeit mit der Lymphflüssigkeit bis hin zu lymphatischem Gewebe durch den Organismus zu migrieren. Hier können sie vielfach phagozytierte Fremdkörper an naive T-Zellen über das Schlüssel-Schloss Prinzip (MHC-Klasse II) präsentieren. Die T-Zellen reagieren mit hoch spezifischer Proliferation auf den präsentierten Stimulus. Unterstützt wird dieses Signal durch die Ausschüttung von pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokinen. Proinflammatorische Zytokine unterstützen die Differenzierung von Th1-Zellen und somit die zytotoxischen Funktionen des Immunsystems, aber auch die Mobilisierung von Makrophagen. Antiinflammatorische Zytokine induzieren vor allem die Th2-Zell Ausbildung und darüber hinaus die B-Zell-Aktivierung zur Antikörperproduktion (Abbildung 1). Bakterielle Infektionen lösen im Körper vor allem proinflammatorische Reaktionen aus. Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α werden durch phagozytierende Immunzellen nach bakterieller Infiltration ausgeschüttet. IL-10 gilt als antiinflammatorischer Antagonist zu IL-12. Dennoch wird beobachtet, dass mit einer Verspätung auch bei bakteriellen Infektionen IL-10 exprimiert und sekretiert wird. Damit gewährleistet das Immunsystem die Einstellung des immunologischen Gleichgewichts. In den Folgenden Ausführungen werden Zytokinprofile von DCs nach Pneumokokkenstimulierung auf Gen- und Proteinebene untersucht.

4.8.1 Pava-abhängige Zytokinexpression in Pneumokokken-stimulierten DCs

Die induzierten Zytokine wurde nach einer 30 minütigen Infektion von DCs mit *S. p. Δply* oder *S. p. ΔplyΔpavA* und nach Abtöten von extrazellulären Bakterien bestimmt. Zur maximalen Aktivierung von DCs wurden die infizierten Zellen für weitere 18 h in Abwesenheit von Antibiotika bei 37°C inkubiert. Unstimulierte Zellen wurden gleichen Bedingungen kultiviert und als Referenz eingesetzt. Als Kontrolle wurden DCs mit LPS (0,5 ug/ml) für 48 h stimuliert und somit zur Zytokinexpression angeregt. Zur RNA-Isolierung wurden 1×10^6 der unterschiedlich behandelten Zellen lysiert. Die Gesamt RNA der infizierten DCs wurden über spezifische Säulenkopplung aufgereinigt, und durch DNase I Behandlung von restlicher genomischer DNA befreit. Die Quantifizierung der aufgereinigten RNA erfolgte photometrisch über die Nanodrop Technologie. Die Qualität der isolierten RNA wurde durch ein Formamid 1% Agarose Gel erfasst. Die Gesamt RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Zum Erfassen bestimmter Expressionsprofile folgte eine Polymerasen-Ketten-Reaktion mit der cDNA als Template. Zur Amplifikation der exprimierten Gene wurden Primer verwendet, durch die bestimmte Regionen der zu untersuchenden kodierenden Gene vervielfältigt werden konnten. Die Transkription von eukaryotischen Genen ist durch die posttranskriptionale Prozessierung der mRNA gekennzeichnet. Eukaryotische Genen beinhalten Exons und Introns. Nach der Transkription werden durch den Spleißmechanismus nicht-kodierende Bereiche (Introns) enzymatisch aus der mRNA entfernt. Die bereitgestellte RNA besteht nur aus ursprünglich definierten Exonbereichen. Die spezifische Amplifikation der cDNA wurde mit Primern durchgeführt, die vor allem kodierende Bereiche der Zytokingene (Exons), oder mindestens einen nicht-kodierenden Genbereich (Intron) mit einbeziehen. Bei der letzteren Primerauswahl ist die Unterscheidung zwischen cDNA und genomischer DNA möglich. Das Amplifikationsprodukt von cDNA ist aufgrund des Spleißens der Introns kleiner als von genomischer DNA. Die Amplifikationsreaktion erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Annealing-Temperatur von 65°C. Zur möglichen Unterscheidung der zugrunde liegenden Kopienanzahl der mRNA wurde die Zyklenanzahl von 32 gewählt. Bei höherer Zyklenanzahl verringern sich die nachweisbaren Unterschiede, da die Amplifikation auf exponentieller Vervielfältigung der Template-DNA beruht. Bei der folgenden Analyse der reversen Transkription wurden die unterschiedlich behandelten DCs auf die Expression von *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p35*, *IL-12p40*,

IFN- γ , und *TNF- α* untersucht. Das proinflammatorische Zytokin IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten, IL-12p35 und IL-12p40. IL-p70, welches regulatorische Funktion besitzt, wird durch das Gen *IL-12p35* kodiert. Posttranslational setzen sich IL-12p40 und IL-12p70 zum funktionalen IL-12 zusammen. Hinsichtlich der Genexpression mussten somit beide Gene berücksichtigt werden. Um sicher zustellen, dass alle Proben in gleichen Mengen eingesetzt wurden, wurde als Referenzwert das Haushaltsgen für das glykolytische Enzym GAPDH (Glutaraldehydphosphoryldehydrogenase), ein konstitutiv transkribiertes Gen, gewählt. Zur Auswertung wurden die erhaltenen PCR-Produkte über ein 2% Agarose Gel aufgetrennt, durch Ethidiumbromidbehandlung angefärbt und durch UV-Licht Bestrahlung sichtbar gemacht.

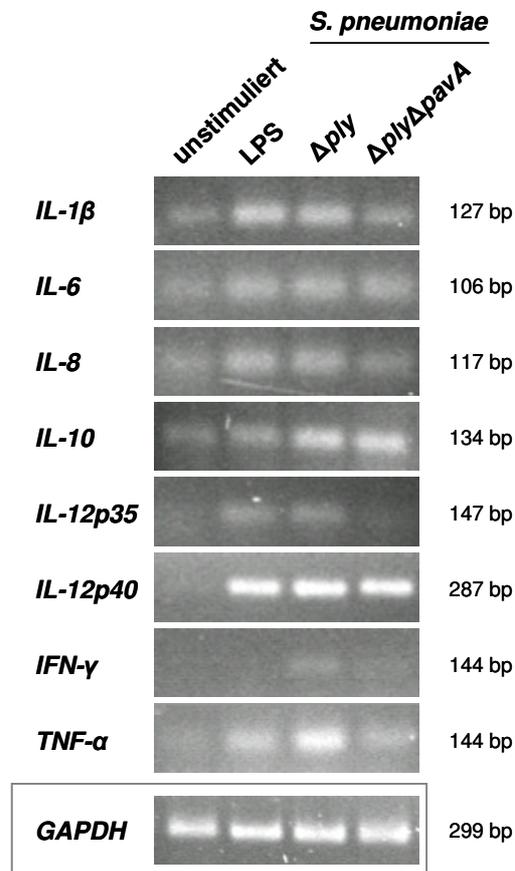


Abbildung 18: Expressionsprofile von Zytokin kodierender Gene in Pneumokokken-stimulierten DCs. Aufgereinigte zelluläre mRNA von unstimulierten DCs, LPS-, *S. p. Δ ply* und *S. p. Δ ply Δ pavA* (18 h) stimulierten DCs wurde nach reverser Transkription mit spezifischen Zytokin-Primern amplifiziert. Die Amplifikationsreaktion erfolgte bei 65°C über 32 Zyklen und die Auftrennung der Produkte in einem 2% Agarose Gel. Aufgetragen wurde das vollständig erhaltene PCR-Produkt.

Die konstitutive Expression des Haushaltsgen GAPDH war in allen getesteten DC-Proben gleichermaßen vorhanden (Abbildung 18). Aufgrund dessen konnten die erhaltenen Zytokinprodukte miteinander verglichen werden. Die unstimulierten DCs zeigten bei der Amplifikation von *IL-1 β* , *IL-6*, *IL8* und *IL-10* eine leichte Expression. Eine Induktion der Zytokinexpression war in allen stimulierten Proben für *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40* und *TNF- α* zu erkennen. *IFN- γ* wurde in keiner der getesteten Proben exprimiert. Im Vergleich zum PavA-positiven Stamm *S. p. Δ ply* induzierte die *pavA*-Mutante *S. p. Δ ply Δ pavA* geringere Expressionslevel. Dies war insbesondere bei *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-8* und *IL-12p35* im Agarosegel zu sehen (Abbildung 18).

Pneumokokken induzierten bei DCs die Zytokinexpression unter den gegebenen methodischen Bedingungen. Proinflammatorische Entzündungszytokine wie *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-12p35*, *IL-12p40* und *TNF- α* wurden nach Stimulierung transkribiert. Dieses proinflammatorische Muster war vergleichbar mit der LPS-Induktion von Zytokingenen bei DCs. Außerdem konnte eine Induktion des antiinflammatorischen *IL-10* nach der Pneumokokkenstimulierung erfasst werden, was bei der LPS-Stimulierung nur geringfügig nachgewiesen werden konnte. Die *IFN- γ* -Expression blieb in allen getesteten Proben vollständig aus. Die Induktion des Zytokinprofils variierte zwischen den Pneumokokkenstämmen in Abhängigkeit von PavA. Die Zellen wiesen in Gegenwart von PavA eine gesteigerte Zytokinexpression auf.

Es wurde eine quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) mit cDNA infizierter DCs durchgeführt, um die induzierten Expressionslevel der getesteten Zytokine zu quantifizieren. Dabei konnte die Menge der mRNA-Kopienanzahl in vergleichenden Studien bestimmt werden. Durch die SYBR Green Reaktion mit einzelnen Amplifikationsprodukten kann zyklusabhängig die Vervielfältigung der Transkripte gemessen werden. Transkripte mit mehreren Kopien werden schneller exponentiell amplifiziert als Transkripte mit wenigen Kopien. Für diese Untersuchung wurden DCs mit dem Pneumokokkenstamm *S. p. Δ ply* (MOI 50) für 30 min infiziert. Extrazelluläre Bakterien wurden in antibiotikahaltigem Medium innerhalb 1 h Inkubationszeit abgetötet. Zur maximalen Aktivierung von DCs wurden die infizierten Zellen für weitere 18 h ohne Antibiotikum bei 37°C inkubiert. Unstimulierte DCs wurden als Referenzwert eingesetzt. Die Isolierung der Gesamt RNA von 5×10^5 der unterschiedlich behandelten Zellen

erfolgte mit Hilfe eines Standardprotokolls. Davon wurden ca. 320 ng Gesamt RNA für die Übersetzung durch die reverse Transkriptase in cDNA verwendet. Für die Amplifikation mit Hilfe der Taqman Technologie wurden pro Ansatz 16 ng cDNA eingesetzt. Die Amplifikationsreaktion erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C für 40 Zyklen. Bei der folgenden Analyse der reversen Transkription wurden die unterschiedlich behandelten DCs auf die Expression von *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p35*, *IL-12p40*, *IFN- γ* , und *TNF- α* untersucht. Das Haushaltsgen für das ribosomale Protein S9 (RPS9), ein konstitutiv transkribiertes Gen, wurde als Referenz der eingesetzten Proben verwendet.

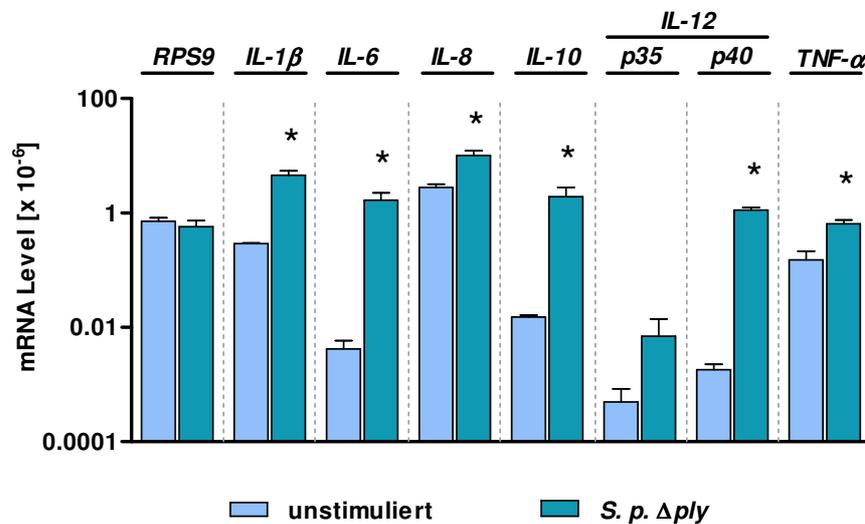


Abbildung 19: mRNA-Expressionslevel der Zytokingene bei Pneumokokken-infizierten DCs. Die mRNA von unstimulierten DCs (hellblaue Balken) und *S. p. Δply* (18 h) stimulierten DCs wurde nach reverser Transkription mit Zytokin-Primern amplifiziert. Die dargestellten Zytokintranskripte wurden bei 65°C und 40 Zyklen exponentiell vervielfältigt und mit SYBR Green™ detektiert. Die Auswertung erfolgte über die Berechnung des komparativen Wertes durch $x = 2^{-CT}$. * $p < 0,05$

Mit einer Kopienanzahl von RPS9 mRNA von $0,72 \times 10^{-8}$ bei unstimulierten DCs und $0,57 \times 10^{-8}$ bei *S. p. Δply* wurde das cDNA-Template in vergleichbaren Mengen zur Amplifikation in der qRT-PCR eingesetzt. Signifikante Unterschiede im mRNA Level konnten bei *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40* und *TNF- α* beobachtet werden (Abbildung 19, Tabelle 13). Dabei zeigte sich bei der Stimulierung mit *S. p. Δply* höhere mRNA Level als bei den unstimulierten DCs. Dabei zeigte *IL-12p40* mit einer 620-fachen Induktion den stärksten Effekt. Bei *IL-6* konnte eine 397-fache und bei *IL-10* eine 128-fache Expression im Vergleich zu unstimulierten DCs gemessen werden. *IL-1 β* wurde

15,7-fach und *IL-12p35* 14-fach stärker induziert. Die geringsten Effekte der induzierten Expression konnten mit einem Faktor 4,2 bzw. 3,7 bei *TNF- α* bzw. *IL-8* berechnet werden. Eine Induktion der *IFN- γ* Expression konnte nicht beobachtet werden. Die dargestellten Ergebnisse unterstützen die Daten der nicht quantitativen reversen Transkription (Abbildung 18). In den Analysen wurde gezeigt, dass Pneumokokken das Zytokinprofil von *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p40* und *TNF- α* bei DCs induzierten.

Mittels RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Expression von Zytokingenen bei Anwesenheit von PavA erniedrigt war (Abbildung 18). Der Einfluss von PavA auf die Induktion der Zytokine bei unterschiedlich stimulierten DCs wurde mit Hilfe von qRT-PCR untersucht, quantifiziert und verifiziert.

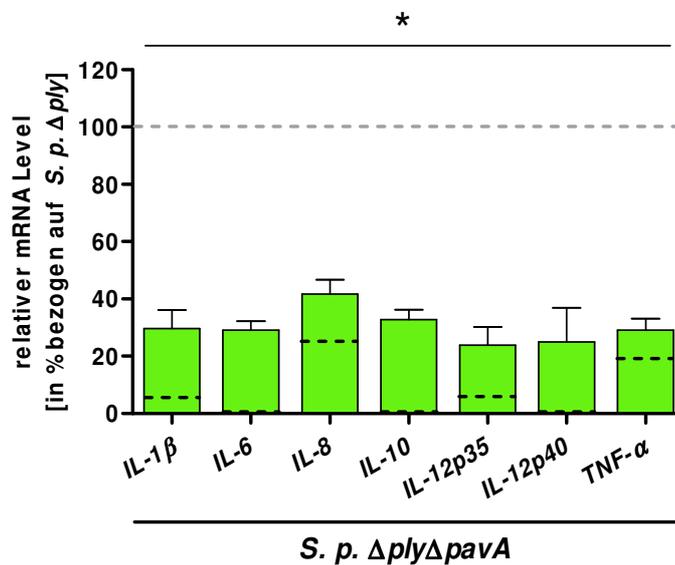


Abbildung 20: Expression der Zytokingene in Abhängigkeit des PavA-Proteins bei *S. pneumoniae*-infizierten DCs. Die mRNA unstimulierter DCs (schwarze perforierte Linie) *S. p. Δply* (graue perforierte Linie, 100%) und *S. p. ΔplyΔpavA* (18 h) stimulierten DCs wurde nach reverser Transkription spezifisch bei 65°C für 40 Zyklen mittels qRT-PCR amplifiziert. Die mRNA Level der Zytokine wurden durch die Ct Werte mit Hilfe der Taq Man Technologie ermittelt. * $p < 0,04$

Für *S. p. Δply* bzw. *S. p. ΔplyΔpavA* stimulierte DCs wurden die mRNA Level der einzelnen Zytokine nach 18 h Stimulierungsdauer bestimmt und zueinander relativiert. Die Werte der *S. p. Δply*-Stimulierung wurden als 100%-Wert eingesetzt. Die Daten der DC-Stimulierung mit *S. p. ΔplyΔpavA* wurden prozentual auf den 100%-Referenzwert bezogen. Als Kontrolle wurden unstimulierte DCs prozentual mit der *S. p. Δply*-Stimulierung verrechnet.

S. p. ΔplyΔpavA stimulierte DCs zeigten eine erhöhte Genexpression von *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p35*, *IL-12p40* und *TNF-α* im Vergleich zu unstimulierten DCs. Bei *IFN-γ* konnte keine Expression nachgewiesen werden. Die *S. p. ΔplyΔpavA* Stimulierung der DCs führte zu signifikant geringeren Mengen an Zytokintranskripten im Vergleich zur *S. p. Δply*-Stimulierung (Abbildung 20, Tabelle 13). Bei *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10* und *TNF-α* wurde lag bei *S. p. ΔplyΔpavA* eine Reduktion der Genexpression von ca. Zweidritteln vor. Bei *IL-8* konnte mit einer Erniedrigung des Zytokinlevels von 59% der schwächste Effekt der *pavA*-Mutante nachgewiesen werden. Drastische Unterschiede zeigten sich bei der Messung von *IL-12*. Sowohl bei *IL-12p35* als auch bei *IL-12p40* wurde eine signifikante Erniedrigung der Expressionsrate im Vergleich zur *S. p. Δply*-Stimulierung nachgewiesen. Obwohl die Induktion der mRNA von *IL-12p35* im absoluten Vergleich zur unstimulierten DCs am geringsten ausfiel (Abbildung 19), zeigte die Mutante *S. p. ΔplyΔpavA* im relativen Vergleich eine um 76% erniedrigte Induktion der Genexpression. Die *IL-12p40* Transkription wies einen verringerten RNA-Level von 25% auf.

| Zytokin | mRNA Level [$\times 10^{-6}$] | | | Relativer mRNA Level [% bezogen auf 100% von <i>S. p. Δply</i>] | | |
|----------|---------------------------------|-------------------|-----------------|--|------------------------|-------------------------------------|
| | Unstim. | <i>S. p. Δply</i> | <i>p</i> -Werte | Unstim. | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> | <i>p</i> -Wert [$\times 10^{-6}$] |
| RPS9 | 0,72 ± 0,11 | 0,57 ± 0,16 | 0,48 | - | | - |
| IL-1β | 0,29 ± 0,007 | 4,56 ± 0,89 | 0,021 | 0,06 | 29,68 ± 6,4 | 0,462 |
| IL-6 | 0,0042 ± 0,001 | 1,67 ± 0,57 | 0,045 | 0,25 | 29,09 ± 3,0 | 2,23 |
| IL-8 | 2,81 ± 0,38 | 10,20 ± 2,04 | 0,037 | 27 | 41,66 ± 5,0 | 0,355 |
| IL-10 | 0,015 ± 0,0012 | 1,92 ± 0,87 | 0,039 | 0,78 | 32,73 ± 3,4 | 4,84 |
| IL-12p35 | 0,0005 ± 0,00034 | 0,007 ± 0,006 | 0,32 | 7,1 | 23,87 ± 6,4 | 0,328 |
| IL-12p40 | 0,0018 ± 0,00045 | 1,116 ± 0,128 | 0,006 | 0,16 | 24,9 ± 11,9 | 40,3 |
| TNF-α | 0,151 ± 0,061 | 0,641 ± 0,112 | 0,032 | 20 | 29,09 ± 3,9 | 6,49 |

Tabelle 13: Absolutwerte der mRNA-Expression nach Stimulierung von DCs durch Pneumokokken. Die absoluten mRNA Werte wurden durch die Formel $x = 2^{-ct}$ berechnet. Bei den vergleichenden Studien wurden die mRNA-Level der *S. p. Δply*-Stimulierung als 100% Referenzwert verwendet. Die Daten der *S. p. ΔplyΔpavA*-Stimulierung wurden bezogen auf den 100% Wert prozentual verrechnet. Zur Kontrolle der Induktion wurden die Expressionsraten von unstimulierten DCs (unstim.) verwendet.

Der Nachweis relativer mRNA Mengen nach DC-Stimulierung durch *S. p. ΔplyΔpavA* mittels qRT-PCR zeigte die Induktion von den Zytokingenen *IL-1β*, *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *IL-12p35*, *IL-12p40* und *TNF-α*. Dadurch konnten die Ergebnisse der reversen Transkription

evaluiert und unterstützt werden (Abbildung 18). Die Zytokine wurden in Anwesenheit des bakteriellen PavA-Proteins signifikant stärker in DCs exprimiert werden (Abbildung 20).

4.8.2 Zytokinproduktion und –freisetzung in *S. pneumoniae*-stimulierten DCs

Die Stimulierung mit Pneumokokken erhöhte signifikant die Expressionsprofile der Zytokine (Abbildung 18, Abbildung 19). Zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems wird Zytokin-RNA translatiert und die Proteine in den Überstand sekretiert. Zur Detektion der sekretierten Zytokine und Zytokinmenge von bakteriell stimulierten DCs wurden die DCs mit *S. p. Δply* für 30 min infiziert und extrazelluläre Bakterien durch Antibiotika abgetötet. Die infizierten Zellen wurden zur optimalen Stimulierung für weitere 2, 8, 18 h und 48 h inkubiert. Die Zytokine der Überstände der jeweiligen Infektionen wurden mit multiplexer Antikörperreaktion mit der Luminex Technologie detektiert. Dabei wurden die Mengen sekretierter IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α zytometrisch im Luminexgerät ermittelt. Unstimulierte DCs wurden als Referenzwert verwendet. Die Überstände unstimulierter DCs wurden als unspezifisches Hintergrundsignal von den gemessenen Werte rechnerisch substrahiert.

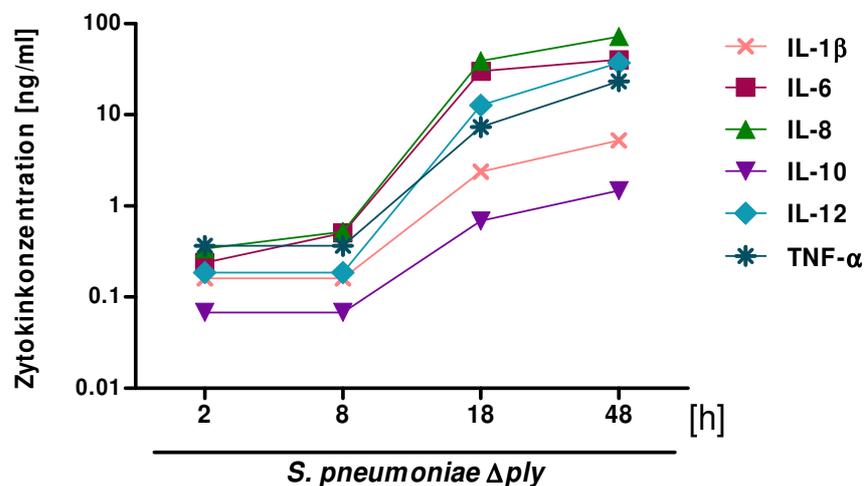


Abbildung 21: Zytokinsekretion nach Stimulation der DCs mit *S. p. Δply*. DCs wurden mit *S. p. Δply* für 30 min infiziert und extrazelluläre Bakterien abgetötet. Die sekretierte Zytokinmenge von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α wurde im Infektionsüberstand mittels Luminex Technologie bestimmt. Als Kontrolle wurden Überstände von unstimulierten DCs gemessen und die resultierenden Werte von Pneumokokken-induzierten Werten abgezogen.

Messbare Zytokinkonzentrationen in den Überständen infizierter DCs konnten erst nach 18 stündiger Stimulierung *S. p. Δply* gemessen werden (Abbildung 21). Zwischen 18 h und 48 h Stimulierung erhöhte sich die sekretierte Menge aller analysierter Zytokine, bis nach 48 h das Maximum der Werte erreicht wurde. Die höchsten Mengen an freigesetzten Zytokinen konnten bei IL-8, IL-6 und IL-12 gemessen werden. Die sekretierten Mengen von IL-1β und IL-10 waren unter den gemessenen Zytokinen mit 5,223 ng/ml und 1,479 ng/ml nach 48 h am niedrigsten (Tabelle 14). Dennoch erhöhte sich die Konzentration von IL-1β zwischen 8 h und 48 h um das 50-fache, und bei IL-10 um das 20-fache. IFN-γ konnte bei diesen Analysen nicht detektiert werden.

| Zytokine | Zytokinfreisetzung nach der Infektion mit <i>S. p. Δply</i> [ng/ml] | | | |
|----------|---|-------|--------|--------|
| | 2 h | 8 h | 18 h | 48 h |
| IL-1β | 0,160 | 0,160 | 2,369 | 5,223 |
| IL-6 | 0,239 | 0,508 | 30,134 | 40,148 |
| IL-8 | 0,340 | 0,522 | 39,064 | 72,269 |
| IL-10 | 0,068 | 0,068 | 0,683 | 1,479 |
| IL-12 | 0,00 | 0,185 | 12,735 | 37,213 |
| TNF-α | 0,00 | 0,363 | 7,325 | 23,391 |

Tabelle 14: Menge an sekretierten Zytokinen nach DC-Stimulierung mit *S. pneumoniae Δply*. Nach 30 min Infektion, antibiotischer Behandlung und angegebenen Zeitpunkten wurden in den Zellüberständen die jeweiligen Zytokinkonzentrationen mit der Luminex Technologie bestimmt.

DCs konnten durch den Pneumokokkenstamm *S. p. Δply* zur Zytokinfreisetzung unter den verwendeten methodischen Bedingungen angeregt werden. Nach der Stimulierung der DCs mit Pneumokokken wurden proinflammatorische Zytokine, wie IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 und TNF-α, zeitabhängig ausgeschüttet. Auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 konnte im Überstand der stimulierten DCs nachgewiesen werden. Eine IFN-γ Produktion blieb vollständig aus und wurde nicht gemessen. Für weiterführende Versuche wurde eine Stimulierung der DCs mit *S. pneumoniae* von 18 h in den Standardexperimenten verwendet.

Die Effizienz der Zytokinproduktion und –sekretion der mit *S. p. Δply*-infizierten DCs wurde nach 18 h Infektion mit LPS-stimulierten DCs verglichen. Dazu wurden in Versuchen als positive Referenz wurden DCs mit *E. coli* LPS für 48 h stimuliert und die Zytokinmengen mit der Luminex Technologie gemessen. Die Werte für die LPS-stimulierten Proben wurden mit der Wertigkeit 1 dargestellt. Pneumokokken-induzierte

Zytokine wurden relativ als x-fache Werte kalkuliert (Abbildung 22). Die Quantifizierung der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α erfolgte mit der multiplexen Antikörperdetektion und der zytometrischen Messung mit der Luminex Technologie. Überstände von unstimulierten DCs wurden gemessen und als unspezifische Detektion von den stimulierten Proben substrahiert.

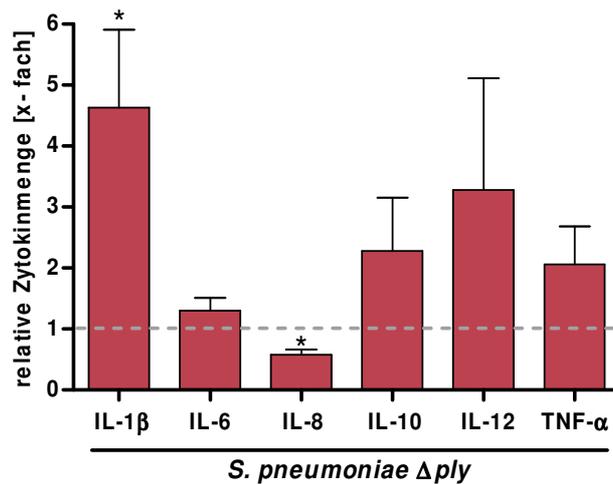


Abbildung 22: Relative Zytokinkonzentration von *S. p. Δply*-stimulierten DCs bezogen auf die LPS-Induktion. DCs wurden 30 min *S. p. Δply* infiziert, die extrazellulären durch Gentamicin und Penicillin G Inkubation (1 h) abgetötet und die Zellüberstände nach weiteren 18 h Inkubation bei 37°C in der Luminex Technologie analysiert. Als Positiv-Kontrolle wurden DCs für 48 h mit 0,5 μ g/ml LPS (*E. coli*) zur Zytokinausschüttung stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen im Überstand der Pneumokokken-stimulierten DCs werden als relative Werte dargestellt und auf die LPS-Kontrolle bezogen (graue Linie, = 1) dargestellt. * $p < 0,04$

Im Vergleich zu den LPS-stimulierten DCs führte die Stimulierung durch *S. p. Δply* zu einer erhöhten Freisetzung von IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α (Abbildung 22). Bei IL-12 konnte das Maximum von einer 4,4-fach erhöhten Zytokinmenge gemessen werden (Abbildung 22, Tabelle 15). IL-1 β wurde durch *S. p. Δply* 3,3-fach sekretiert, gefolgt von IL-10 mit einer 2,6-fachen, TNF- α mit einer 2,4-fachen und IL-6 mit einer 1,5-fachen Erhöhung der induzierten Zytokinsekretion im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Bei IL-8 konnte eine signifikante Erniedrigung der Zytokinausschüttung gemessen werden. Die Stimulierung durch *S. p. Δply* führte zu einer 40% Senkung der IL-8-Konzentration im Vergleich zu LPS-stimulierten DCs. Obwohl bei IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 und TNF- α Messung erhöhte Mengen an Zytokinen nach der Stimulierung mit *S. p. Δply* nachgewiesen werden konnten, sind nur die Unterschiede bei IL-1 β und IL-8 signifikant.

Die Konzentration von extrazellulärem IFN- γ konnte aufgrund geringer Mengen nicht bestimmt werden.

| Zytokine | <i>S. p. Δply</i> [x fach von LPS = 1] | <i>p</i> – Werte (bezogen auf LPS) |
|---------------|---|---------------------------------------|
| IL-1 β | 3,380 \pm 0,664 | 0,034 |
| IL-6 | 1,471 \pm 0,360 | 0,222 |
| IL-8 | 0,616 \pm 0,184 | 0,008 |
| IL-10 | 2,643 \pm 1,938 | 0,213 |
| IL-12 | 4,396 \pm 3,552 | 0,281 |
| TNF- α | 2,429 \pm 1,238 | 0,097 |

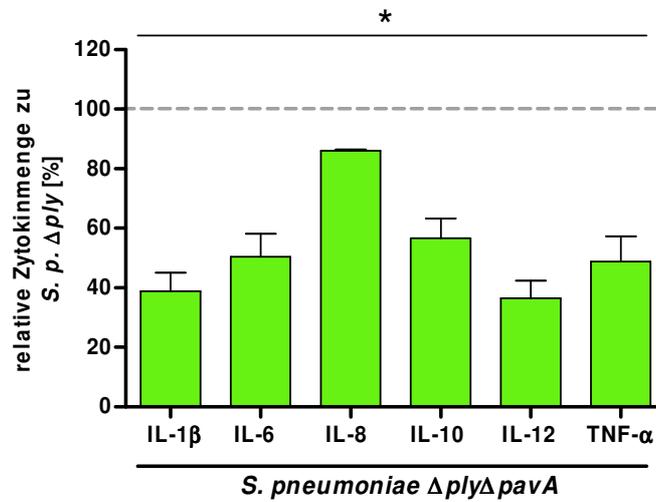
Tabelle 15: Quantifizierung der sekretierten Zytokine von *S. p. Δ ply*- und LPS-stimulierten DCs. Die Zytokinausschüttung bei *S. p. Δ ply* Infektionen wird als relativer x-facher Wert auf die sekretierte Zytokinmenge des LPS-Stimulus bezogen.

Pneumokokken regten im Vergleich zu LPS die DCs zu einer höheren Zytokinproduktion an. Nur bei IL-8 wurden geringere Mengen an Zytokinmengen bei einer Infektion mit *S. p. Δ ply* nachgewiesen. Es konnte kein IFN- γ im Zellüberstand gemessen werden, was die Beobachtungen der Kinetikstudien (Abbildung 21) unterstützte.

4.8.3 PavA-abhängige Induktion von Zytokinen in DCs

Zytokine werden in gelöster Form physiologisch aktiv. Nach der Sekretion der Zytokine in die extrazelluläre Umgebung und deren Interaktion mit Immunzellen wird durch die Stimulierung bestimmter T-Zellen die adaptive Immunantwort aktiviert. Im Folgenden wurde die sekretierten Zytokinmengen nach der Infektion von DCs mit *S. p. Δ ply* und *S. p. Δ ply Δ pavA* verglichen. DCs wurden für 30 min infiziert und extrazelluläre Bakterien abgetötet. Die infizierten Zellen wurden für weitere 18 h inkubiert und die Zytokine in den Infektionsüberständen gemessen. Die Mengen sekretierter IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α wurden zytometrisch (Luminex) ermittelt. Die Überstände unstimulierter DCs wurden als unspezifischer Hintergrund von den gemessenen Werten rechnerisch abgezogen. Die induzierten Zytokinmengen bei der Infektion mit *S. p. Δ ply* wurden auf 100% gesetzt und die induzierten Zytokinmengen der *S. p. Δ ply Δ pavA*-Infektion relativ dazu berechnet.

A



B

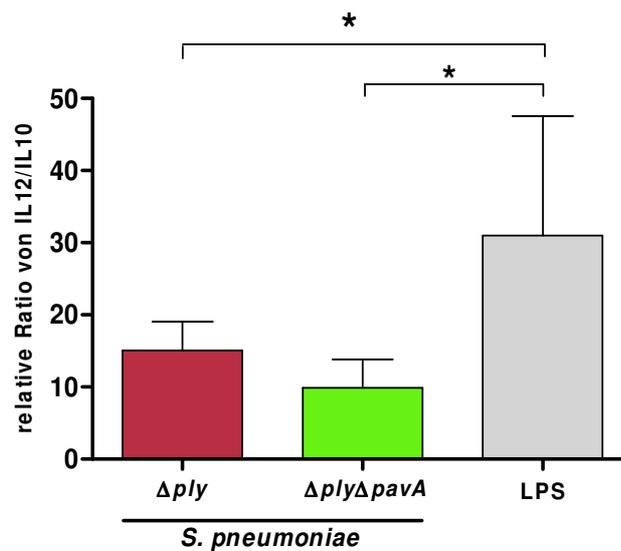


Abbildung 23: Einfluss von PavA auf die induzierten Zytokine bei der Pneumokokken-DC-Interaktion. DCs wurden 30 min mit dem Pneumokokkenstamm *S. p. $\Delta ply \Delta pavA$* infiziert, die extrazellulären durch Gentamicin und Penicillin G Inkubation (1 h) abgetötet und die Zellüberstände nach weiteren 18 h Inkubation bei 37°C mittels der Luminex Technologie auf die Konzentrationen der dargestellten Zytokine untersucht. Die Zytokinproduktion nach DC-Stimulierung mit *S. p. Δply* ist als 100% Wert angegeben (graue Linie, A). Die Werte der *S. p. $\Delta ply \Delta pavA$* Stimulierung wurden relativ dazu (in Prozent, A) dargestellt. Die Relation zwischen IL-12 und IL-10 wurde als Quotient der Absolutwerte angegeben (B). * $p < 0,05$

S. p. ΔplyΔpavA induzierte ein Zytokinprofil mit IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF-α, wie bereits als Genexpressionsmuster gezeigt wurde (Abbildung 23 A, siehe 4.8.1). IFN-γ konnte im Überstand nicht nachgewiesen werden. Die von *S. p. ΔplyΔpavA* induzierten Zytokine waren im Vergleich zu *S. p. Δply*-stimulierten DCs reduziert (Abbildung 23, Tabelle 16). Bei IL-1β und IL-12 wurde nach *S. p. ΔplyΔpavA* Induktion zu 62% bzw. 63,5% weniger Zytokine sekretiert als bei der *S. p. Δply* Stimulierung (100%-Wert). Die TNF-α Sekretion reduzierte sich um 52%. Außerdem wurde bei *S. p. ΔplyΔpavA* eine um 44% verringerte IL-10 Freisetzung und eine um 49,4% reduzierte IL-6 Sekretion beobachtet. Die IL-8 Sekretion wurde für *S. p. ΔplyΔpavA* mit 86,1% der *S. p. Δply* Stimulierung gemessen. Alle beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Stimuli waren signifikant (Tabelle 16: A). LPS-stimulierte DCs sekretierten im Vergleich zu IL-10 30,9 mal mehr IL-12 Zytokine (Abbildung 23, Tabelle 16 B). Die Stimulierung von DCs durch *S. pneumoniae* führte zu einem verringerten Quotienten der IL-12/IL-10 Ratio im Vergleich zur LPS-Kontrolle. Bei der *S. p. ΔplyΔpavA*-Stimulierung von DCs konnte eine 9,8-fache Menge an IL-12 im Vergleich zu IL-10 gemessen werden. *S. p. Δply* induzierte eine 15,07-fach gesteigerte IL-12 Freisetzung.

A

| Zytokine | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> [% von <i>Δply</i> = 100 %] | <i>p</i> –Werte (bezogen auf <i>Δply</i>) |
|----------|--|--|
| IL-1β | 38,8 ± 12,5 | 0,0167 |
| IL-6 | 50,4 ± 15,5 | 0,0460 |
| IL-8 | 86,1 ± 0,73 | 0,0013 |
| IL-10 | 56,7 ± 11,5 | 0,0228 |
| IL-12 | 36,5 ± 11,8 | 0,0129 |
| TNF-α | 48,8 ± 17,1 | 0,0427 |

B

| Stimulierung | Verhältnis zwischen induziertem IL-12 und IL-10 (IL-12/IL-10) | <i>p</i> –Werte (bezogen auf <i>Δply</i>) | <i>p</i> –Werte (bezogen auf <i>ΔplyΔpavA</i>) |
|------------------|---|--|---|
| <i>Δply</i> | 15,07 ± 3,9 | - | 0,1105147 |
| <i>ΔplyΔpavA</i> | 9,8 ± 3,9 | 0,1105147 | - |
| LPS | 30,9 ± 16,5 | 0,11043548 | 0,04742346 |

Tabelle 16: Quantifizierung sekretierter Zytokine von Pneumokokken-stimulierten DCs in Abhängigkeit von PavA. Der Unterschied zwischen dem *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA*-Stimulus wird prozentual dargestellt, wobei die *S. p. Δply* Infektion als 100%-Wert kalkuliert wurde (A). Das Verhältnis IL-12 zu IL-10 wurde als Quotient berechnet (B).

S. p. $\Delta ply \Delta pavA$ induzierte eine reduzierte Zytokinausschüttung im Vergleich zu *S. p.* Δply (Abbildung 23). Somit konnten die Effekte des PavA-Proteins auf die Zytokine sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

4.9 Induktion der T-Zellproliferation durch *S. pneumoniae*-stimulierte DCs

Die Interaktion zwischen DCs und Pneumokokken induzierte die Ausreifung der DCs und führte zur Transkription und Produktion von inflammatorischen Zytokinen (siehe 4.7 und siehe 4.8). Zu einer erfolgreichen Anregung des adaptiven Immunsystems müssen die naiven bzw. nicht ausdifferenzierten T-Zellen stimuliert werden. Diese können über das Schlüssel-Schloss-Prinzip mit angeregten APCs direkt kommunizieren und über Zytokine indirekt zur spezifischen Differenzierung stimuliert werden. Die Proliferationsrate naiver T-Zellen wurde nach der Pneumokokken-DC-Interaktion bestimmt, um die physiologische Rolle der antigenpräsentierenden Funktion von stimulierten DCs zu untersuchen, wurde bestimmt.

Aus humanem peripherem Blut wurden naive T-Zellen mittels eines Dichtegradienten isoliert. Kultivierte DCs wurden mit Pneumokokken für 30 min mit einer MOI von 50 infiziert. Die extrazellulären Bakterien wurden durch Antibiotika abgetötet. Für eine optimale Stimulierung. In einem Kontrollexperiment wurden die DCs wurde die Infektion für weitere 2, 8 und 18 h im Medium bei 37°C fortgesetzt. wurden die Zellen für 48 h mit 0,5 µg/ml *E. coli* LPS stimuliert. Unreife bzw. unstimulierte DCs wurden als Referenzwert verwendet. Im oxidativen Mitogenese Test wurde nach Vereinigung von DCs und von T-Zellen die induzierte T-Zellproliferation über die steigende Dehydrogenaseaktivität durch das Farbreagenz WST-8 bei 450 nm im ELISA-Reader nachgewiesen (siehe 7.5.3). Die Bildung des Farbsignals ist proportional abhängig von der Anzahl proliferierender Zellen. Zur Stimulierung von T-Zellen wurde jeweils eine DC-T-Zellen Ratio von 1:90, 1:30 und 1:10 eingesetzt.

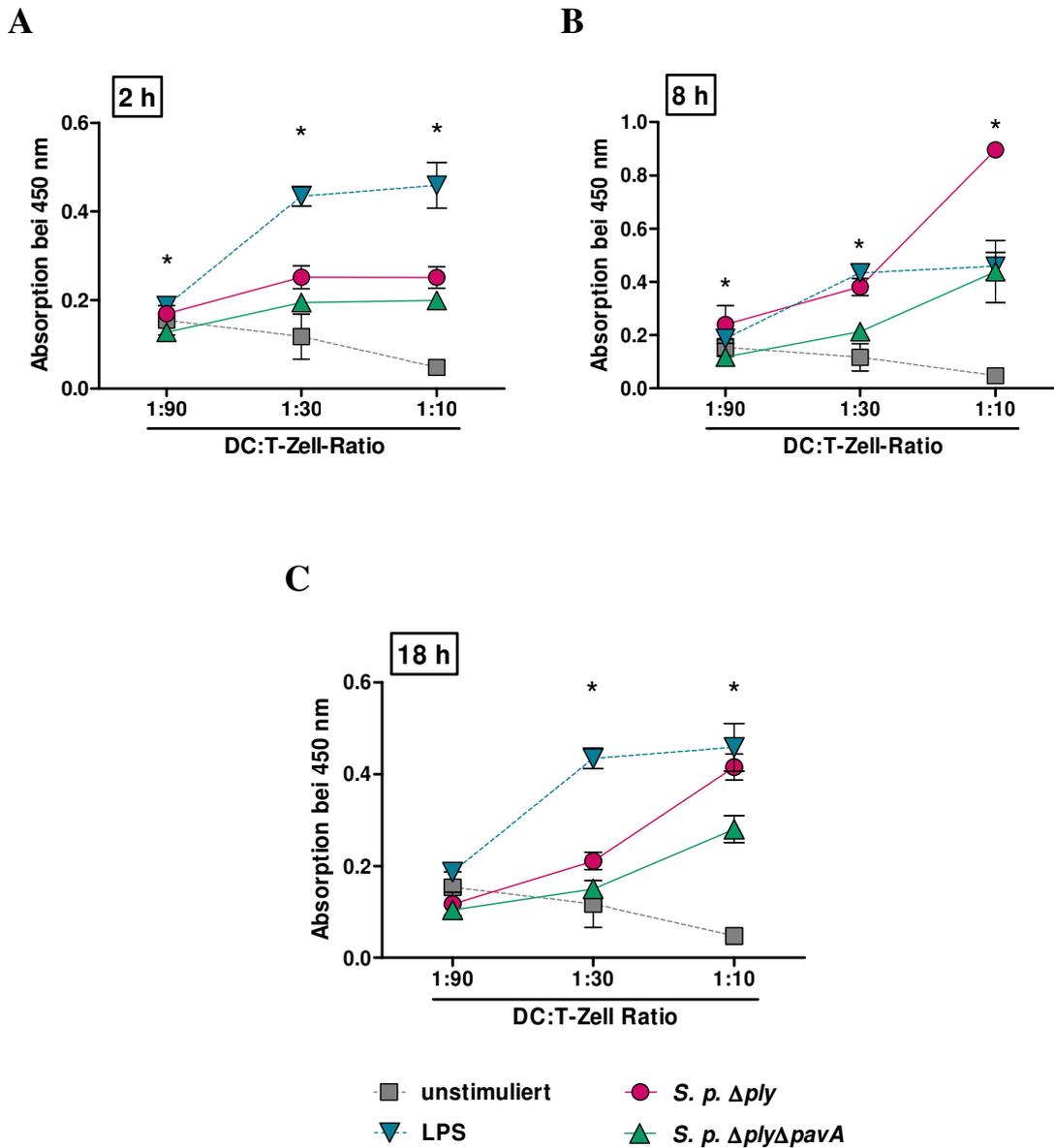


Abbildung 24: Induzierte T-Zell-Proliferation nach Stimulierung mit Pneumokokken-infizierten DCs. Die Stimulierung der T-Zellen erfolgte mit un-, LPS- und Pneumokokken-behandelten DCs mit einer DC-T-Zell Ratio von 1:90, 1:30 und 1:10. DCs mit Pneumokokken für 2 h (A), 8 h (B) und 18 h (C) stimuliert. Die proliferierten T-Zellen wurden im oxidativem Mitogenese Test durch das Farbreagenz WST-8 bei 450 nm im ELISA-Reader detektiert. Die Signifikanzmarkierungen (*) beziehen sich auf den Unterschied zwischen *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA*. * $p < 0,02$.

| DC:T-Zell Ratio | Infektionsdauer 2 h | | | Infektionsdauer 8 h | | | Infektionsdauer 18 h | | |
|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------|---------------------|-------------------------|----------------|----------------------|-------------------------|----------------|
| | Δply | $\Delta ply\Delta pavA$ | <i>p</i> -Wert | Δply | $\Delta ply\Delta pavA$ | <i>p</i> -Wert | Δply | $\Delta ply\Delta pavA$ | <i>p</i> -Wert |
| 1:90 | 0,17±0,012 | 0,127±0,04 | 0,0007 | 0,24±0,07 | 0,117±0,003 | 0,014 | 0,117±0,03 | 0,104±0,006 | 0,366 |
| 1:30 | 0,25±0,025 | 0,194±0,012 | 0,0076 | 0,38±0,03 | 0,213±0,012 | 0,0002 | 0,21±0,018 | 0,15±0,006 | 0,0008 |
| 1:10 | 0,25±0,024 | 0,199±0,02 | 0,016 | 0,90±0,02 | 0,44±0,116 | 0,0002 | 0,42±0,028 | 0,28±0,03 | 0,0005 |

| DC:T-Zell Ratio | Unstimuliert | LPS |
|-----------------|---------------|---------------|
| 1:90 | 0,047 ± 0,014 | 0,187 ± 0,012 |
| 1:30 | 0,117 ± 0,05 | 0,434 ± 0,022 |
| 1:10 | 0,154 ± 0,033 | 0,459 ± 0,052 |

Tabelle 17: Quantifizierung der T-Zellproliferation induziert durch stimulierte DCs. Dargestellt wurden die Absorptionswerte gemessen bei 450 nm im ELISA-Reader. Die Stimulierungseffizienz allogener T-Zellen wird durch die nachgewiesenen Werte dargestellt.

Die LPS-Stimulierung steigerte die Proliferationsraten der T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten DCs um die Faktoren 2,9 bis 3,9 (Abbildung 24, Tabelle 17). Die Stärke der Proliferation erhöhte sich proportional zur eingesetzten Menge an stimulierten DCs und stagnierte zwischen der Ration 1:30 und 1:10 für LPS-stimulierte Proben. Nach 2 h der Infektion von DC mit Pneumokokken konnte bei einer Ration von 1:90 eine 2,7- bis 3,9-fache Induktion der T-Zellproliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gemessen werden (Abbildung 24 A, Tabelle 17). Beim Einsatz von 30 bzw. 10 T-Zellen pro DC stagnierte das T-Zellwachstum für beide verwendeten Pneumokokkenstämme. Zwischen *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden, wobei die PavA-defiziente Pneumokokkenmutante zwischen 21% und 25% weniger T-Zellwachstum als die PavA-produzierende Mutante induzierte (Tabelle 17). Nach 8 h konnten die mit *S. p. Δply* infizierten DCs die T-Zellproliferation im Vergleich zu *S. p. ΔplyΔpavA* signifikant erhöhen. Bei einer Ration von 1:10 konnte für *S. p. ΔplyΔpavA* eine reduzierte Induktion von 50% im Vergleich zu *S. p. Δply* gemessen werden. Nach 18 h Stimulierung verringerte sich die Proliferationseffizienz bei einer Ratio von 1:10 um ca. 50% im Vergleich zu den 8 h Werten (Abbildung 24, Tabelle 17). Für den Einsatz von 1:30 wurde eine um 30% reduzierte T-Zellproliferation für *S. p. ΔplyΔpavA* auf *S. p. Δply* bezogen gemessen. Beim Einsatz von 1:10 lag dieser Unterschied sogar bei 35%.

Die oxidative Mitogenese Messung von allogenen T-Zellen zeigte, dass Pneumokokken-stimulierte DCs eine spezifische T-Zellproliferation *in vitro* auslösen. Die stärkste Proliferationseffizienz konnte nach 8 h Infektion nachgewiesen werden. Mit 18 h Stimulierung sank die Rate wieder ab. Zwischen den PavA-produzierenden und den PavA-defizienten Pneumokokkenstämmen konnten signifikante Unterschiede bezüglich der Aktivierungseffizienz von DCs auf allogene T-Zellen bewiesen werden. Zytokinexpressions- und -produktionsmessungen zeigten bereits die PavA-abhängige Induktion bei Pneumokokken-stimulierte DCs (siehe 4.8.1). Der Effekt der gesteigerten Zytokininduktion konnte im Fall der *S. p. Δply*-stimulierten DCs nachgewiesen werden. Auch beim oxidativen Mitogenese Test konnte bei der Produktion von PavA eine erhöhte Aktivierung der T-Zellproliferation verglichen mit *S. p. ΔplyΔpavA* gemessen werden.

4.10 Funktionelle Analysen mit rekombinantem PavA

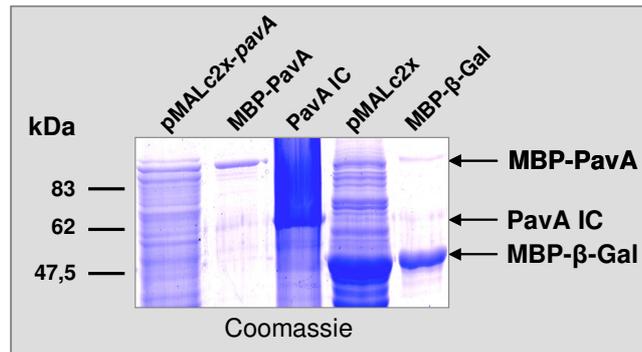
Bei der Interaktion von Pneumokokken mit APCs spielt, wie bisher gezeigt, der Virulenzfaktor PavA eine wichtige Rolle. Um die Funktion des PavA-Proteins bei der Phagozytose durch DCs und bei der Zytokinfreisetzung verstehen zu können, sollten *in vitro* Versuche mit nativ aufgereinigtem PavA durchgeführt werden.

4.10.1 Produktion des Fusionsproteins MBP-PavA

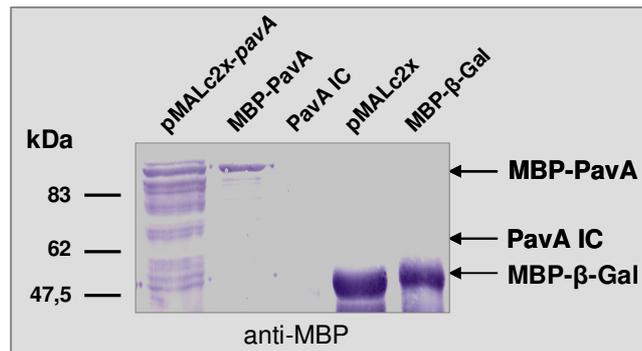
Das *pavA*-Gen wurde aus dem Expressionsplasmid pQE-30-*pavA* durch *Bam*HI- und *Pst*I-Restriktion geschnitten und in den Expressionsvektor pMALc2x (NEB) kloniert. Die in frame Klonierung im pMALc2x-*pavA* wurde durch eine Sequenzanalyse überprüft. Der pMALc2x-Vektor trägt die Sequenz für das Maltose-bindende Protein (MBP). Durch IPTG wurde die Transkription des Proteins in *E. coli* induziert. Dies führte zur Produktion von den löslichen Fusionsproteinen MBP und β -Galaktosidase (β -Gal) bzw. MBP-PavA. Die affinitätschromatografische Aufreinigung von MBP und des Fusionsproteins MBP-PavA wurde unter Verwendung einer Amylose-Säule durchgeführt. Nach der Affinitätsaufreinigung wurde das Protein weiter über eine Ionenaustauscherchromatographie gereinigt. Die Expression und die Reaktivität des Proteins wurden in einem Immunblot überprüft. Dazu wurden Gesamtzelllysate des *E. coli*s mit dem Plasmid pMalc2x bzw. pMALc2x-*pavA* nach der Induktion mit 0,3 mM IPTG und das gereinigte MBP-PavA Fusionsprotein in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Als PavA-Kontrolle wurde das unlösliche PavA-Protein der Größe 63 kDa aus

„Inclusion bodies“ (IC) von *E. coli* aufgetragen. Das aufgereinigte MBP-Protein konjugiert mit β -Gal zu einer Größe von 50,8 kDa wurde als MBP-Kontrolle eingesetzt. Auf einer Nitrocellulosemembran wurden die Proteine mit anti-PavA-Antikörper bzw. mit anti-MBP-Serum (NEB) und Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Der Farbnachweis erfolgte über die Entwicklung mit Chloronaphthol.

A



B



C

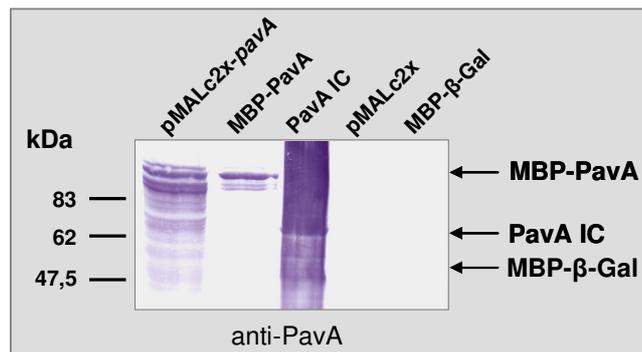


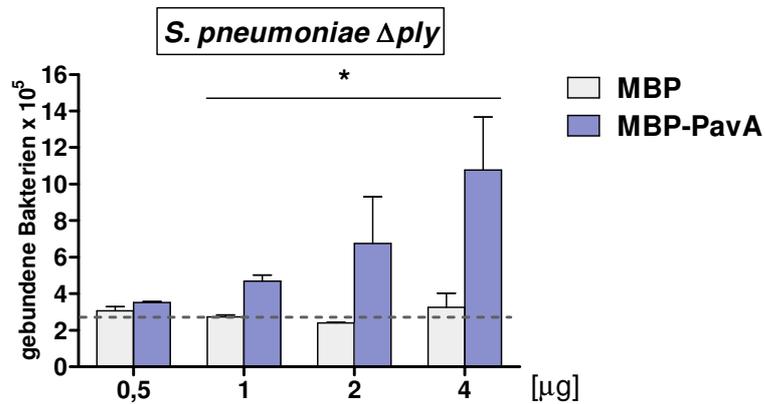
Abbildung 25: Nachweis der induzierten Expression von MBP-PavA und der Reaktivität mit anti-PavA und anti-MBP-Antiserum. Die Proben wurden in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue (A) angefärbt. Nach einem Membrantransfer auf Nitrocellulose wurden die Proteine mit anti-PavA IgG (1:200; B) bzw. anti-MBP-Serum in (1:5000; C) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper über Chloronaphtholentwicklung. Aufgetragen wurden *E. coli*-Lysat mit pMALc2x-pavA induziert mit IPTG, MBP-PavA (105,5 kDa), PavA aus IC (63 kDa), *E. coli*-Lysat mit pMALc2x induziert mit IPTG, MBP- β -Gal (50,8 kDa).

Die Coomassie-Färbung des aufgetrennten *E. coli*-Lysats der induzierten Kultur zeigte die Produktion des Fusionsproteins MBP-PavA in *E. coli* (Abbildung 25 A und B). Das Molekulargewicht ergab sich aus dem MBP-Protein der Größe 42,5 kDa und PavA der Größe 63 kDa zu 105,5 kDa. Das IPTG-induzierte *E. coli*-Lysat bewies die Translation des Kontrollproteins MBP- β -Gal. Das Kontrollprotein MBP lief in der SDS-PAGE bei 50,8 kDa, da es mit β -Galaktosidase fusioniert vorliegt. Das aus *E. coli*- „Inclusion bodies“ aufgereinigte PavA-Protein mit einem N-terminalen His₆-tag hat ein Molekulargewicht von 63 kDa. Die Detektion der Proteine im Immunblot erfolgte mit anti-PavA-Antikörper, der mit dem MBP-PavA-Fusionsprotein und dem 63 kDa Kontrollprotein PavA reagierte (Abbildung 25 C). Kein spezifisches Signal wurde beim induzierten Bakterienlysate für pMALc2x und beim aufgereinigten MBP-Protein erhalten. Die Detektion durch anti-MBP-Serum (Abbildung 25 C) zeigte keine Reaktion mit dem reinen 63 kDa PavA reagierte aber mit den induzierten Bakterienlysaten, MBP-PavA und MBP. Somit konnte die spezifische Reaktivität der eingesetzten Antikörper nachgewiesen werden. Für beide Antikörper wurde keine Kreuzreaktivität aufgezeigt.

4.10.2 Bindung von Pneumokokken an immobilisiertes MBP-PavA

In Bindungsstudien mit Pneumokokken sollte die Funktionalität des MBP-PavA-Fusionproteins untersucht werden. Dafür wurden unterschiedliche Proteinmengen immobilisiert. Als Kontrolle wurde außerdem das MBP-Protein zu gleichen Mengen eingesetzt. 1×10^7 FITC-markierte Pneumokokken wurden 37°C für 1 h mit den immobilisierten Proteinen inkubiert (siehe 7.6.1). Als Referenzwert für eine 100 prozentige Bindeeffizienz wurde die Gesamtfluoreszenz der eingesetzten Pneumokokken bei 485 nm im Fluoroscan ermittelt. Die absolute Bindung der Pneumokokken an die immobilisierten Proteine wurde nach dreimaligem Waschen bestimmt und mit dem 100% Wert ins Verhältnis gesetzt. Unspezifische Hintergrundsignale wurden rechnerisch von der ermittelten Bindung abgezogen.

A



B

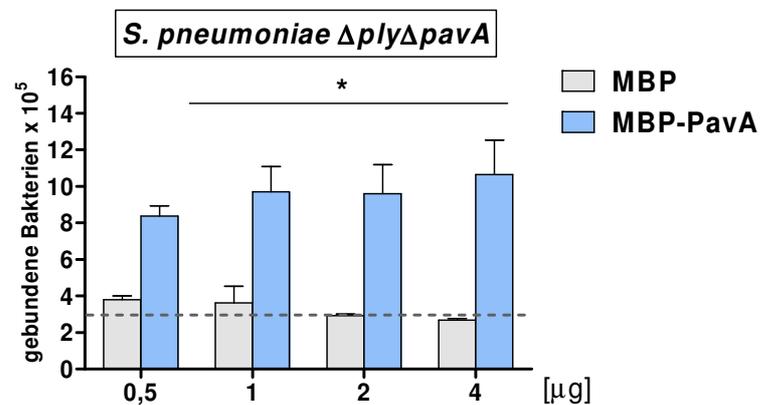


Abbildung 26: Bindung von Pneumokokken an immobilisierte MBP- und MBP-PavA Proteine. Aufgereinigte Proteine wurden in dargestellten Mengen (μg) immobilisiert, mit BSA geblockt und mit FITC-markierten Pneumokokkenstämmen *S. p. Δply* (A) und *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* (B) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzsignale wurden im Fluoroscan bei 485 nm gemessen und ausgewertet. Unspezifische Signale wird als graue perforierte Linie dargestellt. * $p \leq 0,02$

Die Bindung von *S. p. Δply* an MBP zeigte bei allen eingesetzten Proteinmengen keine erhöhte Assoziation an das Protein im Vergleich zur Hintergrundfluoreszenz (perforierte Linie, Abbildung 26 A, Tabelle 18). Bei 4 μg MBP-PavA wurde die höchste Bindung gemessen. Die Bindungswerte stiegen konzentrationsabhängig an. Bei *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* konnte schon eine spezifische Bindung bei 0,5 μg MBP-PavA-Protein nachgewiesen werden verglichen mit der Bindung an das MBP-Protein (Abbildung 26 B, Tabelle 18). Auch bei *S. p. Δply* konnte eine Proteinspezifität des Assoziationsverhaltens festgestellt

werden. Bei allen eingesetzten Proteinmengen von MBP unterschieden sich die Werte nicht signifikant voneinander.

| Proteinbe- handlung [μg] | <i>S. p. Aply</i> [$\times 10^6$] | | | <i>S. p. AplyΔpavA</i> [$\times 10^6$] | | |
|--|-------------------------------------|-----------------|------------------|--|-----------------|------------------|
| | MBP | MBP- PavA | <i>p</i> – Werte | MBP | MBP- PavA | <i>p</i> – Werte |
| - | 2,70 \pm 0,29 | | | 2,95 \pm 0,06 | | |
| 0,5 | 3,0 \pm 0,21 | 3,51 \pm 0,06 | 0,075 | 3,8 \pm 0,06 | 8,37 \pm 0,55 | 0,02 |
| 1 | 2,74 \pm 0,09 | 4,70 \pm 0,31 | 0,03 | 3,61 \pm 0,91 | 9,7 \pm 1,3 | 0,002 |
| 2 | 2,40 \pm 0,02 | 6,75 \pm 2,55 | 0,01 | 2,9 \pm 0,07 | 9,6 \pm 1,6 | 0,008 |
| 4 | 3,25 \pm 0,77 | 10,7 \pm 0,77 | 0,001 | 2,69 \pm 0,07 | 10,7 \pm 1,9 | 0,004 |

Tabelle 18: Quantifizierung der gebundenen Pneumokokken an immobilisiertes MBP- bzw. MBP-PavA-Protein. Die absoluten Bindungswerte wurden über die Messung der FITC-Fluoreszenz im Fluorocan bei 485 nm gemessen.

Diese Darstellung der Bindungseffizienzen von aufgereinigten MBP und MBP-PavA zeigten eine spezifische Assoziation von Pneumokokken an PavA im immobilisierten Zustand. Eine Bindung an MBP konnte unter dargestellten Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

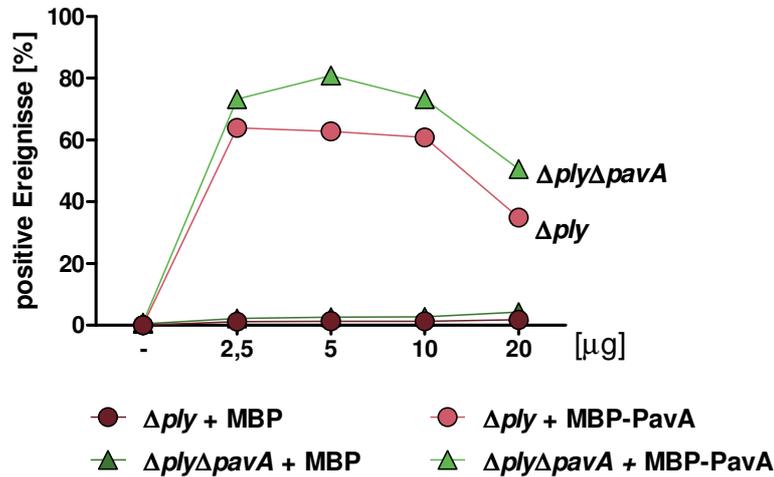
4.10.3 Bindung von löslichem MBP-PavA an Pneumokokken

Zur Aufklärung der Bindung von löslichem MBP-PavA an Pneumokokken wurden durchflusszytometrische Messungen nach der Antikörperdetektion von gebundenen Proteinen durchgeführt. Dafür wurden 5×10^6 *S. p. Aply* und *S. p. Aply Δ pavA* mit verschiedenen Proteinmengen von MBP bzw. MBP-PavA bei 37°C für 1 h inkubiert. Mit den Antiseren für MBP (NEB) bzw. für PavA und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Detektion der Proteine an Pneumokokken (siehe 7.6.2). Als Kontrollwert wurden unbehandelte Pneumokokken eingesetzt. Als Referenzwert wurde die unspezifische Hintergrundfärbung durch den Sekundärantikörper verwendet. Die quantitative Messung erfolgte im Durchflusszytometer.

Das lösliche MBP zeigte für alle eingesetzten Proteinmengen kein signifikant erhöhtes Fluoreszenzsignal der Pneumokokkenpopulation (Abbildung 27 A). Dagegen konnte die Bindung des löslichen MBP-PavA Die Detektion von MBP-PavA bei einer Menge von 2,5 μg eine Bindung von 63% bei *S. p. Aply* bzw. von 73% für *S. p. Aply Δ pavA* im Vergleich zu nicht inkubierten Pneumokokkenstämmen nachgewiesen werden. Der Maximalwert der Bindung von MBP-PavA an *S. p. Aply Δ pavA* lag bei 80% und konnte

nach der Inkubation mit 5 μg MBP-PavA gemessen werden (Abbildung 27 A und B). Hier lag der Bindungswert für *S. p. Δply* bei 63%. Bei höheren Proteinmengen konnte eine Bindungssättigung erfasst werden.

A



B

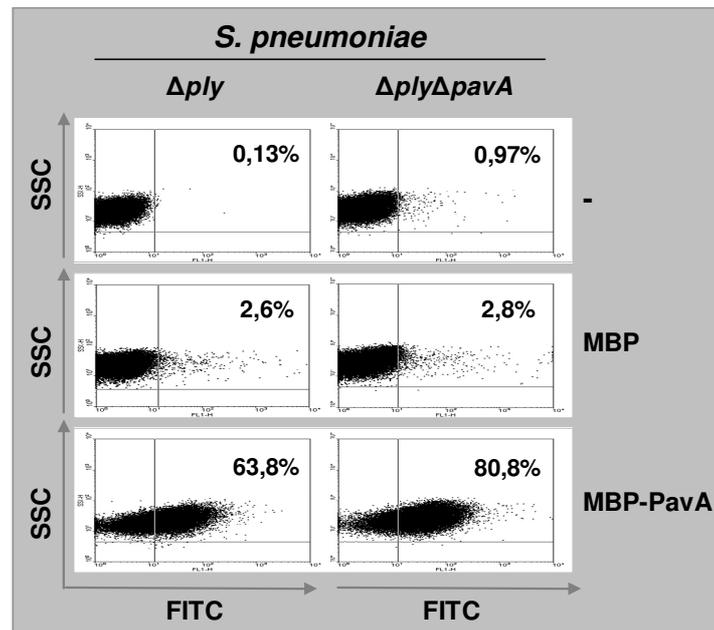


Abbildung 27: Bindungsstudien von löslichem MBP bzw. MBP-PavA an Pneumokokken. Die Bakterienstämme *S. p. Δply* und *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* wurden mit MBP bzw. MBP-PavA mit für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mit spezifischen Antisera für MBP bzw. PavA und FITC-gekoppelte Sekundärantikörpern und in der Durchflusszytometrie gemessen. Dargestellt wurde der Prozentsatz der positiv-gefärbten Ereignisse als Diagramm (A) bzw. als Punktwolkendiagramm (B) von repräsentativen Fluoreszenzmessungen. Gemessen wurden jeweils 10000 Ereignisse.

| Protein- menge [μ g] | <i>S. p. Δply</i> [%] | | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> [%] | |
|---------------------------------|---|----------|--|----------|
| | MBP | MBP-PavA | MBP | MBP-PavA |
| - | 0,03 | 0,13 | 0,43 | 0,97 |
| 2,5 | 1,19 | 63,94 | 2,18 | 73,26 |
| 5 | 1,3 | 62,79 | 2,61 | 80,87 |
| 10 | 1,33 | 60,86 | 2,78 | 73,28 |
| 20 | 1,76 | 34,85 | 4,28 | 50,64 |

Tabelle 19: Quantifizierung der Bindung von MBP bzw. MBP-PavA an Pneumokokken in der Durchflusszytometrie. Dargestellt wurde der Prozentsatz Fluoreszenz-positiver Ereignisse nach der Detektion von gebundenem MBP bzw. MBP-PavA.

Im Gegensatz zu MBP konnte bei MBP-PavA eine spezifische Bindung an Pneumokokken nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die Bindungsversuche, dass die MBP-PavA Assoziation an Pneumokokken bei bestimmten Proteinmengen in eine Sättigung übergeht und es mit steigendem Einsatz zu einer Verringerung der Bindungseffizienz kommt. Dieses unterstützt die Ergebnisse der Bindungsstudien mit immobilisierten MBP-PavA, wie vorher beschrieben wurde (siehe 4.10.2). Aufgereinigtes MBP-PavA konnte sowohl im immobilisierten als auch im löslichen Zustand spezifisch an Pneumokokken binden.

4.10.4 Bindung von löslichem MBP-PavA an APCs

Zur Aufklärung der funktionellen Rolle von PavA bei der Interaktion von Pneumokokken mit antigenpräsentierenden Zellen, wurde auch die Bindung an APCs mit rekombinanten MBP-PavA untersucht. Die Bindung des löslichen MBP-PavA zytometrisch analysiert. Dafür wurden 1×10^5 Zellen (J774 bzw. DCs) mit MBP bzw. MBP-PavA für 1 h inkubiert. Die Detektion der behandelten Zellen erfolgte mit der Inkubation mit den Antisera für MBP bzw. für PavA und mit FITC-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe 7.6.3). Unbehandelte Zellen wurden als Kontrollwert eingesetzt. Unspezifische Signale wurden als Hintergrundfärbung durch den Sekundärantikörper kalkuliert. Die Messung wurde mit der Aufnahme von 10000 Ereignissen durchgeführt.

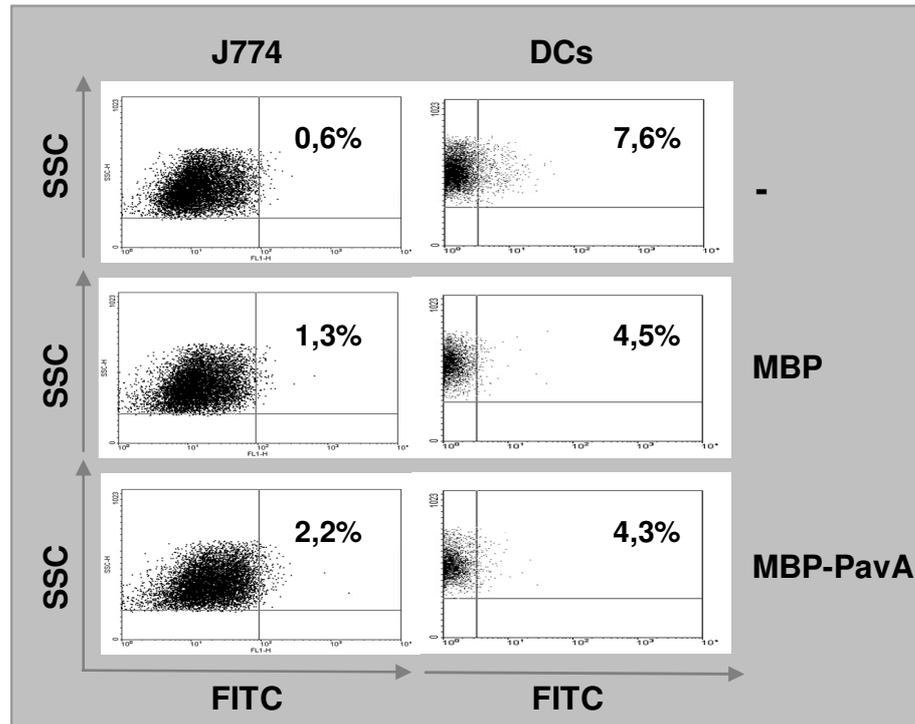


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Untersuchungen der Bindung von löslichem MBP-PavA an APCs. J774-Makrophagen und humane DCs wurden mit 5 µg MBP bzw. MBP-PavA inkubiert. Die Detektion der gebundenen Proteine erfolgte mit den Antisera für MBP bzw. PavA und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper. Nach Eingrenzung der Zellpopulation wurde die Fluoreszenzgrenze über die unspezifische Hintergrundfärbung des Sekundärantikörpers festgelegt. Die Verschiebung und die Prozentsätze der Punktwolken im positiven Bereich der Fluoreszenz stellen die Bindung der Proteine an die Zellen dar. Als Kontrolle wurden nicht präinkubierte Zellen mit Antikörpern behandelt.

Sowohl für MBP als auch für MBP-PavA-Inkubationen konnten in beiden Fällen der untersuchten Zellen keine signifikante Steigerung der Fluoreszenzsignale gemessen werden. Selbst mit der höchsten eingesetzten Proteinmenge von 20 µg konnte keine signifikante Bindung an die Zellen detektiert werden (Abbildung 28). Bei DCs wurden bereits ohne Proteininkubation 7,6% der Zellpopulation detektiert. Dieser Wert verringerte sich mit der MBP bzw. MBP-PavA Behandlung um ca. 3%. Nach der Inkubation mit 20 µg Proteinmenge wurde für MBP 4,3% und für MBP-PavA 4,5% fluoreszierende Ereignisse gemessen. Auch bei geringeren Mengen an Proteinen konnte keine effiziente Verschiebung der Punktwolken in den positiven Fluoreszenzbereich verzeichnet werden (Tabelle 20).

Im Gegensatz zur Assoziation von exogenen MBP-PavA an Pneumokokken konnte das lösliche MBP-PavA nicht an APCs wie Makrophagen und DCs binden.

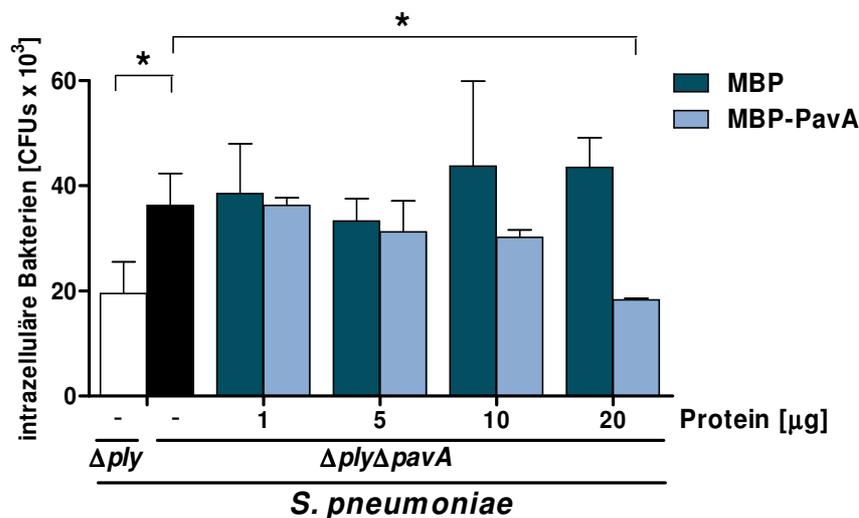
| Protein- menge [μg] | J774 [%] | | DCs [%] | |
|-------------------------------------|----------|----------|---------|----------|
| | MBP | MBP-PavA | MBP | MBP-PavA |
| - | 0,6 | 0,7 | 4,0 | 7,6 |
| 1 | 0,7 | 1,3 | 0,6 | 1,1 |
| 2 | 2,6 | 1,8 | 1,1 | 1,4 |
| 5 | 2,2 | 1,9 | 3,7 | 4,7 |
| 10 | 1,9 | 1,0 | 2,6 | 3,3 |
| 20 | 0,6 | 0,7 | 4,3 | 4,5 |

Tabelle 20: Zytometrische Quantifizierung der MBP bzw. MBP-PavA assoziierten Zellen. Dargestellt wurde der Prozentsatz positiver Ereignisse nach der Detektion von gebundenem MBP bzw. MBP-PavA an antigenpräsentierenden Zellen. Gemessen wurden pro Zellansatz 10000 Ereignisse.

4.10.5 Die Funktionalität von MBP-PavA bei *in vitro* Infektionen mit Pneumokokken und APCs

Zur weiteren Aufklärung der Funktionalität und physiologischen Rolle von MBP-PavA wurden *in vitro* Infektionsversuche mit Pneumokokken und antigenpräsentierenden Zellen unter exogener Zugabe von MBP-PavA durchgeführt. Dafür wurden 1×10^5 J774-Zellen und DCs mit Pneumokokken für 30 min infiziert. Bei der Proteinbehandlung wurde der Pneumokokkenstamm *S. p. $\Delta ply \Delta pavA$* mit MBP bzw. MBP-PavA für 1 h bei 37°C präinkubiert und für die *in vitro* Infektion standardgemäß eingesetzt (siehe 7.3.7). Extrazelluläre Pneumokokken wurden durch Antibiotikabehandlung abgetötet. Nach der Lyse der Zellen durch Saponin wurden überlebende intrazelluläre Pneumokokken auf Blutagarplatten nachgewiesen und quantifiziert.

A



B

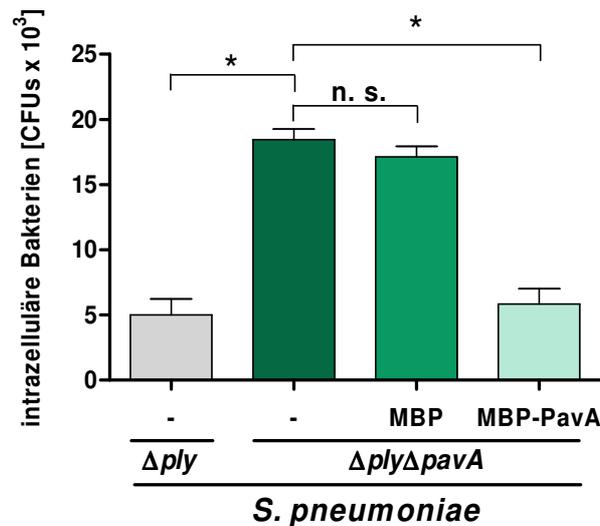


Abbildung 29: Einfluss von MBP-PavA auf die Aufnahme von Pneumokokken in APCs. Bei den Antibiotika-Protektions-Versuchen wurden J774-Zellen und DCs mit *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* für 30 min infiziert. Der Stamm *S. p. ΔplyΔpavA* wurde mit dargestellten Proteinmengen von MBP bzw. MBP-PavA bei den J774-Infektionen (A) und bei DC-Infektionen mit 20 µg Protein (B) für 1 h präinkubiert. Dargestellt wurde die CFU-Anzahl intrazellulärer Bakterien. Die Abkürzung n. s. steht für nicht signifikante Unterschiede. **p*-Wert < 0,02

Bei der J774-Infektion konnte wiederum die gesteigerte Aufnahmerate der *S. p. ΔplyΔpavA* Mutante im Vergleich zum PavA-produzierenden Pneumokokkenstamm *S. p. Δply* demonstriert werden (Abbildung 29 A, siehe 4.4.2). Mit $36,3 \times 10^3$ CFUs wurde die *pavA*-Mutante doppelt so stark internalisiert als der Kontrollstamm (Abbildung 29 A). Die Präinkubation der Pneumokokken mit MBP führte zu einer leicht gesteigerten Aufnahme von 17% bei 20 µg im Vergleich zu unbehandelten Pneumokokken. Aufgrund der hohen Standardabweichung sind diese Unterschiede nicht signifikant. Die Inkubation mit MBP-PavA jedoch zeigte eine Erniedrigung der bakteriellen Internalisierungsrate durch Makrophagenzellen. Mit 20 µg MBP-PavA wurden sogar nur noch eine 50% verringerte Internalisierung der *pavA*-Mutante im Vergleich zu unbehandelten Pneumokokken nachgewiesen. *S. p. ΔplyΔpavA* erreichte somit die Ebene von *S. p. Δply*. Die DC-Infektionen zeigten eine ähnliche Tendenz (Abbildung 29 B). Hier wurde die *pavA*-Mutante um einen Faktor von 3,7 stärker aufgenommen als der Kontrollstamm *S. p. Δply* (Abbildung 29 B, siehe 4.4.2). Die Präinkubation der Pneumokokken mit 20 µg MBP zu keinem signifikanten Unterschied im Aufnahmepattern von *S. p. ΔplyΔpavA*. Die Präinkubation der Pneumokokken mit 20 µg MBP-PavA reduzierte sich die

Internalisierung von *S. p. ΔplyΔpavA* um 66% im Vergleich zu unbehandelten Pneumokokken. Dies entsprach fast dem Aufnahmelevel des PavA-produzierenden Stammes *S. p. Δply*.

| Proteinmenge [μg] | <i>S. p. Δply</i> [CFU x 10 ³] | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> [CFU x 10 ³] | | <i>p</i> -Werte |
|----------------------|---|---|--------------|-----------------|
| | | MBP | MBP-PavA | |
| J774-Makrophagen | | | | |
| - | 19,5 ± 6 | 36,3 ± 6,1 | | |
| 1 | | 38,5 ± 9,5 | 36,3 ± 1,4 | |
| 5 | | 33,3 ± 4,3 | 31,23 ± 5,9 | |
| 10 | | 43,7 ± 16,2 | 30,23 ± 1,4 | |
| 20 | | 43,5 ± 5,7 | 18,33 ± 0,29 | |
| DCs | | | | |
| - | 4,99 ± 1,4 | 18,4 ± 0,29 | | 0,0001 |
| 20 μg | | 16,6 ± 1,5 | 6,39 ± 1,9 | 0,0076 |

Tabelle 21: Quantifizierung internalisierter Pneumokokken in APCs unter Einfluss von MBP-PavA. *S. p. ΔplyΔpavA* wurde mit MBP bzw. MBP-PavA in angegebenen Mengen für 1 h präinkubiert.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die gesteigerte Aufnahmerate der PavA-deletierten Mutante durch die Zugabe von nativem MBP-PavA wieder auf den Aufnahmelevel des Kontrollstammes gesenkt und somit dieser Effekt komplementiert werden konnte. Da die Zugabe von MBP zu keiner veränderten Phagozytose der Pneumokokken führte, lag der Komplementationseffekt durch exogenes MBP-PavA der spezifischen Funktionalität des PavA-Proteins zugrunde.

4.10.6 Einfluss von MBP-PavA auf die Zytokinfreisetzung von Pneumokokken-stimulierten DCs

Zur Aufklärung weiterer physiologischer Funktionen von PavA neben der Protektionsfunktion vor Erkennung und Aufnahme durch Immunzellen, wurde der Einfluss von MBP-PavA auf die Zytokinproduktion von DCs stimuliert durch Pneumokokken untersucht. Dafür wurden DCs mit *S. p. Δply* und *S. p. ΔplyΔpavA* unter standardisierten Bedingungen 30 min infiziert, extrazelluläre Bakterien abgetötet und für weitere 18 h inkubiert. *S. p. ΔplyΔpavA* wurde mit 20 μg MBP bzw. MBP-PavA für 1 h vor der Infektion von DCs versetzt. Nach der 18-stündigen Aktivierung der DCs wurden die Überstände der behandelten Zellen gesammelt und die Zytokinkonzentration von sekretierten IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN-γ, und TNF-α zytometrisch mittels der

Luminex-Technologie bestimmt. Durch die exogene Zugabe von 20 μg MBP bzw. MBP-PavA konnte in den *in vitro* Infektionsversuchen mit DCs und J774-Zellen die gesteigerte Aufnahmerate der *pavA*-Mutante auf geringere Internalisierungsrate des Kontrollstammes *S. p. Δply* verringert (Abbildung 29). Somit wurde bereits bewiesen, dass PavA eine spezifische Rolle während der Interaktion zwischen Pneumokokken und antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems spielt. Außerdem wurde in vorherigen Zytokinmessungen von infizierten DCs die Induktion von höheren Mengen der analysierten Zytokinen nach der Stimulierung mit dem PavA-produzierenden Pneumokokkenstamm *S. p. Δply* im Vergleich zu dem PavA-defizienten Mutantenstamm *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* bewiesen (Abbildung 23).

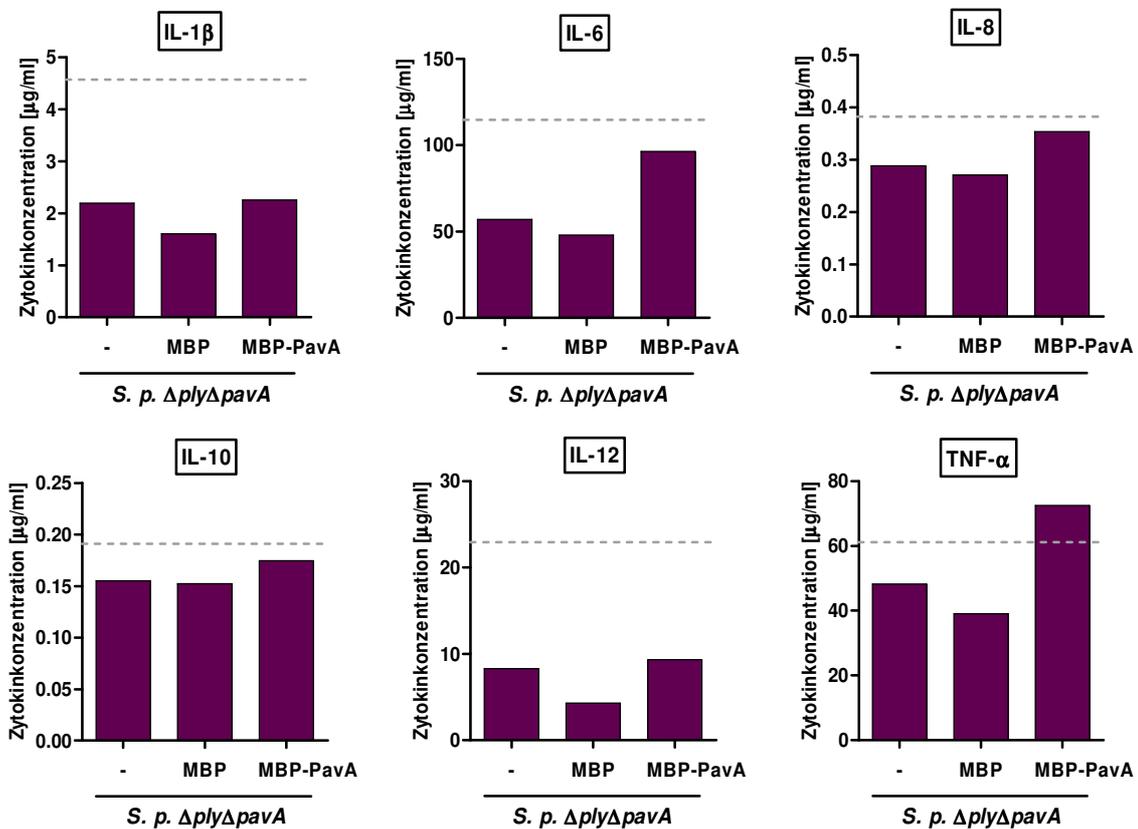


Abbildung 30: Zytokinsekretion von Pneumokokken-stimulierten DCs unter Einfluss von MBP-PavA. DCs wurden mit *S. p. Δply* und *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* infiziert und nach Antibiotikabehandlung für weitere 18 h stimuliert. Der Stamm *S. p. $\Delta ply\Delta pavA$* wurde zusätzlich mit 20 μg MBP bzw. MBP-PavA für 1 h präinkubiert. Die Zytokinmessung erfolgte über Fluoreszenzdetektion von IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ und TNF- α mit Hilfe der Luminex-Technologie. Die Zytokinmenge induziert durch *S. p. Δply* wird als perforierte graue Linie dargestellt.

Die Präinkubation von *S. p. ΔplyΔpavA* mit MBP zeigte für alle Zytokine gleich bleibende bzw. leicht erniedrigte Mengen im Vergleich zu unbehandelten Pneumokokken (Abbildung 30). Die MBP-PavA Behandlung der Pneumokokken jedoch zeigte aber vor allem bei IL-6, IL-8 und TNF- α eine Erhöhung der induzierten Zytokinmenge im Infektionsüberstand der stimulierten DCs. Mit induzierten 96,48 ng/ml IL-6 bei MBP-PavA behandelten Pneumokokken näherte sich die Zytokinmenge an die induzierten 125,93 ng/ml des Kontrollstammes *S. p. Δply* an und stellte im Vergleich zu unbehandelten *S. p. ΔplyΔpavA* eine Steigerung von 70% dar (Tabelle 22). Diese Tendenz wurde auch bei IL-8 beobachtet. Mit 288,36 ng/ml und 270,87 ng/ml für unbehandelte und MBP-behandelte *S. p. ΔplyΔpavA* wurde mit MBP-PavA 353,49 ng/ml an IL-8 ausgeschüttet. Bei der Stimulierung durch *S. p. Δply* konnte 381,73 ng/ml gemessen werden. Die TNF- α Produktion nach MBP-PavA-Inkubation von *S. p. ΔplyΔpavA* erhöhte sich um 38% von 48,22 ng/ml auf 72,56 ng/ml und übertraf somit den Wert von 71,83 ng/ml für *S. p. Δply*.

| Zytokine | <i>S. p. Δply</i> (Linie) | <i>S. p. ΔplyΔpavA</i> [ng/ml] | | |
|---------------|---------------------------|--------------------------------|--------|----------|
| | | - | MBP | MBP-PavA |
| IL-1 β | 4,56 | 2,19 | 1,61 | 2,26 |
| IL-6 | 125,93 | 56,99 | 47,88 | 96,48 |
| IL-8 | 381,73 | 288,36 | 270,87 | 353,49 |
| IL-10 | 0,198 | 0,155 | 0,152 | 0,175 |
| IL-12 | 27,16 | 8,31 | 4,28 | 9,33 |
| TNF- α | 71,83 | 48,22 | 39,13 | 72,56 |

Tabelle 22: Zytokinkonzentration nach DC-Stimulierung in Abhängigkeit von MBP-PavA. Die Menge an sekretierten Zytokinen wurde als ng/ml angegeben.

Im Fall der erläuterten Zytokinen IL-6, IL-8 und TNF- α konnte wie bei *in vitro* Infektionsversuchen auch hier durch die Zugabe von MBP-PavA der Effekt der PavA-Mutante komplementiert werden.

5 Diskussion

Streptococcus pneumoniae ist ein kommensales Bakterium und kommt bei 70 % der Normalbevölkerung im menschlichen Organismus vor. Pneumokokken besiedeln asymptomatisch die Schleimhäute des oberen bzw. unteren Respirationstraktes. Diese Bakterien sind wichtige Erreger von Atemwegsinfektionen und können darüber hinaus auch lebensbedrohliche invasive Erkrankungen, wie eine ambulant erworbene Pneumonie, Meningitis und Sepsis auslösen. Bakterielle *S. pneumoniae*-Infektionen werden in der Regel mit Penicillin therapeutisch behandelt. Ein grundlegendes weltweites Problem dieser Therapie sind die ansteigenden Isolate mit Antibiotikaresistenzen. Pneumokokken entwickelten aufgrund ihrer natürlichen Transformierbarkeit vielfältige Penicillin bzw. multiresistente pathogene Varianten, deren Ausbreitung durch alternative Therapiemöglichkeiten eingedämmt werden muss. Zur Entwicklung von neuen therapeutischen Maßnahmen ist die Erforschung der grundlegenden Pathogenitätsstrategien der Pneumokokken im Detail unverzichtbar. Zur Kolonisierung des Wirtes interagieren Pneumokokken mit Zellen verschiedener Gewebearten. Für das Vordringen in tieferes Gewebe adhären die Pneumokokken mit Epithelien und Endothelien. In der Peripherie des Organismus stellen diese Zellen eine strukturelle Barriere für die Bakterien dar. Pneumokokken benutzen bestimmte Pathogenitätsstrategien, um in die Zellen einzudringen und über Transzytose den Zugang zu submukosalen Gewebestrukturen zu bekommen. Durch diesen Mechanismus können Pneumokokken auch den Blutstrom erreichen. Neben der Adhärenz an die gewebsspezifischen Zellen interagieren Pneumokokken während ihrer Ausbreitung im humanen Organismus mit Zellen des angeborenen Immunsystems. Phagozytisch potente Zellen stellen eine starke immunologische Barriere dar, die auf die Identifizierung und Vernichtung von Fremdkörpern spezialisiert sind. Dendritische Zellen (DCs) gelten als wichtigste Vertreter dieser antigenpräsentierenden Zellen und sind großflächig in der Gewebepерipherie verteilt. Aufgrund ihrer vielseitigen immunologischen Funktionen stellen DCs ein innovatives Werkzeug für immuntherapeutische Maßnahmen dar. Bei der Ausbreitung von Pneumokokken ist eine Begegnung mit diesen Zellen unausweichlich. Pneumokokken müssen zur erfolgreichen Dissemination den zellulären Abwehrmechanismen des Körpers entgehen. Einige pathogene Bakterien verwenden bestimmte Strategien um ihre unerkannte Kolonisierung des Wirtsorganismus zu ermöglichen. *Mycobacterium tuberculosis* und

Leishmania amastigote sind fähig, dendritische Zellen für ein optimales Überleben und eine große Ausbreitung im Wirtsorganismus zu nutzen (Tailleux *et al.*, 2003; Geijtenbeek *et al.*, 2003; Colmenares *et al.*, 2002). Diesbezüglich ist bei Pneumokokken bisher kein bestimmter Mechanismus bekannt. Stark immunogene bakterielle Substanzen wie das Toxin Pneumolysin oder die Oberflächenproteine PspA, PspC, und PsaA konnten bei Pneumokokken identifiziert und charakterisiert werden (Malley *et al.*, 2003, McDaniel *et al.*, 1994, Iannelli *et al.*, 2004, Tseng *et al.*, 2002). Die Kapselpolysaccharide von Pneumokokken wurden als eingeschränkt immunologisch-aktivierend charakterisiert. Für die Vakzinierung gegen *S. pneumoniae*-Infektionen werden Kapselpolysaccharide eingesetzt, die im neusten Impfstoff, dem Prevnar™ mit einem stark immunogen wirkenden bakteriellen Toxin, dem Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae*, konjugiert verabreicht werden. Das Toxin verstärkt die immunologische Reaktion im Organismus und gewährleistet somit eine langfristige adaptive Immunantwort mit der Spezifität für *S. pneumoniae*-Kapselpolysaccharide. Für die Entwicklung des Vakzins Pneumovax™ (Merck Research Laboratories, USA) wurden aufgereinigte Kapselpolysaccharide von 23 der am häufigsten vorkommenden *S. pneumoniae*-Serotypen vereint. Die hohe Diversität der Kapselzusammensetzung unter den pathogenen Pneumokokkenstämmen kann hierbei nur bedingt abgedeckt werden. Eine Zunahme des auftretenden Austauschs von Serotypen innerhalb der Pneumokokkenstämmen führt zu einer erniedrigten Immunisierungseffizienz des Impfstoffes Prevnar™ (Albrich *et al.*, 2007). Zur therapeutischen Prävention von Pneumokokkeninfektionen sollten demnach effizientere Maßnahmen, die eine hohe immunologische und langfristige Protektion bieten, entwickelt und eingesetzt werden. Somit ist die Identifizierung und Charakterisierung von konservierten immunogenen Strukturen bei Pneumokokken für eine alternative Vakzinentwicklung von großem Interesse.

Durch die Produktion von Virulenzfaktoren werden Kolonisierungs- und Invasionsstrategien der Pneumokokken ermöglicht. Für *S. pneumoniae* wurde eine Vielzahl an Faktoren bestimmt, die essentiell für die Virulenz und Pathogenität der Bakterien sind. Über Oberflächenstrukturen interagieren Pneumokokken spezifisch mit Rezeptoren der eukaryotischen Wirtszellen und induzieren durch spezielle Mechanismen die Transzytose durch die Zellen. Die Funktionalität von Adhäsinen ist hierbei essentiell. Für *S. pneumoniae* konnten das Cholin-bindende Protein PspC und das Phosphorylcholin

als Adhäsine identifiziert werden. Außerdem nutzen Pneumokokken die Rekrutierung von extrazellulären Matrixproteinen und Serumbestandteilen zur Anlagerung an Wirtszellen. Interaktionen der Pneumokokken mit Faktor H, Thrombospondin, Laktoferrin, Plasminogen und Fibronectin konnten bislang nachgewiesen werden (Hammerschmidt *et al.*, 2007, Rennemeier *et al.*, 2007, Hammerschmidt *et al.*, 1999, Bergmann *et al.*, 2001, Holmes *et al.*, 2001). Die Bindung von PspC an Faktor H erhöht die Adhärenz an und die Invasion in humane Epithel- und Endothelzellen, außerdem erhöht es die Virulenz der Pneumokokken in Mausinfektionsversuchen (Hammerschmidt *et al.*, 2007; Quin *et al.*, 2007). PspA kann das humane Eisen-Transporterprotein Laktoferrin binden, es aber nicht als Eisenquelle nutzen (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Die Expression von PspA blockiert den bakteriziden Effekt des Apo-Laktoferrins, indem es durch deren Bindung das aktive Zentrum des reduzierten Laktoferrins besetzt (Shaper *et al.*, 2004). Die Bindung von Plasmin(ogen) über die Enolase an Pneumokokken führt zu einer erhöhten Degradation der extrazellulären Matrix, zum Auflösen von Fibrin und zur Transmigration der Pneumokokken (Bergmann *et al.*, 2005). Ein wichtiges Oberflächenprotein, das zur Kolonisierung und Virulenz von *S. pneumoniae* beiträgt und außerdem Fibronectin bindet, ist das PavA-Protein. Für PavA konnte bis heute noch keine definierte biologische Funktion aufgezeigt werden. Bei PavA handelt es sich um ein hoch konserviertes Protein von *S. pneumoniae*, das einen starken und bedeutenden Einfluss auf die Pathogenität von Pneumokokken im Maus-Meningitis und Sepsis-Modell hat (Pracht *et al.*, 2005).

DCs stellen aufgrund ihrer vielseitigen Funktionalität und Fähigkeit, auf effiziente Art und Weise das angeborene Immunsystem mit dem adaptiven Immunsystem zu verbinden, in der heutigen Immuntherapie ein wichtiges Werkzeug dar. Die *ex vivo* Stimulierung der Zellen durch bestimmte Zielantigene regt die Zelle zur Ausreifung und Antigenpräsentation an. Die Injektion der stimulierten Zellen führt in lymphoiden Organen zur Aktivierung der langfristigen adaptiven Immunantwort. Durch diese Therapie kann gegen eine Ausbreitung von bakteriellen als auch viralen Krankheitserregern vorgesorgt werden. In der Krebstherapie wird diese immunologische Bekämpfungsmethode für bestimmte Krebsarten bereits erfolgreich angewendet. Zur Entwicklung einer alternativen Immuntherapie durch DCs für *S. pneumoniae*-Erkrankungen müssen die grundlegenden Pathogenitätsmechanismen von Pneumokokken aufgeklärt und die daran beteiligten Faktoren im Detail identifiziert werden. Die Wirkung einzelner bakterieller Strukturen auf

die Zellen des angeborenen Immunsystems muss zur Aufklärung der Virulenzstrategien von Pneumokokken detailliert und fokussiert untersucht werden. Dabei spielt eine mögliche Beteiligung von wichtigen Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* eine bedeutende Rolle.

5.1 Bedeutung der Kapsel und die Rolle von Pneumolysin für die Erkennung von *S. pneumoniae* durch das angeborene Immunsystem

Die Produktion des Kapselpolysaccharids ist für die Virulenz von *S. pneumoniae* essentiell. Die Zusammensetzung dieser Strukturen ist unter den Stämmen hoch divergent (>90 Serotypen). Alle bisher isolierten virulenten Stämme weisen eine Bekapselung ihrer Oberfläche auf (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Die Erkennung von *S. pneumoniae* durch das immunologische Komplementsystem wird dadurch vermindert und die Kapsel schützt somit vor der Opsonophagozytose durch Makrophagen. Auf der anderen Seite wird durch die Kapsel die Anheftung an Zielzellen des Wirtsgewebes verhindert (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Zur Gewährleistung der erfolgreichen Kolonisierung variieren Pneumokokken ihren Kapselphänotyp von opaque zu transparent (Kim and Weiser, 1998). Oberflächenadhäsine werden somit für die Interaktion mit Wirtszellen lokal am Wirkungsort zugänglich gemacht. In der Peripherie des Gewebes befinden sich neben den Zielzellen auch phagozytierende Zellen des angeborenen Immunsystems, was zwangsläufig zu einem Kontakt zwischen Pneumokokken und Immunzellen führt. Mittels *in vitro* Infektionsstudien konnte bei der Interaktion von *Neisseria meningitidis* mit DCs bei einer starken Bekapselung der Bakterien eine verminderte Aufnahme in die Zellen nachgewiesen werden (Unkmeir *et al.*, 2002). Zur vollständigen Aufklärung der Kolonisierungsstrategien von Pneumokokken im humanen Organismus sollte der Einfluss der Kapsel auf die Interaktion mit humanen dendritischen Zellen bzw. murinen Makrophagenzellen untersucht werden. In Infektionsversuchen wurden isolierte Stämme mit unterschiedlich modulierten Kapselpolysacchariden eingesetzt. Eine vollständige Entfernung der Kapsel und somit die Herstellung isogener Kapselmutanten erfolgte durch die Deletion des Kapselgenlokus bei Pneumokokken. Die Defizienz des Kapselgenkomplexes konnte molekularbiologisch in der PCR und im Southern Blot als auch physiologisch mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen nachgewiesen werden. Die *in vitro* Infektionsversuche zeigten drastische Unterschiede zwischen den getesteten *S. pneumoniae* Stämmen bei der Aufnahme durch DCs bzw. Makrophagen. Die

Produktion der Kapsel führte zu einer verminderten Interaktion und Internalisierung der Pneumokokken durch phagozytierende Zellen. Phagozytierende Zellen können die Oberfläche von Pneumokokken nicht über Polysaccharidstrukturen erkennen. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die zellulären Rezeptoren der Zelle mit bakteriellen Strukturen interagieren, die durch die Kapsel maskiert werden. Damit wird die Bindung und Erkennung der bekapselten Pneumokokken verhindert. Dennoch wurde nachgewiesen, dass aufgereinigte Kapselpolysaccharide über den Makrophagen Mannose Rezeptor (MR) an DCs gebunden, über Aktinfilamentumgestaltungen in die DCs aufgenommen und intrazellulär an MHC-Klasse II Moleküle in lysosomalen Kompartimenten der Zellen gekoppelt werden konnten (Zamze *et al.*, 2002; Meltzer und Goldblatt, 2006). Der Mannose Rezeptor wird von vielen Gewebsmakrophagen und DCs produziert und gilt als ein wichtiges Rezeptormolekül, das die Phagozytose von vielen Mikroorganismen wie Pilzen, Hefe, Protozoen und Bakterien in Zellen des angeborenen Immunsystems induziert (Stahl und Ezekowitz, 1998; Pontow *et al.*, 1992; Linehan *et al.*, 1999; Sallusto *et al.*, 1995). Die Erkennung der bakteriellen Polysaccharide und die Bindung an den Mannoserezeptor sind von der Struktur der Zucker unabhängig. Die Konfirmation der Polysaccharide von Pneumokokken ist hierbei essentiell (Zamze *et al.*, 2002). Isolierte Kapselpolysaccharide der *S. pneumoniae* Serotypen 1, 6B, 9N, 14, 19F und 23F konnten in diesem Zusammenhang als nicht immunogen eingestuft werden, da die Aktivierung des adaptiven Immunsystems ausblieb (Meltzer und Goldblatt, 2006). Mit einem zweiten immunogenen Stimulus wie dem Lipopolysaccharid (LPS) von *E. coli* konnte eine Ausreifung und Aktivierung durch DCs erzielt werden. Die Kapselpolysaccharid- und LPS-Stimulierung von DCs führte zu einer induzierten IL-12/IL-10 Freisetzung. Im Vergleich zur LPS-Stimulierung induzierten die Kapselpolysaccharide zusammen mit LPS eine verstärkte IL-10-Ausschüttung durch DCs, was die Antikörperproduktion durch die B-Zellaktivierung unterstützt (Meltzer und Goldblatt, 2006). Die Art der Stimuli ist essentiell für die Modulation der adaptiven Immunantwort. Die Kapsel besitzt im frühen Stadium der Pneumokokkeninfektion eine schützende Funktion gegenüber der Phagozytose durch DCs und Makrophagen. Die Interaktion der Kapselpolysaccharide von Pneumokokken und DCs bzw. Makrophagen über den Mannoserezeptor der Zellen reicht für die Induktion der vollständigen Ausreifung von DCs und somit der Aktivierung des adaptiven Immunsystems nicht aus. Die Erkennungsmaschinerie von Pneumokokken durch DCs

bzw. Makrophagen muss also zusätzlich durch andere bakterielle Oberflächenstrukturen induziert werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten geringere Mengen an Kapselproduktion bei *S. pneumoniae*, die im engen Kontakt mit Wirtszellen stehen (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Dadurch werden an der Adhärenz beteiligte Strukturen von Pneumokokken zur Interaktion mit den Wirtszellen frei zugänglich gemacht. Aufgrund der nahen peripheren Lokalisation der DCs können hier weniger bekapselte Pneumokokken und Kapselbestandteile durch die DCs phagozytiert werden. Die Induktion des Immunsystems ist in dieser Phase der Kolonisierung der Pneumokokken durch die Phagozytose von Kapselpolysacchariden nicht akut notwendig. Beim Fortschreiten und bei der Ausweitung der Infektion bedarf es zur Induktion einer langfristigen Immunantwort eines weiteren bakteriellen Stimulus. Aufgrund der Persistenz der kommensalen *S. pneumoniae* Stämme, die auf den Schleimhäuten des oberen und unteren Respirationstraktes vorkommen und die auch Kapselpolysaccharide exprimieren, würde bei einer höheren Empfindlichkeit der Immunsystemstimulierung durch DCs der Organismus einer ständigen Proinflammation ausgesetzt sein. Die Durchführung von *in vitro* Infektionsversuchen mit phagozytierenden Zellen erlaubt aufgrund der antiphagozytischen Wirkung der Kapsel das Einbeziehen der modulierbaren Kapselproduktion der Pneumokokken während einer *in vitro* Infektion nicht. Aus diesem Grund können stark bekapselte Stämme in Interaktionsstudien nicht eingesetzt werden, da dies zu keiner erkennbaren Assoziation von Bakterien und Zellen führen würde. Um dennoch die physiologische Rolle der Kapsel bei Infektionsstudien von *S. pneumoniae* und DCs bzw. Makrophagen zu berücksichtigen, wurde der schwach bekapselte Pneumokokkenstamm NCTC10319 des Serotyps 35A als Modellstamm eingesetzt.

Die ausgeprägte Virulenz von *S. pneumoniae* lässt sich in vielen Bereichen der Kolonisierung des Wirtes auf die Wirksamkeit des zelllytischen Toxins Pneumolysin zurückführen. Pneumolysin induziert die Porenbildung in Zellmembranen und schädigt über die Bindung mit Cholesterol das für Pneumokokken zu überwindende Gewebe (Boulnois *et al.*, 1991). Es wird angenommen, dass das intrazelluläre Toxin der Pneumokokken in der stationären Wachstumsphase durch das bakterielle autolytische Enzym LytA freigesetzt wird (Paton *et al.*, 1993). Einige Studien zeigten allerdings auch eine LytA-unabhängige Sekretion in die extrazelluläre Umgebung, dessen Mechanismus bisher noch nicht näher aufgeklärt wurde (Balachandran *et al.*, 2001). Durch die lytische

Schädigung der Wirtszellen wird das Vordringen in tiefere Gewebeschichten oder in den Blutkreislauf gewährleistet. In bereits stark geschädigtem Gewebe werden durch Pneumolysin Neutrophile zur Produktion oxygener Radikale angeregt, die intrazellulär die Zersetzung der Zellen induzieren (Martner *et al.*, 2008). Außerdem wird durch Pneumolysin die Infiltration und Migration von Neutrophilen in infiziertes Gewebe verringert (Paton und Ferrante, 1983). Beim Kontakt zu DCs löst die Pneumolysinproduktion eine Caspase-abhängige Apoptoseinduktion aus (Colino und Snapper, 2003). Die entstandenen apoptotischen Vesikel können wiederum durch andere phagozytische Zellen internalisiert werden und die Zellen des angeborenen Immunsystems aktivieren. Somit gewährleistet der Organismus trotz der Eliminierung von DCs durch die bakteriell induzierte Apoptose- bzw. Nekrose eine langfristige Immunantwort durch die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Pneumolysin induziert direkt über den Toll-like Rezeptor 4 (TLR-4) von humanen Monozyten die Produktion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6, Interleukin-1 β und den Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Houldsworth *et al.*, 1994; Malley *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurde die Apoptoseinduktion durch Pneumolysin-defiziente bzw. -produzierende Pneumokokken bei DCs unter den *in vitro* Versuchsbedingungen untersucht. Die Infektionsversuche zeigten unabhängig von der Pneumolysinproduktion erhöhte Apoptose- bzw. Nekroseraten nach einer 2-stündigen Infektion. Da die prozentualen Werte der zelltodinduzierten Zellen sowohl bei Wildtyp-Pneumokokken als auch bei der Δply -Mutante vergleichbar waren, muss von einem Toxin-unabhängigen Induktionsmechanismus bei DCs ausgegangen werden. Das Ausbleiben des Zelltods bei kürzeren Infektionen bewies die Zeitabhängigkeit der Pneumolysinaktivität bei intakten Bakterien. Da es sich bei Pneumolysin ausschließlich um ein intrazelluläres Toxin handelt, muss bei extrazellulärer apoptotischer Wirkung auf die DCs die Sekretion durch die Autolyse von Pneumokokken bzw. durch einen alternativen Sekretionsweg gewährleistet sein. Die Freisetzung von Pneumolysin blieb hier wahrscheinlich bis zu 2 h der Infektion von DCs mit Pneumokokken vollständig aus oder die sekretierte Menge an Pneumolysin war zu gering, da es zu keiner spezifischen und Pneumolysin induzierten Apoptoseinduktion bei den DCs kam.

In der frühen Phase der Pneumokokkeninfektion erfolgte keine Apoptoseinduktion bei den DCs durch Pneumolysin. In den *in vitro* Assoziationsstudien dieser Arbeit konnten bei kurzen Infektionszeiten keine signifikanten Unterschiede zwischen der isogenen

ply-Mutante und den Wildtyp-Pneumokokken in der bakteriellen Adhärenz bzw. Aufnahme von Pneumokokken gemessen werden. Die Produktion von Pneumolysin hatte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Interaktion von Pneumokokken mit DCs. So kann angenommen werden, dass erst im späteren Verlauf der Kolonisierung, bei lokaler Vermehrung und der Induktion der Autolyse der Pneumokokken das Toxin freigesetzt wird. Die zelllytische Funktion von Pneumolysin wird dann nach der Freisetzung des Toxins im Gewebe aktiv. Für die Standardisierung der Infektionsversuche wurde in Hinblick auf die Bedeutung anderer wichtiger Virulenzfaktoren der Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenstamm NCTC10319 Δ *ply* (*S. p. \Delta**ply*) verwendet.

5.2 Die Rolle von PavA bei der Identifizierung von *S. pneumoniae* durch Immunzellen

Für die Interaktion mit Epithel- und Endothelzellen wurde das Fibronectin-bindende Protein PavA von *S. pneumoniae* als wichtiger Virulenzstruktur beschrieben. In den *in vivo* Infektionsversuchen wurde bei der *pavA*-Pneumokokkenmutante im Vergleich zum PavA-produzierenden Stamm eine um 10^4 -fach reduzierte Virulenz im Sepsis-Mausmodell nachgewiesen (Holmes *et al.*, 2001). Diese Attenuation ist im Vergleich zu Infektionsstudien mit anderen inaktivierten Virulenzfaktoren, wie z.B. den Pneumokokken-Adhäsinen, relativ hoch, da für andere bakterielle Faktoren nur eine um 10 bis 100 fache Reduktion der Virulenz gezeigt werden konnte. Pneumolysin-defiziente Mutanten kombiniert mit einer Deletion der Neuraminidase, Hyaluronidase, PspA, PspC oder des Autolysins (LytA) zeigten im systemischen Mausinfektionsmodell eine abgeschwächte Virulenz, die aber weitaus weniger ausgeprägt war als die Attenuation der *pavA*-Mutanten (Berry und Paton, 2000). Im experimentellen Maus-Meningitis-Modell führte die Inaktivierung von PavA zu einer signifikant verminderten Induktion der Hirnhautentzündung und eine Dissemination der Pneumokokken in das Blut oder den Organismus konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Die Transkription und Produktion anderer relevanter Virulenzfaktoren, wie Pneumolysin, Kapselpolysaccharide, PspC und PspA wurde durch die Deletion des *pavA*-Gens in Pneumokokken nicht beeinträchtigt (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005). Durch Inhibitionsstudien mit anti-PavA Antikörpern konnte ausgeschlossen werden, dass PavA als Adhäsine bzw. Invasin bei der Interaktion mit humanen Epithel- bzw. Endothelzellen fungiert (Pracht *et al.*, 2005). PavA ist allerdings über den C-terminalen Bereich des Proteins an der Bindung von

immobilisierten Fibronectin beteiligt und begünstigt die Assoziation von Pneumokokken an Endothel- bzw. Epithelzellen (Pracht *et al.*, 2005). Aufgrund der starken Attenuierung der *pavA*-Mutante im Maus-Modell liegt der PavA-Produktion eine wichtige virulente und biologische Funktion im Infektionsprozess von *S. pneumoniae* zugrunde, die bis heute nicht vollständig geklärt ist. Da PavA nicht direkt am Infektionsverlauf der Pneumokokken als Adhäsion beteiligt ist, aber trotzdem einen massiven Einfluss auf den Kolonisierungsprozess und die Invasivität der Pneumokokken hat, wird angenommen, dass PavA als modulierendes Protein andere wichtige bisher unbekannte Virulenzfaktoren aktivieren kann (Pracht *et al.*, 2005). Eine immunologische Wirkung von PavA wurde bis heute nicht untersucht. Bezüglich des Immunsystems sollten deshalb *in vitro* Infektionsversuche mit humanen DCs und murinen Makrophagen Aufschluss über die Bedeutung von PavA für die Virulenz der Pneumokokken bei der Phagozytose durch professionelle APCs geben. Außerdem wurde die Induktion des adaptiven Immunsystems im Bezug auf die Produktion von PavA durch Pneumokokken bei der Interaktion mit DCs untersucht. Um eventuelle virulente immunologische Nebeneffekte durch Pneumolysin während der Interaktion zu vermeiden, wurden standardmäßig Pneumolysin-defiziente Bakterienstämme in den Versuchen eingesetzt. Dadurch sollte auch die apoptotische und die immunologisch aktivierende Wirkung des Pneumolysins über TLR-4 bei der Untersuchung zur Erkennung von Pneumokokken durch DCs ausgeschlossen werden. In vergleichenden Apoptosestudien mit PavA-exprimierenden bzw. -defizienten Pneumokokken mit DCs zeigte die *pavA*-Mutante eine verfrühte Induktion von Apoptose und Nekrose bei DCs zwischen 1 h und 2 h Infektionsdauer. Bei frühen Zeitpunkten der Infektionen lösten beide Stämme keinen programmierten Zelltod aus. Die Aktivität von PavA führte also nicht zu einer Apoptose- bzw. Nekroseinduktion. Methodisch wurde daher eine standardmäßige Infektionsdauer von 30 min gewählt. In den *in vitro* Infektionsversuchen wurde die frühe Erkennung und Aufnahme durch APCs der *pavA*-Mutante nachgewiesen. Eine signifikant erhöhte Phagozytoserate von PavA-defizienten Pneumokokkenmutanten konnte im Vergleich zum PavA-produzierenden Stamm gemessen werden. Nach kurzen Infektionszeiten von 15 min ließ sich diese Tendenz nur bedingt beobachten. Nach 30 bzw. 45 min internalisierten DCs höhere Mengen an Pneumokokken, wenn die Pneumokokken kein PavA produzierten. Immunfluoreszenzmikroskopische Beobachtungen und Messungen unterstützten die

verstärkte Aufnahme von *pavA*-Mutanten bei einer 30 minütigen Infektion der DCs. Die erhöhte Aufnahmerate der *pavA*-Mutanten konnte auch in Antibiotika-Protektionsversuchen mit murinen Makrophagen bzw. humanen DCs gezeigt werden. Die Aufnahme und Erkennung von Pneumokokken durch APCs ist somit abhängig von der PavA-Produktion. Dieser Effekt ist Spezies- und Zelltyp-unabhängig, da die erhöhte Aufnahme der *pavA*-Mutante sowohl bei murinen Makrophagen als auch bei humanen DCs nachgewiesen werden konnte. Die hier verwendete Makrophagen-ähnliche Zelllinie J774 zeichnet sich in der Zellkultur dadurch aus, dass sie keine Phagozytose-einschränkende Veränderungen durchmacht. DCs hingegen stellen ein modulierendes Zellsystem dar, welches sofort durch biochemische Veränderungen auf die Umgebung reagiert und nach Stimulierung die phagozytischen Eigenschaften einstellt (Reis e Sousa, 2006). Somit war die Kapazität der Internalisierung von Pneumokokken bei Makrophagenzellen unabhängig von der PavA-Produktion höher als bei den DCs. Zur detaillierten Aufklärung über die Funktion von PavA wurde das Protein als Fusionsprotein nativ gereinigt. An den aminoterminalen Bereich des PavA-Proteins wurde das MBP (Maltose-binding Protein) fusioniert. Bei exogener Zugabe des nativem Fusionsproteins MBP-PavA zur *pavA*-Mutante in *in vitro* Infektionsversuchen mit murinen Makrophagen bzw. humanen DCs konnte der gesteigerte PavA Aufnahmeeffekt der Mutante ausgeglichen werden. Interessanterweise war nach der exogenen Zugabe des MBP-PavA Proteins die Anzahl der internalisierten *pavA*-Mutanten in die APCs vergleichbar mit der Anzahl phagozytierter PavA-produzierender Stämme. Mit gesteigerter Proteinmenge an MBP-PavA konnte auch ein verstärkter Komplementationeffekt der *pavA*-Mutante nachgewiesen werden. Die Infektion mit der MBP-PavA-komplementierten *pavA*-Mutante zeigte sowohl bei J774-Makrophagen als auch bei humanen DCs ein ähnliches Internalisierungsverhalten als der vergleichende PavA-produzierende Kontrollstamm. Nachdem die Pneumokokkenmutanten vor der Infektion präinkubiert wurden verblieb das zugegebene Protein während der Infektionsdauer im Infektionsüberstand. Die exogene Zugabe des Kontrollproteins MBP zeigte bei J774 und DCs keine veränderte Rate der bakteriellen Aufnahme. Für das native MBP-PavA Protein konnte somit innerhalb der *in vitro* Infektionsversuche eine biologisch funktionelle Aktivität, die auf die spezifische Wirkung von PavA und nicht auf eine unspezifische Wirkung von MBP zurückzuführen ist, nachgewiesen werden. In Bindungsstudien konnte die spezifische Bindung von MBP-PavA an Pneumokokken

nachgewiesen werden. In beiden Zuständen, sowohl immobilisiert als auch löslich, wurde für das MBP-PavA Protein, nicht aber für das MBP-Protein eine spezifische Interaktion mit den Pneumokokken gemessen. Das MBP-PavA Protein zeigte aber keine spezifische Bindung an die DCs oder die J774-. PavA konnte somit nicht direkt mit APCs in Kontakt treten. Dies unterstützt die Hypothese, dass PavA nicht direkt von den Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt wird und direkt an der Phagozytose der Pneumokokken beteiligt ist. Die Ergebnisse weisen vielmehr daraufhin, dass PavA seine biologische Funktion und virulente Wirkung erst durch die modulierende Gestaltung der bakteriellen Zelloberfläche der Pneumokokken entfaltet. Durch die spezifische Reassoziierung des exogenen PavA-Proteins an das Bakterium kommt es zu Modulation der Bakterienoberfläche. Dabei werden voraussichtlich Oberflächenstrukturen aktiviert, die im Infektionsverlauf der Pneumokokken einen starken Einfluss auf die Virulenz haben und zur Pathogenität der Bakterien beitragen. Die Fibronectin-vermittelte Adhärenz, die PavA bei Epithel- und Endothelzellen einleitet, bleibt in den Untersuchungen aus, da die APCs kein endogenes Fibronectin produzieren. Auf der Suche nach der tatsächlichen Funktion von PavA könnten Homologien zu anderen bereits untersuchten und bekannten Virulenzfaktoren anderer pathogener Mikroorganismen Klarheit bringen. Viele atypische Fibronectin-bindende Proteine, wie FbpA von *Listeria monocytogenes*, FbpA von *Streptococcus gordonii*, Fbp54 von *Streptococcus pyogenes* zeigen eine hohe genetische Homologie zu PavA (Dramsi *et al.*, 2004; Christie *et al.*, 2002; Courtney *et al.*, 1996). *Listeria monocytogenes* produziert das FbpA, das neben der Adhärenz über die Fibronectinbindung an Leberendothelzellen, auch über eine Chaperon- sowie über eine Eskortfunktion für die Virulenzfaktoren Listeriolysin O und Internalin B verfügt (Dramsi *et al.*, 2004). Wie PavA ist FbpA auf der Bakterienoberfläche von Listerien lokalisiert, weist aber ebenso wie PavA kein typisches LPXTG-Motiv und kein Signalpeptid auf. Die Sekretion des Proteins erfolgt wahrscheinlich wie bei anderen Listerien Proteinen ohne Signalpeptid über SecA (Lenz *et al.*, 2003). PavA spielt eine wichtige Rolle in der Adhärenz an Lungenepithelzellen und weist somit viele funktionelle Parallelen zu FbpA auf (Dramsi *et al.*, 2004). Die Inaktivierung von FbpA beeinträchtigte die Produktion von Listeriolysin O (LLO) und Internalin B (InlB). Außerdem wurde nachgewiesen, dass FbpA mit den bekannten Virulenzfaktoren LLO und InlB von Listerien immunpräzipitiert. Die *fbpA*-Mutante zeigte außerdem im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp reduzierte

Mengen des LLO-Proteins im Überstand und reduzierte Mengen des InlB-Proteins in der Zytosol- und Membranfraktion. Die Transkription der Gene wurde durch die Inaktivierung von *fbpA* nicht beeinträchtigt. Es wird daher vermutet, dass FbpA als Chaperon entweder die assoziierten Proteine wie LLO und InlB vor einer Degradation schützt und/oder zu einer verstärkten Sekretion bestimmter Virulenzfaktoren und damit zu deren spezifischen Lokalisation an der Bakterienoberfläche oder Sekretion beiträgt (Dramsi *et al.*, 2004). PavA könnte wie FbpA einen Einfluss auf die biologische Aktivität anderer, bisher nicht identifizierter Pathogenitätsfaktoren von *S. pneumoniae* ausüben, die bei der Interaktion von *S. pneumoniae* mit APCs eine wichtige Rolle spielen. Bei vergleichenden Proteomanalysen konnten zwei durch PavA-regulierte Proteine nachgewiesen werden (Dagmar Bracht, Dissertation, 2005). Eines der herunterregulierten Proteine wurde als GlnQ (GlnQ408) identifiziert. Beim GlnQ handelt es sich um die ATP-bindende Domäne eines ABC-Glutamintransportsystems von *S. pneumoniae*. Im membranassoziierten Subproteom der *pavA*-Mutante lag GlnQ reprimiert vor (Dagmar Bracht, Dissertation 2005). PavA kann somit für die Expression, die Faltung bzw. die Translokation des Proteins verantwortlich sein. Bei Gruppe B Streptokokken konnten Komponenten des ABC-Glutamintransporters als Virulenzfaktor beschrieben werden (Tamura *et al.*, 2002). Außerdem ist das Lipoprotein PsaA, Teil des Mangantransporters von *S. pneumoniae*, schon seit 2002 als Virulenzfaktor bekannt (Marra *et al.*, 2002). Deshalb ist es durchaus möglich, dass bei *S. pneumoniae* der Glutamintransporter als Virulenzfaktor agieren kann, der durch PavA moduliert und somit aktiviert wird.

Für die Eindämmung einer Pneumokokkeninfektion *in vivo* ist in erster Linie die intrazelluläre Prozessierungsaktivität der APCs verantwortlich. Pathogene Mikroorganismen werden über PAMP-Strukturen („pathogen-associated molecular patterns“) als Fremdorganismus von den immunologischen Wirtszellen erkannt, phagozytiert und intrazellulär prozessiert (Takeda *et al.*, 2005). Zur Eliminierung der bakteriellen Eindringlinge erfolgt die intrazelluläre Prozessierung der Bakterien. Dabei werden sie in angesäuerten Kompartimenten wie den Phagolysosomen enzymatisch zersetzt (Larsson *et al.*, 1997). Bei *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass die Abtötung der Bakterien durch DCs innerhalb von 1 h erfolgt (Kolb-Mäurer *et al.*, 2000). Die Antigene werden dann über den MHC-Klasse II Komplex dem adaptiven Immunsystem präsentiert. Die Phagozytose und Prozessierung von Fremdmaterial wird bei

vielen pathogenen Mikroorganismen wie meist bei DCs über die TLRs und den zellulären Rezeptor DC-SIGN („DC-specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin“), der Kohlenhydratstrukturen von Mikroorganismen initiiert (Geijtenbeek und van Kooyk, 2003). Bei einigen pathogenen Mikroorganismen wie HIV-I oder *Mycobacterium tuberculosis* wurden Strategien entwickelt, die den Erregern ermöglichen über das DC-SIGN unerkannt dem Immunsystem zu entgehen (Geijtenbeek *et al.*, 2003; van Kooyk und Geijtenbeek, 2003). Durch die hohe Migrationsfähigkeit der DCs im ausgereiften Zustand wird somit die schnelle Dissemination durch das Bakterium erzielt. Überlebensstudien von Pneumokokken in DCs und Makrophagen haben eine schnelle Dezimierung der lebenden intrazellulären Bakterien gezeigt. Die intrazelluläre Abtötung der Pneumokokken durch die Zellen erfolgte bereits nach einer einstündigen Infektion. Somit scheinen Pneumokokken nicht in der Lage zu sein dem Prozessierungsmechanismus der DCs und der Makrophagen zu entgehen. Die *pavA*-Mutante zeigte im Vergleich zum PavA-produzierenden Stamm eine effizientere und schnellere Abtötungsrate in der Zelle. Ist PavA nicht funktionell, sind die Pneumokokken der Prozessierungsmaschinerie der Zellen in einem verstärkten Ausmaß ausgesetzt und werden somit schneller eliminiert als PavA-produzierende Pneumokokken. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von intrazellulären Pneumokokken zeigten die Kollokalisierung von LAMP-1 („Lysosomal-associated membrane protein 1“) und phagozytierten Pneumokokken. Eine stark aggregierte Ansammlung von LAMP-1 konnte hierbei direkt um die Cluster der intrazellulären Bakterien beobachtet werden. Die Bakterien befinden sich somit bereits nach einer 30 minütigen Infektion in lysosomalen Kompartimenten der DCs, die während der Prozessierung gebildet werden. Elektronenmikroskopischen Untersuchungen von infizierten DCs zeigten membranumhüllte intrazelluläre Pneumokokken. In diesen Vesikeln lagen die Bakterien meistens als einzelne Diplokokken vor. Vereinzelt konnten auch Vakuolen mit mehreren Pneumokokken in den DCs nachgewiesen werden. Die EM-Aufnahmen zeigten außerdem einige intrazelluläre Pneumokokken, die im Zytosol der DCs lokalisiert waren. Phagozytierte Pneumokokken liegen in DCs zum Großteil in LAMP-1 assoziierten Vakuolen vor, können aber auch vereinzelt im Zytoplasma vorkommen. Das Befreien aus den lysosomalen Kompartimenten der DCs in das zelluläre Zytosol könnte das bakterielle Überleben in der Zelle garantieren. Die *pavA*-Mutante zeigte im Vergleich zum Kontrollstamm eine erhöhte Anzahl an phagozytierten Bakterien

und verstärktes Clustern der Mutante in einer Vakuole. Einzelne Phagosome fusionieren und bilden die beobachteten Vakuolen während der Prozessierung. Sowohl dieser Prozess als auch das Vorkommen phagozytierter Bakterien im Zytosol der DCs konnte auch schon bei *Listeria monocytogenes* beobachtet werden (Kolb-Mäurer *et al.*, 2000).

5.3 PavA-abhängige immunmodulierende Funktion von Pneumokokken-stimulierten DCs

Nach der Stimulierung von DCs ist die Hauptfunktion der Zellen die spezifische Immunantwort des Wirtes zu aktivieren. Dabei übernehmen DCs abhängig von ihrer Funktion verschiedene Aufgabenbereiche während einer Infektion mit pathogenen Mikroorganismen. DCs sind dabei stark wandelbar und anpassungsfähig. Im unreifen Zustand stellen sie hoch potente phagozytierende Zellen dar, die durch verschiedene Oberflächenrezeptoren ein großes Spektrum an PAMPs von pathogenen Mikroorganismen erkennen können. Die Phagozytose und die intrazelluläre Prozessierung wirken wie ein Stimulus, der die DCs über bestimmte Signaltransduktionswege zum Ausreifen anregt. DCs verlieren bei diesem Prozess ihre phagozytische Funktion und ihre sessilen Eigenschaften in der Peripherie des Gewebes. Eine folgende Umstrukturierung der Zelle führt zur Migrationsfähigkeit und zur Produktion bestimmter Oberflächenmoleküle, die antigenpräsentierend (MHC-Komplex) und kostimulierend auf T-Zellen wirken. DCs entwickeln sich somit im reifen Zustand zu einem antigenspezifischen Komplex, der im lymphatischen Gewebe direkt das erworbene Immunsystem über die Stimulierung naiver T-Zellen aktiviert. Die Freisetzung bestimmter inflammatorischer Zytokine durch die stimulierten DCs reguliert und unterstützt die T-Zellaktivierung. Das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Zytokine gewährleistet die für den Stimulus geeignete Immunantwort. Die Interaktion von DCs mit T-Zellen erfolgt nach einem Stimulus mit extrazellulären Bakterien über den MHC-Klasse II-Komplex, durch den die Proliferation spezifischer T-Zellen angeschaltet wird. Im lymphatischen Gewebe werden somit in kurzer Zeit eine Vielzahl an zytotoxischen und T-Helfer Zellen gebildet, die sich sofort an der Bekämpfung von infektiösem Material beteiligen können. Dieser Entwicklung zur Folge werden außerdem spezifische Antikörpern durch die B-Zellaktivierung und Gedächtniszellen gebildet. DCs übernehmen als Botenzellen eine Schlüsselrolle in diesen vielseitigen Aktivierungsprozessen des erworbenen Immunsystems und sind essentiell für frühzeitige Erkennungs- und Bekämpfungsstrategien des

Immunsystems. Die biochemischen Wege der Signaltransduktion in der DC, welche intrazellulär den äußerlichen bakteriellen Stimulus zur spezifischen Immunantwort übersetzen, sind aufgrund der vielfältigen Eigenschaften der Zelle sehr komplex. Für die Pneumokokken-verwandte Spezies *Streptococcus pyogenes* konnte bereits die TLR und MyD88 abhängige immunologische Aktivierung der DCs nachgewiesen werden (Loof *et al.*, 2008). Außerdem induziert *S. pyogenes* die vollständige Ausreifung der DCs zur Aktivierung des Immunsystems (Loof *et al.*, 2007). Weitergehend kommt es bei einer *S. pyogenes*-Infektion zu einer IL-12 unterstützten proinflammatorischen Immunabwehr, was zu einer Aktivierung von Th1-Zellen führt (Veckman und Julkunen, 2008). Für *Streptococcus pneumoniae* sind die Aktivierungswege der Zellen, die während eines Infektionsprozesses zu einer effizienten T-Zellstimulierung führen, nicht vollständig untersucht. In verschiedenen Maus-Infektionsmodellen konnte dennoch der Einfluss von MyD88 auf die Krankheitsausbreitung durch Pneumokokken bewiesen werden (Albiger *et al.*, 2005). Dadurch wird angenommen, dass MyD88 an der Aktivierung der Immunantwort bei Pneumokokkenerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Khan *et al.*, 2005; Koedel *et al.*, 2004).

In wieweit DCs am immunologischen Erkennungs- und Signalmechanismus zur Eliminierung von Pneumokokken im Wirtsorganismus beteiligt sind, wurde in Ausreifungsstudien, durch Untersuchungen zum Nachweis von Zytokinen auf transkriptionaler Ebene als auch auf Sekretionsebene und in T-Zellaktivierungstests mit Pneumokokken-infizierten DCs untersucht. Die Ergebnisse sollten zum Verständnis der Infektionsstrategien der Bakterien bzw. die Bekämpfungsmechanismen des Wirtsorganismus vollständig beitragen. Die Aktivierung von unreifen DCs zur physiologisch relevanten Ausreifung konnte zeitabhängig durch die Stimulierung mit Pneumokokken aufgrund der erhöhten Exponierung der Oberflächenmarker auf den DCs im FACS detektiert werden. Kostimulierende Strukturen wie CD86 sowie antigenpräsentierende Proteine wie HLA-DR (MHC Klasse II) wurden in DCs, die mit Pneumokokken stimuliert wurden, stärker produziert als bei LPS-stimulierten DCs. Die morphologischen und strukturellen Veränderungen von DCs während ihrer Maturation konnten somit durch lebende Pneumokokken bei DCs ausgelöst werden. Für einige pathogene Mikroorganismen wie *Borrelia burgdorferi*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium tuberculosis* und für *Streptococcus mutans* konnte bereits

eine vollständige Ausreifungsinduktion bei DCs gezeigt werden (Filgueira *et al.*, 1996; Kolb-Mäurer *et al.*, 2000; Unkmeir *et al.*, 2002; Henderson *et al.*, 1997; Hahn *et al.*, 2005). Die stark erhöhte Produktion an MHC-Klasse II Molekülen wird vermutlich durch die intrazelluläre Prozessierung der Pneumokokken und deren Transport in die Lysosomen induziert. Die Zellen bereiten sich außerdem durch die erhöhte CD86 Produktion und dadurch erreichten kostimulatorischen Aktivierungspotenzials auf die physiologische und immunologische Bekämpfung der Pneumokokken vor. Obwohl die Phagozytose der *pavA*-Mutante in DCs signifikant erhöht ist, konnten die Ausreifungsstudien keine Unterschiede in den induzierten Oberflächenmustern nachgewiesen werden. Die Stärke der Ausreifung ist somit unabhängig von der *pavA*-Produktion der Pneumokokken. Die Menge und die zeitabhängige Phagozytose von Pneumokokken sind für den Grad der Ausreifung bei DCs nicht ausschlaggebend. Vergleichend zur LPS-Stimulierung und der daraus resultierenden Ausreifung der DCs ist die Art des extrazellulären bakteriellen Stimulus vermutlich essentiell für die Stärke der Maturation der Zellen. Gemäß den Stimuli werden verschiedene Signalwege aktiviert, z.B. über die Bindung bakterieller Faktoren an verschiedene TLRs oder C-Typ Lektine der DCs, die zur vollständigen Ausreifung führen. Dabei spielt die Spezifität der zellulären Rezeptoren eine wichtige Rolle (van Vliet *et al.*, 2007). Durch mannigfaltige Kombinationen der einzelnen Bindungen verschiedener Rezeptoren kann eine Vielzahl an spezifischen extrazellulären Signalen durch die zelluläre immunologische Erkennung über DCs abgedeckt werden. Die DC kann somit ihre Sensitivität gegenüber ausreichenden Stimuli erhöhen. Das bedeutet, ist die Zelle über einen bestimmten Signalweg aktiviert worden, geht sie sofort in den Ausreifungsstatus über, um möglichst schnell bei akuten Fällen der Infektion eine aktive Immunantwort zu liefern. Der zugrunde liegende Signalweg, die beteiligten zellulären Rezeptoren und die bakteriellen stimulierenden Komponenten, die zur Ausreifung der DC führen, müssen für *S. pneumoniae* noch untersucht werden. Die Expression von Zytokinen von Pneumokokken-infizierten DCs konnte vor allem in den Fällen von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und TNF- α nachgewiesen werden. IFN- γ konnte sowohl bei Pneumokokken- als auch bei LPS-stimulierten DCs nicht induziert werden. Das bedeutende proinflammatorische Zytokin IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten, dem IL12-p35 und dem IL-12p40, die sich posttranskriptional zum biologisch aktiven Heterodimer zusammensetzen (Bekeredjian-Ding *et al.*, 2006). Nach der Infektion mit

Pneumokokken konnte sowohl eine erhöhte Expression der Gene für IL-12p35 als auch für IL-12p40 gemessen werden. Hierbei zeigte das Gen für IL-12p35 im Vergleich zu IL-12p40 eine schwächere Expression, was die Annahme der unterschiedlichen Genregulation der einzelnen IL-12-Komponenten unterstützt (Liu *et al.*, 2003). Außerdem konnte ein hoher Anteil an *IL-10*-mRNA bei Pneumokokken-infizierten DCs bestimmt werden. IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das eine autokrine Wirkung hat und durch die Bindung an den IL-10 Rezeptor die immunologische Eigenschaft der Aktivierung des erworbenen Immunsystems von Th1-Zellen durch DCs inhibiert (Corinti *et al.*, 2001). Die Antigenpräsentation über den MHC-Klasse II Komplex von DCs wird durch IL-10 reprimiert und inhibiert (Steinbrink *et al.*, 1999). Bei vollständiger Ausreifung der DCs wirkt IL-10 nicht mehr als inhibitorischer Faktor auf die immunologischen Eigenschaften der DCs (De Smedt *et al.*, 1997). Außerdem wird durch IL-10 die Zytokinexpression von IL-12 gehemmt, aber gleichzeitig die Antikörperproduktion, die B-Zell-Proliferation und das Überleben der B-Zellen induziert und gewährleistet (Moore *et al.*, 2001). Diese Art der immunologischen Ausbalancierung über unterschiedliche Zytokine ist für den Organismus physiologisch notwendig. Die verzögerte Freisetzung von IL-10 führt nach der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch IL-12 zur Inhibition der weiteren Proliferation der T-Zellen, aber auch zur Produktion von Antikörpern durch B-Zellen. Dadurch wird im Fall einer Infektion zuerst der lokale Infektionsherd durch zytotoxische T-Zellen eliminiert. Zum Ausschluss einer langfristigen Entzündungsreaktion durch eine dauerhafte Aktivierung der T-Zellen wird die IL-12-Freisetzung durch IL-10 inhibiert. Gleichzeitig gewährleistet IL-10 die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses durch B-Zellen. Die *pavA*-Mutante induzierte im Vergleich zum PavA-produzierenden Kontrollstamm signifikant reduzierte Mengen der Zytokin-mRNA. Außerdem wurde bei der *pavA*-Mutante eine verminderte Zytokinfreisetzung durch DCs gemessen. Die biologische Aktivität der Zytokine ist durch die exogene Wirksamkeit auf andere immunologische Zellkomponenten wie T- und B-Zellen begründet. Über die Bindung an Zielrezeptoren können Zytokine spezifisch und konzentrationsabhängig auf ihre Zielzellen wirken und eine bestimmte Richtung der erworbenen Immunantwort unterstützen (Janeway und Medzhitov, 2002). Die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen konnte nach der Stimulierung mit *S. pneumoniae* in Abhängigkeit der Zeit der Stimulation von DCs nachgewiesen werden. Neben den wichtigen Molekülen wie IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 und

TNF- α konnten im Vergleich zu den unstimulierten DCs signifikant erhöhte extrazelluläre Mengen an IL-10 gemessen werden. Das Muster der nachgewiesenen Zytokine unterschied sich nicht von den Genexpressionsuntersuchungen. Im Vergleich zur LPS-Stimulierung wiesen die Pneumokokken-stimulierten DCs vergleichbare Muster und Mengen der sekretierten Zytokine auf. Nur für IL-12 konnte eine höhere Konzentration durch Pneumokokken gemessen werden. Außerdem konnten signifikante Unterschiede der *pavA*-Mutante und des PavA-produzierende Stammes bei der quantitativen Messung der sekretierten Zytokine nachgewiesen werden. Bei Abwesenheit des PavA-Proteins wurde für alle induzierten Zytokine eine geringere Menge an sekretierten Molekülen gemessen. Das Verhältnis von IL-12 zu IL-10 war für die LPS-stimulierten DCs im Vergleich zu den Pneumokokken-stimulierten DCs am höchsten. LPS induzierte somit im Vergleich zu den Pneumokokken weniger antiinflammatorisches IL-10 Sekretion bei den DCs. Die LPS-Stimulierung von DCs wirkte durch die Sekretion von höheren Mengen an IL-12 eher proinflammatorisch. Bei der Pneumokokkenstimulierung von DCs löste die *pavA*-Mutante im Vergleich zur sekretierten IL-12-Menge eine verhältnismäßig höhere IL-10 Sekretion aus als der PavA-produzierende Stamm. Die Zytokinfreisetzung der DCs nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* war somit abhängig von der Produktion des PavA-Proteins bei den eingesetzten Pneumokokken. Die PavA-Produktion führte zu einer gesteigerten proinflammatorischen Immunantwort durch die Sekretion von IL-12 durch DCs. Da die *PavA*-Mutante effizienter und schneller in den DCs abgetötet wird und somit die Ausbreitung der Pneumokokken im Wirtsorganismus bereits im frühen Stadium der Infektion verhindert wird, ist die Notwendigkeit der Aktivierung der Inflammation durch Zytokine wie IL-12 nur bedingt gegeben. Für die Ausbildung von spezifischen Antikörpern und des immunologischen Gedächtnis durch B-Zellen wird IL-10 sehr früh im Infektionsverlauf zur optimalen Stimulierung und Aktivierung der B-Zellen freigesetzt. Durch die exogene Zugabe des Fusionsproteins MBP-PavA konnte die erniedrigte Zytokinproduktion der DCs durch die *pavA*-Mutante im Fall von IL-6, IL-8 und TNF- α fast vollständig komplementiert werden. IL-6, IL-8 und TNF- α sind wichtige Aktivatoren der Rekrutierung von phagozytierenden Zellen in infizierte Regionen (Smirnova *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2007; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Der Grad der Zytokinfreisetzung veränderte sich nicht beim Kontrollprotein MBP. Demnach konnten die Unterschiede zwischen der *pavA*-Mutante und dem PavA-produzierenden

Pneumokokkenstamm bei der induzierten Zytokinfreisetzung durch DCs nach der Reassoziierung von MBP-PavA an die *pavA*-Mutanten ausgeglichen werden. Dieser Komplementationseffekt konnte durch die spezifische Bindung von PavA an die *pavA*-Mutante erfolgen. Die biologische Funktionalität von MBP-PavA konnte bezogen auf die Zytokin-induzierende Wirkung der Pneumokokken auf DCs bewiesen werden. Bestimmte Faktoren können somit unter Umständen durch die exogene Zugabe des PavA-Proteins auf der Oberfläche der Bakterien modifiziert oder aktiviert werden, die eine essentielle Rolle für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems über proinflammatorische Zytokine haben. Über das Schlüssel-Schloss-Prinzip werden durch ausgereifte DCs die T-Zellen zu ihrer spezifischen Proliferation angeregt. Die prozessierten bakteriellen Antigene werden über MHC-Klasse II Moleküle direkt den T-Zellen über T-Zellrezeptoren präsentiert. T-Zellen werden somit spezifisch für den Stimulus zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Dabei unterstützen freigesetzte Zytokine die Aktivierungsmechanismen. Pneumokokken können durch die Infektion von DCs zeit- und konzentrationsabhängig allogene naive T-Zellen zur Proliferation ohne Mitwirkung von Zytokinen anregen. Der PavA-produzierende Stamm zeigte dabei ein signifikant stärkeres Potenzial der T-Zellanregung, was die erhöhte Zytokinfreisetzung und -expression unterstützt.

Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit demonstrierten zusammenfassend die wichtige Rolle von PavA für eine optimale Virulenz von *S. pneumoniae*. Die Produktion von PavA durch *S. pneumoniae* reduzierte und inhibierte die immunologische Erkennung durch Zellen des angeborenen Immunsystems wie DCs und Makrophagen, die im bakteriellen Infektionsverlauf die erste immunologische Barriere für pathogene Mikroorganismen darstellen. Die stark phagozytisch aktiven Zellen konnten zur Bekämpfung der Pneumokokken die *pavA*-Mutante der Pneumokokken effizienter und schneller internalisieren und intrazellulär abtöten als den PavA-produzierenden Stamm der Pneumokokken. Durch die Stimulierung der DCs mit *S. pneumoniae* wurde eine vollständige Ausreifung der DCs induziert. Die morphologischen und strukturellen Veränderungen der DCs nach der Stimulierung mit Pneumokokken erfolgten mit starker Hochregulierung von zellulären Oberflächenmarkern wie CD25, CD83, CD86 und HLA-DR. Die Ausreifungsinduktion bei DCs durch Pneumokokken war trotz der verringerten Effekte der PavA-Produktion von *S. pneumoniae* bei der Phagozytose in die

Zellen des innate Immunsystems unabhängig vom bakteriell produzierten PavA-Protein. Nach der Stimulierung der DCs durch *S. pneumoniae* konnten signifikant erhöhte sekretierte Mengen an proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen gemessen werden. Dabei induzierte die *pavA*-Mutante *in vitro* bei DCs geringere Mengen an Zytokinen als die PavA-produzierenden Pneumokokken. Diese Beobachtung unterstützt die Erkenntnis der bei der *pavA*-Mutante auftretenden reduzierten Inflammation in den Mausinfektionsmodellen (Holmes *et al.*, 2001; Pracht *et al.*, 2005). Die Aktivierung der naiven T-Zellen und ihrer Proliferation *in vitro* konnte durch Pneumokokken-stimulierte DCs ausgelöst werden. DCs, die durch *S. pneumoniae* stimuliert wurden, können somit *in vitro* soweit spezifisch aktiviert werden, dass sie allogene T-Zellen zur Proliferation anregen können. Pneumokokken-aktivierte DCs verbinden dadurch das angeborene Immunsystem, das unspezifisch in der frühen Phase der bakteriellen Infektion die Erreger eliminieren kann, mit dem erworbenen Immunsystem. Das adaptive Immunsystem reagiert hoch spezialisiert auf die durch die stimulierten DCs präsentierten Antigene und freigesetzten Zytokine. Die *pavA*-Mutante löste bei der T-Zellaktivierung durch die Pneumokokken-stimulierten DCs eine erniedrigte Proliferation aus, was wiederum den erniedrigten Effekt der *pavA*-Mutante bei der Freisetzung der Zytokine unterstützt. Durch die Zugabe von exogenem PavA-Protein konnte die erhöhte Phagozytose und die geringere Zytokinproduktion der durch die *pavA*-Mutante stimulierten DCs komplementiert werden. Somit waren die Anzahl phagozytierter Pneumokokken und die Menge an sekretierten Zytokinen nahezu gleichwertig mit den bei PavA-produzierenden Pneumokokken gemessenen Werten. Durch diese Resultate konnte der massive Einfluss des PavA-Proteins auf die Virulenz der Pneumokokken, die Phagozytose und induzierte Inflammation im Wirt demonstriert werden. Da das isolierte PavA-Protein nicht an die Zellen des angeborenen Immunsystems assoziieren kann, ist das bakterielle PavA-Protein nicht direkt an der Erkennungs- und Phagozytosemaschinerie der Immunzellen beteiligt. Diese Beobachtung und die Tatsache, dass PavA durch seine Funktionalität einen großen Einfluss auf die Pathogenität der Pneumokokken hat, unterstützt die These, dass PavA durch Protein-modulierende Fähigkeiten andere bisher noch unbekannte virulente Oberflächenstrukturen von *S. pneumoniae* aktivieren kann. Zur vollständigen Aufklärung der Funktion von PavA müssen weitere Untersuchungen folgen, bei denen beispielsweise PavA-Assoziationspartner von *S. pneumoniae* identifiziert werden. Diese bisher unbekannt

bakteriellen Faktoren von *S. pneumoniae* könnten aufgrund ihrer wichtigen Funktion im Infektionsprozess der Pneumokokken vielversprechende alternative und neue Vakzinkandidaten darstellen und neue Möglichkeiten für therapeutische Ansätze gegen Pneumokokkeninfektionen aufzeigen

6 Material

Für die Aufklärung wissenschaftlicher Fragestellungen werden spezielle methodische Anwendungen entwickelt und optimiert. Die Methoden dieser Arbeit beinhalten molekularbiologische, immunologische, bakteriologische und zellbiologische Techniken, welche zur Untersuchung der Interaktion von *S. pneumoniae* und antigenpräsentierenden Zellen verwendet werden. Zur Durchführung mikrobiologischer Methoden wurden folgende labortechnische Materialien eingesetzt.

6.1 Bakterielle Stämme und Nährmedien

Für die Ausführung von Interaktionsversuchen wurden bestimmte Stämme von *S. pneumoniae* und deren isogene Mutanten eingesetzt. Außerdem wurden zur Herstellung von rekombinanten Proteinen *E. coli* Stämme verwendet. Die Bakterien wurden in speziellen Nährmedien gezüchtet.

6.1.1 *S. pneumoniae* Wildtyp-Stämme

In dieser Arbeit wurden folgende Wildtypstämme von Pneumokokken eingesetzt.

| Stamm | Quelle | Serotyp | Referenz |
|---------------|--------------|---------|--------------------------------------|
| P 37 | NCTC10319 | 35A | (Pracht <i>et al.</i> , 2005) |
| P 51 | ATCC11733 | 2 | (Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005) |
| P 173 (R800) | Laborstamm | - | (Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005) |
| P 257 (D39) | Laborstamm | 2 | (Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005) |
| P 261 (TIGR4) | Klin. Isolat | 4 | (Tettelin <i>et al.</i> , 2001) |

Tabelle 23: Zusammenstellung der verwendeten *S. pneumoniae* Wildtypstämme.

6.1.2 *S. pneumoniae* Mutanten-Stämme

Die in dieser Arbeit dargestellten Versuche wurden mit nachfolgend aufgelisteten Pneumokokkenmutanten durchgeführt.

| Stamm | Wildtyp | Genotyp | Phänotyp | Resistenz | Referenz |
|-------|--------------------------------------|--|--|---|--|
| PN64 | NCTC10319 | pJDC9:: <i>pdb</i> | <i>pdb</i> (<i>ply</i> , <i>pneumolysin</i>) | erm ^R | (Elm <i>et al.</i> , 2004) |
| PN65 | NCTC10319 | pJDC9:: <i>pdb</i> pMSH14:: <i>pavA</i> | <i>pdb</i> (<i>ply</i> , <i>pneumolysin</i>) <i>pavA</i> | erm ^R , spec ^R | (Pracht <i>et al.</i> , 2005) |
| PN107 | TIGR4 (P261) | Δ <i>cps</i> | Kapselgenkomplex | kana ^R | (Pearce <i>et al.</i> , 2002) |
| PN41 | P 257 (D39) | - | <i>pavA</i> | cm ^R | (Holmes, 2001) |
| PN185 | P 257 (D39) | Δ <i>cps</i> | Kapselgenkomplex | kana ^R | (Rennemeier <i>et al.</i> , 2007), diese Arbeit |
| PN187 | PN 41 (D39 Δ <i>pavA</i>) | Δ <i>cps</i> | <i>pavA</i> Kapselgenkomplex | cm ^R , kana ^R | diese Arbeit |

Tabelle 24: Überblick über die verwendeten Pneumokokken-Mutanten. Als PN wird die Stammbezeichnung angegeben. Bei der Abkürzung CPS handelt es sich um die Kapselpolysaccharide von *S. pneumoniae*.

6.1.3 *E. coli* Stämme und Klone

Zur Proteinexpression von MBP und MBP-PavA wurden folgende Vektoren zur Klonierung jeweiliger Gene verwendet.

| <i>E. coli</i> Stammnr. | Stamm | Vektor | Gen | Stamm | Genprodukt | Quelle/ Referenz |
|----------------------------|-------|----------|-------------|-------|---------------------------------|-------------------------|
| 99 | JM109 | pMAL-c2X | <i>lacZ</i> | - | MBP- β -Gal (50,8 kDa) | Promega diese Arbeit |
| 393 | JM109 | pMAL-c2X | <i>pavA</i> | R800 | MBP-PavA (105,5 kDa) | Promega diese Arbeit |

Tabelle 25: Zusammenstellung der verwendeten Vektoren zur Herstellung der rekombinanten Proteine MBP und MBP-PavA.

6.1.4 Bakterielle Nährmedien

Für die Kultivierung von Bakterien wurden bestimmte Nährmedien verwendet. Aus minus 80°C Glyzerinstammkulturen wurden die Mikroorganismen auf Agarplatten ausgestrichen und in Flüssigmedium überführt. Für *E. coli* Kulturen wurden standardmäßig LB-Agarplatten bzw. Flüssigmedium (Luria-Bertani) eingesetzt. *S. pneumoniae* wurden auf Blutagarplatten und standardgemäß zur Vorbereitung für Infektionsversuche in THY- (Todd-Hewitt-Medium mit Hefeextrakt) bzw. im semisynthetischen Komplettmedium CpH8 kultiviert.

| Nährmedien und -platten | Zusammensetzung | Mikroorganismus |
|----------------------------|--|----------------------|
| Blutagarplatten (Oxoid) | 23 g Pepton 5 g NaCl 14 g Agar 65 ml Hammelblut pH 7,4 | <i>S. pneumoniae</i> |
| THY-Medium | 36,4 g/l Todd Hewitt Broth 0,5% Hefeextrakt | <i>S. pneumoniae</i> |
| LB-(Luria-Bertani) Platten | 1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl pH 7,5 | <i>E. coli</i> |
| LB-Agarplatten | 1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl 1,5% Agar pH 7,5 | <i>E. coli</i> |
| Rich Medium + Glukose | 1% Bacto-Trypton 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 0,2% Glukose | <i>E. coli</i> |
| CpH8 | 800 ml Pre C 26 ml Supplement 20 ml Glutamin (0,1%) 20 ml Adams III 10 ml Natriumpyruvat (2%) 30 ml Phosphatpuffer (pH 8,0) 36 ml Hefeextrakt (2,5%) 76 ml H ₂ O | <i>S. pneumoniae</i> |

Tabelle 26: Zusammensetzung Nährmedien und Agarplatten für die Kultivierung von Bakterien.

| Einzelkomponenten CpH8 | |
|------------------------|---|
| PreC | 1,208 g Natrium-Acetat, 5 g Caseinhydrolysat, 5 mg L-Tryptophan, 5 mg L-Cystein ad 1 l H ₂ O pH 7,5 |
| 3 in 1-Salze | 100 g MgCl ₂ 6 H ₂ O, 500 mg CaCl ₂ , 3,3 mg MnSO ₄ 4 H ₂ O ad 1 l H ₂ O |
| Supplement | 60 ml 3 in 1 Salze, 120 ml Glukose (20%), 6 ml Saccharose (50%), 120 ml Adenosin (2 mg/ml), 120 ml Uridin (2 mg/ml) |
| Phosphatpuffer | 947 ml K ₂ HPO ₄ (1 M), 53 ml KH ₂ PO ₄ (1 M) |
| Adams I | 0,15 mg Biotin, 150 mg Nikotinsäure, 175 mg Pyridoxin-HCl, 600 mg Ca-Pantothenat, 160 mg Thiamin-HCl, 70 mg Riboflavin ad 1 l H ₂ O |
| Adams II | 500 mg FeSO ₄ 7 H ₂ O, 500 mg CuSO ₄ 5 H ₂ O, 500 mg ZnSO ₄ 7 H ₂ O, 200 mg MnCl ₂ 4 H ₂ O, 10 ml HCl konz. ad 1 l H ₂ O |
| Adams III | 160 ml Adams I, 40 ml Adams II, 2 g L-Asparagin, 400 mg Cholin-HCl 17 mg CaCl ₂ |

Tabelle 27: Zusammensetzung CpH8-Mediums für die Kultivierung von *S. pneumoniae*.

6.2 Zellkultur

Als *in vitro* Modellsystem wurden verschiedene eukaryotische Zellen eingesetzt. Primärzellen bzw. Zelllinien wurden unter bestimmten Bedingungen kultiviert und gezüchtet.

6.2.1 Verwendete eukaryotische Zellen

Zur Untersuchung der Interaktion von *S. pneumoniae* und immunologischen Zellen wurden sowohl dendritische Zellen (DCs) als J774-Zellen verwendet. Bei den in dieser Arbeit verwendeten DCs handelt es sich um humane Primärzellen, welche direkt aus peripherem Vollblut über die Isolierung von Monozyten kultiviert wurden (Abbildung 32). J774-Zellen stellt eine immortalisierte murine Zelllinie dar.

| Zelltyp | Quelle | Herkunft | Zellart | Eigenschaften |
|---------|---------------------|--|------------------------------------|--|
| J774 | | Tumorzellen aus BALB/c Mäusen | Murine Makrophagen ähnliche Zellen | Phagozytose Prozessierung; |
| DCs | Freiwillige Spender | Peripheres humanes Vollblut, Monozyten gezüchtet | Humane dendritische Primärzellen | Phagozytose Prozessierung Zytokinfreisetzung Ausreifung T-Zellaktivierung |

Tabelle 28: Verwendete eukaryotische antigenpräsentierende Zellen.

6.2.2 Zellkultur- und Separationsmedien

Bei der Verwendung von eukaryotischen Zellen in Kultur sollten unter *in vitro* Bedingungen alle vom Stoffwechsel benötigten Substanzen zur optimalen Proliferation und Differenzierung bereitgestellt werden. Die nicht synthetisierbaren Substanzen wurden in Form von Zellkulturmedien zugeführt. Die verwendeten Medien wurden von der Firma PAA bezogen. Diese Medien enthalten ein isotonisches, gepuffertes Grundmedium mit anorganischen Salzen, Nährstoffen und Aminosäuren. Für J774-Zellen und DCs wurden gemäß ihrem spezifischen Nährstoffbedarf unterschiedliche Kultivierungsmedien verwendet. Der Zusatz von bestimmten Wachstumsfaktoren führte zur vollständigen Ausdifferenzierung von Monozyten zu DCs.

| Zellart | Zellkulturmedium |
|---------|--|
| J774 | DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) high Glucose (4,5 g/l) 10% FBS (Fetal Bovine Serum „Gold“, PAA) 2 mM Glutamin (PAA) 0,1 mg/ml Streptomycin (PAA) 100 Units/ml Penicillin (PAA) |
| DCs | RPMI 1640 10% FBS 2 mM Glutamin 0,1 mg/ml Streptomycin 100 Units/ml Penicillin |
| | Zytokinmedium: RPMI 1640 10% FBS 2 mM Glutamin 0,1 mg/ml Streptomycin 100 Units/ml Penicillin 20 Units/ml GM-CSF (Strathman) 16 Units/ml IL-4 (Strathman) |
| | Lymphozytentrennmedium: Ficoll 400 (Dichte 1,077 g/l) Natriumthiatrizoat pH 7,0 – 7,5 |
| | |

Tabelle 29: Zellkulturmedien für die Zucht von J774-Zellen und DCs.

Zur Isolierung von Monozyten aus humanem Vollblut wurde ein spezielles Trennmedium der Firma PAA eingesetzt. Diese Trennlösung basiert auf Ficoll 400, einem hydrophilen Polymer, welches einen Dichtegradienten aufbaut. Zellen unterschiedlicher Dichte können mittels dieses Gradienten voneinander getrennt werden. Die zellulären Blutkomponenten separieren in 4 definierte Phasen.

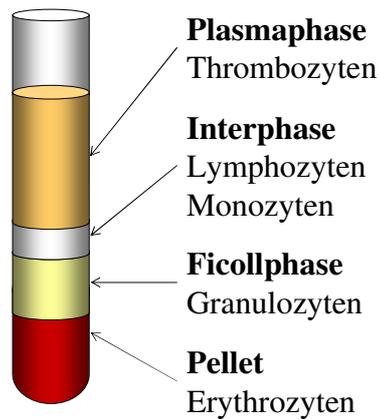


Abbildung 31: Vollblutseparation durch Lymphozytentrennmedium. (Quelle: eigene Darstellung nach Angaben des Herstellers).

6.2.3 Zellkulturzusätze

Folgende Zellkulturzusätze wurden außer den jeweiligen Grundmedien in der Zellkultur für die Zucht eingesetzt.

| | |
|-------------------------------|---------------------------|
| FBS (PAA) | Fetal Bovine Serum „Gold“ |
| Einfriermedium | 800 µl Grundmedium (PAA) |
| | 100 µl FBS |
| | 100 µl DMSO |
| Penicillin/Streptomycin (PAA) | 0,1 mg/ml Streptomycin |
| | 100 Units/ml Penicillin |
| Trypsin/EDTA (PAA) | 5 mg/ml Trypsin |
| | 2,2 mg/ml EDTA |
| PBS/EDTA | PBS pH 7,4 |
| | 2,2 mg/ml EDTA |

6.3 Antibiotika

Zur Selektion resistenter Bakterienstämme von *S. pneumoniae* bzw. *E. coli* wurden Antibiotika den Nährmedien zugesetzt. In der Zellkultur sollte der Einsatz von Antibiotika Fremd-Kontaminationen verhindern.

| Antibiotikum | Konzentration <i>E. coli</i> in µg/ml | Konzentration <i>S. pneumoniae</i> in µg/ml | Lösungsmittel |
|---|---------------------------------------|---|------------------|
| Ampicillin | 100 | 100 | H ₂ O |
| Kanamycin | 50 | 200 | H ₂ O |
| Erythromycin | 250 | 5 | 70% EtOH |
| Tetracyclin | 10 | 2 | MeOH |
| Spectinomycin | 100 | 50 | H ₂ O |
| Chloramphenicol | 50 | 8 | 100% EtOH |
| Einsatz bei Antibiotika-Protektions-Experimenten | | | |
| Penicillin G | 100 Units/ml | | |
| Gentamicin | 100 µg/ml | | |
| Einsatz in der Zellkultur | | | |
| Penicillin | 10000 Units/ml | | |
| Streptomycin | 10 mg/ml | | |

Tabelle 30: Einsatzkonzentrationen verwendeter Antibiotika.

6.4 Antikörper

Antikörper wurden vor allem für Nachweisreaktionen bestimmter Strukturen bei Pneumokokken bzw. den eukaryotischen Zellen verwendet. Bei chemischen Nachweismethoden wurden Enzym-konjugierte Sekundärantikörper eingesetzt. Für Laserdetektionen wurden Fluorochrom markierte Primär- bzw. Sekundärantikörper verwendet.

| Antikörper | Eingesetzte Verdünnung | Quelle/Firma |
|--|------------------------|--------------------------|
| Unkonjugierte Primärantikörper | | |
| Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> (generiert gegen Hitze-inaktivierten <i>S. pneumoniae</i>) IgG | 1:100 | Eurogentec |
| Maus-anti-LAMP-1 IgG | 1:100 | BD Pharmingen |
| Kaninchen-anti-PavA 63 kDa IgG | 1:200 | Eurogentec/Immunoglobine |
| Kaninchen-anti-PavA 42 kDa IgG | 1:200 | Eurogentec |
| Kaninchen-anti-MBP IgG | 1:1000 | NEB |

| Antikörper | Eingesetzte Verdünnung | Quelle/Firma |
|--|------------------------|-----------------------|
| Enzymkonjugiert | | |
| Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt | 1:5000 | Dianova |
| Ziege-anti-Maus Peroxidase gekoppelt | 1:5000 | Sigma |
| Anti-Digoxygenin F(ab) ₂ -Fragmente, Peroxidase gekoppelt | 1:5000 | Roche |
| Fluorochrom gekoppelt | | |
| Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Kaninchen IgG | 1:260 | Invitrogen |
| Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Kaninchen IgG | 1:350 | Invitrogen |
| Alexa Fluor 488 Ziege-anti-Maus IgG | 1:300 | Invitrogen |
| Alexa Fluor 568 Ziege-anti-Maus IgG | 1:350 | Invitrogen |
| FITC Ziege-anti-Kaninchen IgG | 1:100 | Dianova |
| DC-Klassifizierungs Antikörper (Fluorochrom gekoppelt) | | |
| FITC-Maus-anti-Human CD11c IgG1 | 1:20 | Ancell |
| R-PE-Maus-anti-Human CD11c IgG1/IgG2a | 1:20/1:50 | Caltag/BD Pharmingen |
| R-PE-Maus-anti-Human CD14 IgG2a | 1:20 | BD Pharmingen |
| R-PE-Maus-anti-Human CD25 IgG1 | 1:20/1:50 | Caltag/ BD Pharmingen |
| FITC-Maus-anti-Human CD40 IgG1 | 1:20 | Caltag |
| FITC-Maus-anti-Human CD83 IgG1 | 1:20 | Caltag |
| R-PE-Maus-anti-Human CD86 IgG1 | 1:20 | Caltag |
| Isotyp FITC-Maus-anti IgG1 | 1:20 | Ancell |
| Isotyp R-PE-Maus-anti IgG1 | 1:20 | BD Pharmingen |
| Isotyp R-PE-Maus-anti IgG2a | 1:20 | Miltenyi Biotec |
| Isotyp R-PE-Maus-anti IgG2b | 1:20 | Caltag |

Tabelle 31: Verwendete Antikörper und die eingesetzten Verdünnungen.

6.5 Proteine, Inhibitoren und sonstige Faktoren

Folgende Proteine, Inhibitoren und andere Faktoren, wie Lipopolysaccharide oder Wachstumsfaktoren, wurden für bestimmte Methoden verwendet.

| Proteine | Quelle/Firma |
|--|--|
| His ₆ -PavA (63 kDa) | Rekombinant aufgereinigt, eigene Herstellung |
| Verkürztes His ₆ -PavA (42 kDa) | Rekombinant aufgereinigt, eigene Herstellung |
| Maltose-Bindungsprotein MBP | Rekombinant aufgereinigt (NEB), eigene Herstellung |
| MBP-PavA Fusionsprotein | Rekombinant aufgereinigt (NEB), eigene Herstellung |
| Annexin V-FITC konjugiert | Biosource |
| Phalloidin Alexa 488 konjugiert | Invitrogen |

Tabelle 32: Verwendete rekombinante Proteine.

| Inhibitor | Hemmfunktion | Arbeitskonzentration | Firma |
|--------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| CytochalsinD | Aktinpolymerisation | 250 nM | MP Biochemicals |
| Nocodazol | Mikrotubulibewegung | 10 µM | Sigma |

Tabelle 33: Eingesetzte zelluläre Inhibitoren.

| Faktoren | Funktion | Arbeitskonzentration | Firma |
|---|-------------------------|----------------------|-----------|
| Granulocytes-macrophages colony stimulating factor (GM-CSF) | DC-Kultivierung | 20 IU/ml | Strathman |
| Interleukin-4 (IL-4) | DC-Kultivierung | 16 IU/ml | Strathman |
| LPS (<i>E. coli</i> Lipopolysaccharide) | DC-Aktivierung | 0,5 µg/ml | Sigma |
| FITC | Pneumokokken-Markierung | 2 mg/ml | Sigma |

Tabelle 34: Überblick über den Einsatz von GM-CSF, IL-4, LPS und FITC.

6.6 Plasmide und Oligonukleotide

Für die Klonierung des Fusionsproteins MBP-PavA wurde das Plasmid pMAL-c2X von der Firma NEB verwendet.

| Plasmid | Genetische Eigenschaft | Resistenz | Größe |
|----------|--|------------------|--------|
| pMAL-c2X | Ori pBR322, <i>lacI</i> , <i>malE</i> , MCS, <i>lacZα</i> , <i>rmB</i> | amp ^R | 6,6 kb |

Tabelle 35: Eigenschaften des verwendeten Plasmids pMAL-c2X.

Molekularbiologische Untersuchungen wurden mit folgenden Oligonukleotiden durchgeführt.

| Name | T _M (°C) | Sequenz (5'-3') |
|------------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Bakterielle Oligonukleotide | | |
| aliAR ₁ | 68,8 | CATAGGCATCCAACCCTTTGATTG |
| dexBF ₂ | 65,8 | GAATCAGGCGACCTTTGGAG |
| dex19F revers | 67,8 | GCTCTCGTCCCATTGCATAGG |
| Enolase forward | 68 | ATGTCAATTATTACTGATGTTTACGC |
| Enolase revers | 68 | TTATTTTTTAAGGTTGTAGAATGATTC |
| Humane Oligonukleotide | | |
| hsIL-1β forward | 74 | CAGGGACAGGATATGGAGCAACAA |
| hsIL-1β revers | 76 | CATCTTTCAACACGCAGGACAGGT |
| hsIL-6 forward | 72 | CACCCCTGACCCAACCACAAAT |

| Name | T _M (°C) | Sequenz (5'-3') |
|-------------------------------|---------------------|----------------------------|
| Humane Oligonukleotide | | |
| hsIL-6 revers | 70 | TCCTTAAAGCTGCGCAGAATGAGA |
| hsIL-8 forward | 64 | GACCACACTGCGCCAACACA |
| hsIL-8 revers | 70 | CAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTCCA |
| hsIL-10 forward | 70 | CCGCCTCAGCCTCCCAAAGT |
| hsIL-10 revers | 76 | CCCTAACCTCATTCCCCAACCCAC |
| hsIL-12p35 forward | 60 | GCCGCGGCCACAGGTCT |
| hsIL-12p35 revers | 70 | GTGGCCACGGGGAGGTTTCT |
| hsIL-12p40 forward | 60 | ATTGAGGTCATGGTGGATGC |
| hsIL-12p40 revers | 54 | GCCGCAAAAATGCCAGCATT |
| hsIFN- γ forward | 66 | TAGCAACAAAAAGAAACGAGATGACT |
| hsIFN- γ revers | 64 | CCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAG |
| hsTNF- α forward | 68 | AGGCCAAGCCCTGGTATGAGC |
| hsTNF- α revers | 70 | CACAGGGCAATGATCCCAAAGTAG |
| hsGAPDH forward | 74 | CGGGGCTCTCCAGAACATCATCC |
| hsGAPDH revers | 70 | CCAGCCCCAGCGTCAAAGGTG |
| hsRibProtS9 forward | 74 | CTTAGGCGCAGACGGGGAAGCG |
| hsRibProtS9 revers | 80 | CGAAGGGTCTCCGCGGGGTACAT |

Tabelle 36: Verwendete Oligonukleotide und deren Sequenz (T_M bezeichnet die berechnete Schmelztemperatur).

6.7 DNA/RNA-Größenstandards

Für molekularbiologische Untersuchungen wurden folgende DNA bzw. RNA Größenstandards verwendet.

| Marker | Bandengröße der DNA/RNA-Fragmente (bp) | Firma |
|-----------------|--|------------|
| 1 kb DNA Ladder | 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 5000 | NEB |
| 1 kb-Ladder-Mix | 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 | MBI |
| 1 kb DNA-Ladder | 12000, 5000, 2000, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 | Invitrogen |
| RNA-Marker | 6583, 4981, 3638, 2604, 1908, 1383, 955, 623, 281 | Promega |

Tabelle 37: DNA/RNA Größenstandards.

6.8 Proteinstandard

Als Größenstandard diente ein Molekulargewichts-Marker mit acht vorgefärbten Eichproteinen von NEB.

| Protein | Molekulargewicht (kDa) |
|-----------------------------|------------------------|
| MBP- β -Galaktosidase | 175 |
| MBP-Paramyosin | 83 |
| MBP-CBD | 62 |
| Aldolase | 47,5 |
| Triosephosphat Isomerase | 32,5 |
| B-Lactoglobulin A | 25 |
| Lysozym | 16,5 |
| Aprotinin | 6,5 |

Tabelle 38: Proteingrößenstandard (broad range, NEB).

6.9 Enzyme

Katalytische Reaktionen wurden mit folgenden Enzymen durchgeführt.

| Enzym | Funktion | Firma |
|----------------------------------|--------------------------------------|------------|
| <i>Taq</i> DNA-Polymerase | DNA-Amplifikation | NEB |
| AmpliTaQ Gold (hot start) | DNA-Amplifikation | Invitrogen |
| Expand High fidelity PCR-System | DNA-Amplifikation | Roche |
| SuperScript TM III RT | Reverse Transkription, cDNA-Synthese | Invitrogen |
| RNase A | RNA-Degradation | AppliChem |
| DNase 1 | DNA-Degradation | QIAGEN |
| Lysozym | Protein-Abbau | Sigma |
| Mutanolysin | RNase-Inhibition | Sigma |
| Trypsin | Protein-Abbau | PAA |

Tabelle 39: Verwendete Enzyme und ihre katalytische Funktionen.

6.10 Molekular- und Immunbiologische Kits

Für bestimmte molekularbiologische und immunologische Arbeiten wurden folgende Kits verwendet.

Molekularbiologische Kits

| | |
|---|------------|
| Dig Oligonukleotide 3'-End Labeling and Detection Kit | Roche |
| QIAGEN genomic DNA Kit | QIAGEN |
| QIAGEN PCR-Purification Kit | QIAGEN |
| QIAGEN RNeasy TM Mini Kit | QIAGEN |
| QIAGEN RNase free DNase 1 Kit | QIAGEN |
| FastStart Universal SYBR Green TM Master (ROX) Kit | Roche |
| RNase OUT | Invitrogen |

Protein-Quantifizierung

| | |
|------------------|-------|
| Bradford Reagent | Sigma |
|------------------|-------|

Zellkultur Kits:

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| Annexin-V FITC Apoptose Kit | Invitrogen/Biosource |
|-----------------------------|----------------------|

Immunologische Kits:

| | |
|--|----------------------|
| Human inflammatory Five-Plex Antibody Bead Kit | Invitrogen/Biosource |
| Human IL-12p40/p70 Antibody Bead Kit | Invitrogen/Biosource |
| Human IL-12p70 Antibody Bead Kit | Invitrogen/Biosource |
| Human IL-10 Antibody Bead Kit | Invitrogen/Biosource |
| Human IFN- γ Antibody Bead Kit | Invitrogen/Biosource |

6.11 Puffer und Lösungen

| | |
|-----------------------|---|
| Cacodylatpuffer | 0,1 M Cacodylat (Dimethylarseninsäure Natriumsalz-Trihydrat), 0,09 M Sucrose, 0,01 M MgCl ₂ , 0,01 M CaCl ₂ |
| Chloronaphthol-Färber | eine 4-Chloro-1-Naphthol Tablette (Sigma) in 10 ml Methanol |
| Citratpuffer | 0,106 M Na-Citrat ad 1 l H ₂ O |
| Coomassie-Entfärber | 40% Methanol, 10% Eisessig |
| Coomassie-Färbelösung | 50% Methanol; 5,8% Eisessig, 0,2% Coomassie Brilliant Blue TM R250 |

| | |
|-------------------------------|--|
| DIF-Fixierungslösung | 1-3% PFA in 1 x PBS |
| DNA-DNA Hybridisierung | |
| High-SDS-Puffer | 7% SDS, 50% Formamid, 5 x SSC, 50 mM NaPO ₃ , pH 7,0, 0,1% N-Laurylsarcosin , 2% Blockreagenz (Roche) |
| Maleinsäure-Puffer | 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 |
| Waschpuffer | 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween® |
| Absättigungspuffer | Maleinsäure-Puffer, 1% Blocking-Reagenz (Boehringer) |
| Detektionspuffer | 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5 |
| 6 x DNA Probenpuffer | 25% Bromphenolblau, 25% Xylencyannol, 15% Ficoll |
| EM-Fixierungslösung | Cacodylatpuffer, 2% Glutaraldehyd, 3% Formaldehyd |
| Ethidiumbromidlösung | 100 µl EtBr Stock, 200 ml dest. H ₂ O |
| FACS-Fixierungslösung | 1% PFA, 0,5% FBS in 1x PBS, pH 7,4 |
| Fluoreszenz-Fixierungslösung | 1-3,7% PFA/PBS |
| Kolloidal Coomassie | |
| Lösung I: Blue Stocklösung | 5 g Coomassie Brilliant Blue™ G-250 100 ml dest. H ₂ O |
| Lösung II: Dye Stocklösung | 50 g Ammoniumsulfat, 12 ml 85% Phosphorsäure ad 490 ml dest. H ₂ O, 10 ml Lösung I |
| Lösung III: Färbelösung | 200 ml Lösung II, 50 ml Ethanol |
| Gelatine-Lösung | 0,1% Gelatine in 1 x PBS |
| Glukose-Puffer | 30 mM Na-Citrat, 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 9,6 mM D-Glukose, pH 6,5 |
| IPTG-Stock | 1 M IPTG in dest. H ₂ O |

Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* (QIAGEN-Angaben)

| | |
|------------------------------|--|
| Puffer B1 | 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0, 0,5% Tween®, 0,5% Triton X-100 |
| Puffer B2 | 3 M Guanidin HCl, 20% Tween® |
| Puffer QBT | 750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol 0,15% Triton-X-100 |
| Puffer QC | 1 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7,0, 15% Isopropanol |
| Puffer QF | 1,25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 15% Isopropanol |
| Moviol-Lösung | 20 g Moviol 4-88 (Farbwerk Hoechst) in 80 ml 1 x PBS durch Rühren lösen, 40 ml Glycerin zugeben und über Nacht rühren, Lösung für eine Stunde bei 26000 x g zentrifugieren und den Überstand verwenden |
| Natriumcarbonatpuffer | 10 ml 0,1 mol/l Na-Carbonat, 90 ml 0,1 mol/l Na-hydrogencarbonat, pH 9,2 |
| Paraformaldehyd | 37% in PBS unter Rühren auf 70°C erhitzen, tropfenweise 0,1 M NaOH bis zur Lösung zugeben, filtrieren und aliquotiert bei -20°C lagern |
| PBS/EDTA | 10 mM PBS, 2 mM EDTA pH 7,5 |
| 1 x PBS | 37 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 80 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 |
| Poly-D-Lysin | 10 µg/ml in 1 x PBS |
| Saponinlösung | 1% Saponin in Zellkulturmedium, sterilfiltriert |
| 10 x MOPS RNA-Running Puffer | 0,4 M MOPS, pH 7,0, 0,1 M Na-Acetat, 0,01 M EDTA |

SDS-Silberfärbung

| | |
|-------------------------|---|
| Lösung 1: | 30% EtOH, 0,5% Glutaraldehyd (25%), 0,5 M Na-Acetat (60 g/l), 0,2% Na ₂ S ₂ O ₃ (3,14 g/l) |
| Lösung 2: | 0,1% AgNO ₃ (1 g/l), 0,02% Formaldehyd (37%) |
| Lösung 3 | 2,5% Na ₂ CO ₃ , 0,01% Formaldehyd, pH 11,3 - 11,8 |
| Lösung 4: | 0,05 M EDTA |
| SDS-Page-Probenpuffer | 25% 0,5 M Tris-HCl, pH6,8, 20% Glycerin, 5% SDS, 5% Bromphenolblaulösung, 10% 2- Mercaptoethanol |
| 8 x SDS-Page-Laufpuffer | 120 mM Tris, 0,96 M Glycin, 0,5% SDS |

Southern Blot Verfahren

| | |
|-----------------|--|
| Lösung A | 0,25 M HCl |
| Lösung B | 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH |
| Lösung C | 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 5,1 |
| 20 x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0 |
| 50 x TAE | 2 M Tris, 0,6 M EDTA, 0,57% Eisessig |
| TE-Puffer | 20 mM Tris-HCl pH 7,0, 1 mM EDTA |
| TES-Puffer | 50,0 mM Tris; 5,0 mM DiNaEDTA; 10,0 mM NaCl, pH 8,0 |
| Transfer-Puffer | 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol Trichloressigsäure (100%) 500 g Trichloressigsäure, 227 ml dH ₂ O |
| Trypanblau | Trypan Blue Stain 0,4% in PBS |

| Komponenten | Sammelgel 4% | Trenngel | |
|------------------------------|-----------------|----------|--------|
| | | 10% | 12% |
| dest. H ₂ O | 2,5 ml | 3,0 ml | 2,5 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30%) | 0,5 ml | 2,5 ml | 3,0 ml |
| Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 | - | 1,9 ml | 1,9 ml |
| Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 | 1,0 ml | - | - |
| 10% SDS | 40 µl | 75 µl | 75 µl |
| APS (10%) | 20 µl | 40 µl | 40 µl |
| TEMED | 4 µl | 4 µl | 4 µl |

Tabelle 40: Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele.

7 Methoden

7.1 Mikrobiologische Methoden

7.1.1 Kultivierung von *S. pneumoniae* und *E. coli*

S. pneumoniae Stämme wurden über Nacht auf Blutagarplatten aus Glyzerinkonserven bei 37°C kultiviert. THY-Flüssigkulturen wurden mit *S. pneumoniae* von Blutagarplatten mit einer Start-OD₆₀₀ von $\leq 0,05 - 0,08$ angeimpft. Die Kultivierung der Flüssigkulturen erfolgte stehend bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank bis zum Wachstumsstadium einer OD₆₀₀ von 0,35 bis 0,4. *E. coli* Stämme wurden auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Für die Flüssigkulturen wurden 10 ml LB-Medium mit Kolonien beimpft und über Nacht bei 37°C mit 200-250 rpm geschüttelt. Mutanten mit Antibiotikagenkassette wurden zu Selektionszwecken mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

7.1.2 Konservierung von Bakterien

Für die Stammkulturhaltung über längere Zeit wurden Kulturen der Bakterien in 25% (v/v) Glycerol in Medium angelegt und bei -80°C aufbewahrt. Die *S. pneumoniae* Stämme wurden auf den entsprechenden Agarplatten über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen mit einem Wattestab abgenommen und in 1 ml Medium mit 25% Glycerin ausgedrückt und bei -80°C eingefroren.

7.1.3 Transformation von *S. pneumoniae*

Bei *S. pneumoniae* handelt es sich um einen natürlich transformierbaren Organismus. Seine optimale Kompetenz wird in der frühen exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,18) erreicht und durch das kompetenzstimulierende Peptid (CSP) maximiert. Der Ausgangsstamm wurde vor der Transformation zweimal in Folge auf Blutagarplatten kultiviert, in CpH8-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,03 bis 0,04 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,15 gezüchtet. Es wurde 1 ml der Bakteriensuspension mit 1 µg CSP versetzt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Nach genau 4 min auf Eis wurden zu je 250 µl der Kultur 200 ng – 1 µg DNA zugegeben und zunächst für 30 min bei 30°C und dann für 90 min bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf eine Blutagarplatte gegeben, die das für die Selektion benötigte Antibiotikum in einer

verringerten Konzentration enthielt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden transformierte Pneumokokken-Klone auf Blutagarplatten mit höherer Antibiotikakonzentration selektioniert.

7.1.4 Herstellung von FITC-konjugierten Pneumokokken

Zur unspezifischen Fluoreszenzmarkierung von *S. pneumoniae* wurden die Bakterien in THY-Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35 gezüchtet und bei 4500 rpm 10 min sedimentiert. Das Bakteriensediment wurde in 1 ml 0,1 M Na-Carbonat Puffer (pH 9,2) aufgenommen und mit 500 µl FITC-Lösung (2 mg/ml FITC in Na-Carbonat Puffer) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die markierten Pneumokokken wurden dreimal mit Na-Carbonat Puffer gewaschen.

7.2 Methoden für das Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Beim Arbeiten mit Zellen bedarf es einer sauberen und sterilen Technik. Die Zellkultur sollte stets vom mikrobiologischen Arbeitsfeld getrennt werden. Kontaminationen vor angesetzten Versuchen würden den experimentellen Verlauf der Experimente stören und die Resultate verfälschen. Um einer Kontamination durch unerwünschtes Fremdmaterial, wie Pilze oder Mikroorganismen, entgegen zu wirken, wurde mit dem Zusatz von Antibiotika gearbeitet.

7.2.1 Gewinnung von humanem Vollblut und Leukozytenkonzentrat

Monozyten machen im Blut einen zellulären Anteil von 10% aller Leukozyten aus. Für diese Arbeit wurden Monozyten aus peripherem humanem Vollblut gewonnen. Dafür wurden verschiedene Methoden verwendet. Bei der Leukapherese wurden Lymphozyten aus dem Blut eines Spenders herausgefiltert, während das Erythrozytenkonzentrat wieder dem Organismus zugeführt wurde. Diese Methode wird professionell für Plasmaspenden eingesetzt. Die gefilterten Lymphozyten werden in ihrer Erythrozyten-depletierten Form als Buffy Coats (BCs) bezeichnet. Bei der standardmäßigen Erythrozytenspende des Deutschen Roten Kreuz (DRK) werden sofort die lymphatischen Zellkomponenten herausgefiltert. Die gefilterten Zellen konnten mit Medium bzw. PBS aus der Filtervorrichtung herausgespült werden. Die konzentrierten Lymphozyten konnten als Filter BCs vom DRK käuflich erworben werden. Die direkte Abnahme von ca. 200 ml peripherem Vollblut aus der Armbeuge von freiwilligen Spendern wurde außerdem zur

Blutgewinnung eingesetzt. Zur Hemmung der Blutgerinnung wurde das Vollblut nach der Abnahme mit Citrat-Lösung in einem Mengenverhältnis von 1:5 verdünnt.

7.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten

Die Auftrennung der Blutzellen erfolgte entweder über die Größe mittels Elutration oder über die Dichte der Einzelkomponenten mittels eines Dichtegradienten. Bei der Elutramethode handelt es sich um ein Zellseparationssystem. Zelluläre Mischpopulationen werden gemäß ihrer spezifischen Größe und Dichte in Einzelfraktionen aufgetrennt. Nach systematischer Zellanreicherung des gewünschten Zelltyps liefert die Elutra ein hohes Maß an Reinpopulationen. Die elutrische Auftrennung wurde für die Aufbereitung der Monozyten aus der Leukapherese verwendet. Die fraktionierten Monozyten wurden nach der elutrischen Separation sofort in Kultur gebracht.

Bei der Dichtegradienten-Methode wurden 15 ml Lymphozytentrennmedium mit maximal 35 ml Filter BCs bzw. Vollblut/Citrat überschichtet. Die Gradienten wurden bei 400 x g ohne Bremse für 30 min abzentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen zellulären Größe und Dichte erfolgte eine definierte Separation der mannigfaltigen Blutzellen (Abbildung 31). Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, pro Spender vereint, bei 280 x g für 10 min sedimentiert und mit 1 x PBS gewaschen. Die im Sediment befindlichen Monozyten und Lymphozyten wurden in warmen 10% FBS/RPMI 1640 Kultivierungsmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen mit einer Dichte von maximal 3×10^6 /ml überführt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden ca. 10 µl der Zellsuspension mit Trypan-Blau in einem Mischverhältnis von 1:2 versetzt. Im Lichtmikroskop wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer berechnet. Die lebenden Monozyten lagen als große, granuläre und ungefärbte Zellen vor. Totes Zellmaterial hingegen erschien blau gefärbt. Aus der Lymphozytenmischpopulation wurden die Monozyten aufgrund ihrer Adhärenzfähigkeit selektioniert. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, wurden nicht-adhärenente Zellen im Überstand aus der Kultur entfernt. Der Schalenboden des Kulturgefäßes wurde mindestens zweimal mit sterilem 1 x PBS gewaschen. Die adhärenente Monozyten wurden mit ca. 10 ml DC-Kulturmedium (10% FBS/RPMI 1640 mit Pen/Strep) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Bei regelmäßigem Wechsel des Mediums blieben die Monozyten ca. 6-7 Tage aktiv und lebensfähig.

7.2.3 Ausdifferenzierung von Monozyten zu DCs

Zur Ausdifferenzierung von Monozyten zu DCs wurden dem Kultivierungsmedium (10% FBS/RPMI 1640/Pen/Strep) 16 U/ml IL-4 und 20 U/ml GM-CSF zugegeben (Romani *et al.*, 1994). Das Zytokinmedium wurde mindestens alle drei Tage erneuert. Ausdifferenzierte Zellen verlieren ihre Adhärenzfähigkeit und gehen in den Kulturüberstand über. Deshalb wurde beim Mediumwechsel die Hälfte des Gesamtvolumens abgenommen. Bereits ausdifferenzierte DCs wurden bei 280 x g 10 min sedimentiert und in frisches Medium überführt. Die maximale Anzahl an unreifen DCs wurde nach insgesamt 5 Tagen Aufzucht und 3 maligem Mediumwechsel erzielt. Die Induktion der Ausreifung erfolgte nach 5 Tagen mit der Zugabe von 0,5 µg/ml aufgereinigtem *E. coli* LPS für 18 h bis 48 h. Die Entwicklung der Zellen konnte mit Hilfe wechselnder Oberflächenbeschaffenheiten zytometrisch erfasst werden (siehe 7.5.1). DCs produzieren CD11c an ihrer Zelloberfläche während Monozyten CD14 exponieren. Diese Oberflächenmarker sind für entsprechende Zelltypen spezifisch. Ausgereifte DCs weisen eine Vielzahl an hoch regulierten Oberflächenstrukturen auf, worin sie sich von unreifen DCs unterscheiden (Abbildung 32).

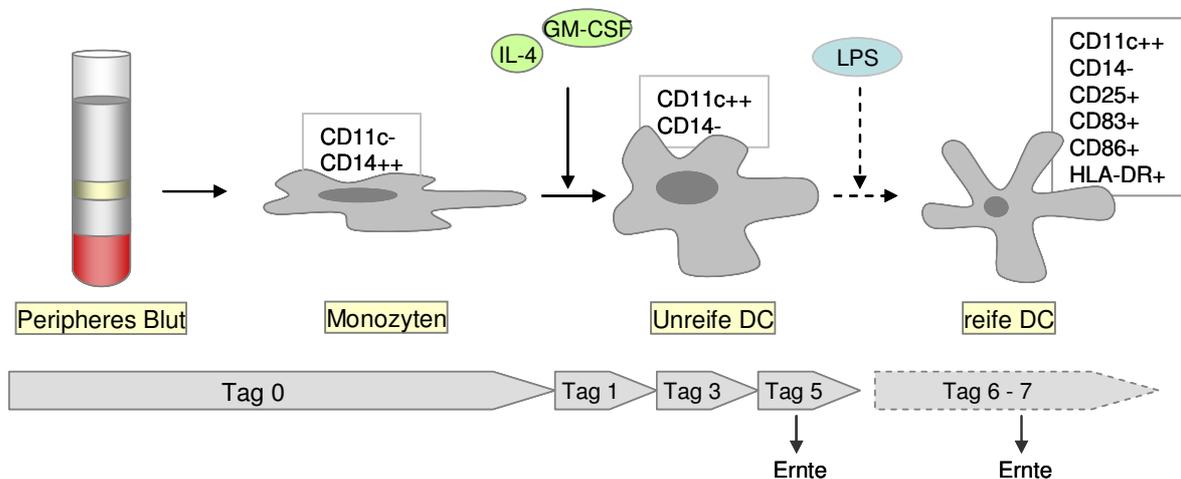


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Kultivierung von Monozyten und der Anzucht zu DCs. Über einen Gradienten werden Blutzellen gemäß ihrer Dichte separiert. Monozyten werden aus der Interphase mit Hilfe der Adhärenzselektion konzentriert und kultiviert. Der regelmäßige Zusatz von GM-CSF und IL-4 führt zur gezielten Ausdifferenzierung zu unreifen DCs. Das Optimum wird nach 5 Tagen Kultivierung erzielt. Die Zugabe von aufgereinigtem *E. coli* LPS führt zur Ausreifung der Zellen innerhalb von 2 Tagen. Die Stärke exponierter Oberflächenmarker wurde mit Plus und Minus dargestellt. (eigene Darstellung).

7.2.4 Kultivierung von J774-Makrophagenzellen

Die Kultivierung von J774-Makrophagen erfolgte in Zellkulturflaschen mit ca. 20 ml 10% FBS/DMEM high Glucose Medium versetzt mit Pen/Strep bei 37°C und 5% CO₂. Die Generationszeit dieser proliferierenden Zelllinie betrug unter diesen Kultur-Bedingungen 36 h. Zur Aufteilung eines konfluenten Zellrasens auf neue Kulturflaschen oder zum Aussäen für Infektionsversuche wurden die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden 2 min mit 5 ml Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde von den Zellen entfernt und die Zellen mit 5 ml Infektionsmedium versetzt. Darin wurden die Zellen vom Flaschenboden abgespült. Für die Subkultivierung wurden die Zellen in frisches Kulturmedium transferiert, nach Bedarf verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Zum Aussäen mit definierter Zellzahl, z.B. bei der Vorbereitung eines Infektionsversuches, wurden die Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, je nach Versuchsansatz verdünnt und in 96- bzw. 24-Zellkulturplatten transferiert.

7.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Durch Lagerung in flüssigem Stickstoff können Zellen über viele Jahre kryokonserviert werden. J774-Zellen wurden als Suspension im Kulturmedium unter Zusatz von 10% FBS und 10% DMSO eingefroren. Der zu 80% konfluente Zellrasen wurde mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale abgelöst (siehe 7.2.4). Die Zellen wurden in 1,6 ml Medium und 0,2 ml FBS resuspendiert und zu jeweils 0,9 ml auf zwei Cryoröhrchen, supplementiert mit 0,1 ml DMSO, gegeben. Isolierte Monozyten wurden als Suspension in 100% FBS und 10% DMSO mit einer Konzentration von maximal 3×10^7 Zellen/ml konserviert. Die Röhrchen wurden zunächst für 24 h in einem Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C eingefroren (NalgeneTMCryo 1°C Freezing Container). Der Einfriercontainer ermöglichte eine kontrollierte Verringerung der Temperatur um 1°C/min. Die Bildung von schädigenden Kristallen wurde somit vermieden. Danach wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

7.2.6 Auftauen von Zellen

Zur Kultivierung wurden die gelagerten Zellen im Cryoröhrchen bei 37°C nahezu vollständig aufgetaut. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml vorgewärmtem Kultivierungsmedium versetzt, um die schädliche Wirkung der vorhandenen DMSO-

Lösung zu hemmen. Aufgetaute Monozyten wurden bei 280 x g 10 min abzentrifugiert. J774-Zellen wurden bei 800 rpm für 4 min sedimentiert. Die Zellsedimente wurden mit Kulturmedium versetzt und in entsprechenden Zellkulturgefäßen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

7.2.7 Zellzahlbestimmung

Das Aussäen von definierten Zellkonzentrationen erforderte die genaue Bestimmung der Zellanzahl in Suspension. Dazu wurden ca. 10 µl einer Zellsuspension in eine Neubauer-Zellkammer gegeben. Je Großquadrat wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Zellen ausgezählt. Unter Berücksichtigung des Kammerfaktors wurde wie folgt die absolute Zellzahl pro ml Suspension bestimmt.

$$\text{Anzahl der Zellen pro Großquadrat} \times 10^4 \text{ (Volumen des Großquadrates entspricht } 10^{-4} \text{ ml)} = \text{Zellzahl/ml.}$$

7.2.8 Nachweis der zellulären Apoptose und Nekrose bei DCs mittels Durchflusszytometrie

Zum Nachweis der durch Pneumokokken induzierten Apoptoserate bei DCs wurde das Annexin-V FITC Apoptose Kit der Firma Invitrogen verwendet. Das Protein Annexin-V besitzt eine hohe Affinität zu Phospholipiden, speziell für Phosphatidylserin. Phospholipide werden in einer frühen Phase der Apoptoseinduktion in großen Mengen an die Zelloberfläche transferiert. Durch Fluorochrom-gekoppeltes Annexin-V kann dieser Apoptoseeffekt zytometrisch gemessen und quantifiziert werden. In der späten Phase des Zelltods permeabilisiert die Zellmembran und die Zelle wird für DNA-interkalierende Substanzen zugänglich. Die Unterscheidung zwischen frühen und späten apoptotischen Stadien erfolgte mit Annexin-V FITC (grün) und dem Farbstoff Propidiumiodid (PI). Bei PI handelt es sich um einen rot-fluoreszierenden Farbstoff, der DNA-interkalierend ist. Aufgrund der unterschiedlichen Detektionsfarbstoffen konnte hier eine Doppelfärbung der Zellen durchgeführt werden. Für die Färbung wurde für 1×10^5 DCs 100 µl Annexin-V Färbepuffer eingesetzt. Nach Zugabe von 2,5 µl Annexin-V FITC und 5 µl PI-Puffer wurde die Probe im Dunkeln für 15 min inkubiert und zur zytometrischen Messung mit 200 µl Färbepuffer verdünnt. Im Durchflusszytometer FACS Canto II (Becton Dickinson) wurden

die Proben aufgenommen, gemessen und mit der Software FACS Diva (Becton Dickinson) ausgewertet.

7.3 Methoden zur Untersuchung der Interaktion zwischen *S. pneumoniae* und APCs

Beim Krankheitsverlauf besiedeln pathogene Mikroorganismen verschiedene Gewebearten eines Organismus. Bei dieser Interaktion kommen Mikroorganismen in Kontakt mit dem angeborenen unspezifischen Immunsystem. Über stark phagozytisch aktive Immunzellen, wie Granulozyten, DCs und Makrophagen wird das Immunsystem aktiviert. Die bakterielle Interaktion mit diesen immunologischen Wirtszellen wurde experimentell mit Hilfe von *in vitro* Infektionsversuchen quantitativ erfasst. Dabei wurden Makrophagenzellen (J774) bzw. primäre DCs mit unterschiedlichen *S. pneumoniae* Stämmen und Mutanten unter definierten Laborbedingungen infiziert. Die Adhärenz bzw. die Aufnahme der Bakterien in die Zellen wurde durch nachfolgend beschriebene Nachweismethoden quantifiziert.

7.3.1 Kultivierung von *S. pneumoniae* für Infektionsversuche

Pneumokokken wurden in den *in vitro* Infektionsversuchen mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 50 eingesetzt. Die Ratio errechnete sich durch die eingesetzte Pneumokokkenkonzentration in Suspension bezogen auf die vorliegende Zellanzahl pro Infektionsansatz. Pneumokokken wurden im THY-Medium bis zu einer Dichte von OD₆₀₀ 0,35 kultiviert und bei 4500 rpm für 5 min sedimentiert. Die Bakterien wurden einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Davon wurde photometrisch die Bakterienanzahl von 10 µl bestimmt. Eine OD₆₀₀ von 1 pro ml entspricht empirischen 1×10^9 Bakterien. Die gewünschte Konzentration an Pneumokokken wurde in Infektionsmedium eingestellt. Dabei wurde die 20-fache Konzentration verwendet, da jeder Infektionsansatz nur mit 50 µl der eingestellten Bakteriensuspension infiziert wurde.

7.3.2 Präinkubation von *S. pneumoniae* für Infektionsversuche

Für die funktionelle Komplementation von Pneumokokkenmutanten durch aufgereinigte Proteine, wie MBP und MBP-PavA, wurden Bakterien vor der Durchführung der Infektion mit den Proteinen präinkubiert. Die Bakterien wurden für die Infektion vorbereitet (siehe 7.3.1) und mit Zugabe von MBP bzw. MBP-PavA verschiedener Konzentrationen bei

37°C für 1 h gehalten. Die Infektion erfolgte mit der Inokulierung mit der präinkubierten Bakteriensuspension.

7.3.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen für Infektionsversuche

J774-Makrophagen wurden bis zu einer 80% Konfluenz in Kulturflaschen gezüchtet, mit Trypsin/EDTA Behandlung vom Flaschenboden abgelöst und bei 800 rpm für 4 min sedimentiert. Die Zellanzahl wurde mittels Neubauerkammer im Lichtmikroskop bestimmt. Die Zellen wurden mit einer bestimmten Zellanzahl entweder in 24-, oder 96-Platten überführt und bis zur weiteren Verwendung gezüchtet. Verdünnten Zellen konnten ein Tag oder 2 Tage vor Versuchsdurchführung mit entsprechenden Konzentrationen ausgesät werden. Der Versuch wurde mit einem konfluenten Zellrasen durchgeführt. Gezüchtete DCs wurden am Tag des Infektionsversuches mit dem Kulturüberstand abgenommen und bei 280 x g 10 min in der Schwingzentrifuge sedimentiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer Neubauerzählkammer wurde die Zellausbeute bestimmt. Unter Berücksichtigung des Kammerfaktors wurde die vorliegende Zellkonzentration pro ml berechnet. Die gewünschte Zellkonzentration wurde in die Infektionsplatten überführt. Für Mikroskopieaufnahmen wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Platten ausgesät. Die nicht-adhärenenten DCs wurden 1 h vor Infektion auf die Glasplättchen transferiert und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für andere Versuche wurden die Zellen in 96-Platten kultiviert. Folgende Zellkonzentrationen wurden in verschiedenen Infektionsversuchen eingesetzt.

| Zellen | Zelleinsatz 24-Platten pro Kavität | | | Zelleinsatz 96-Platten pro Kavität | | |
|--------|------------------------------------|------------------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| | 2 d | 1 d | 0 d | 2 d | 1 d | 0 d |
| J774 | 2,5 x 10 ⁵ | 3,75 x 10 ⁵ | 5 x 10 ⁵ | 5 x 10 ⁴ | 7,5 x 10 ⁴ | 1 x 10 ⁵ |
| DCs | - | - | 5 x 10 ⁵ | - | - | 1 x 10 ⁵ |

Tabelle 41: Anzahl ausgesäter J774-Zellen 2 Tage bzw. 1 Tag (2 d, 1 d) vor Infektion und die theoretische Zahl am Tag der Infektion (0 d) bzw. der eingesetzten DC-Anzahl.

7.3.4 Präinkubation der eukaryotischen Zellen für Infektionsversuche

Zur Inhibition des Zytoskeletts wurden Zellen mit Antibiotika-freiem Medium gewaschen und mit Cytochalasin D (CytD) bzw. Nocodazol (Noco) präinkubiert. Cytochalasin D hemmt die Polymerisierung von Aktinfilamenten, wohingegen Nocodazol den Aufbau von Mikrotubuli verhindert (siehe 6.5). Von Cytochalasin D wurden den Zellen 250 nM und

von Nocodazol 10 μM zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 für Cytochalasin D und bei 4°C für Nocodazol. Die Nocodazol-behandelten Zellen wurden außerdem bei 37°C für weitere 30 min gehalten.

7.3.5 Infektionsversuche und verlängerte Stimulierung von DCs

Die vorbereiteten Zellen (siehe 7.3.3) wurden mit Pneumokokken standardgemäß mit einer MOI von 50 infiziert. Für Immunfluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen auf Glasplättchen in 24-Kulturplatten in einem Gesamtvolumen von 500 μl inokuliert. Für Antibiotika-Protektions-Versuche wurden 96-Kulturplatten mit 50 μl Zellsuspension vorbereitet. Für durchflusszytometrische Analysen und für die Transmissionsmikroskopie wurden die Infektionen in Suspension in 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Zellen wurden standardmäßig mit 50 μl Bakteriensuspension inokuliert. Kurz vor der Infektion wurde das antibiotikahaltige Kulturmedium von den Zellen entfernt und durch Infektionsmedium (Grundmedium supplementiert mit 1% FBS) ersetzt. Zur Synchronisation wurden nach Zugabe der Bakteriensuspension die Zellkulturplatten bei 700 rpm für 4 min zentrifugiert. Die Infektion wurde bei 37°C und 5% CO_2 für maximal 60 min durchgeführt. Die Zellen wurden 3-mal mit warmen RPMI bzw. DMEM-Medium gewaschen und für Immunfluoreszenzfärbungen bzw. REM und TEM entsprechend fixiert und aufbereitet (siehe 7.4). Für eine verlängerte Stimulierung der DCs z.B. für Zytokinexpressionsversuche, Maturationsnachweise und T-Zellaktivierungstests wurden extrazelluläre Bakterien durch die Inkubation von 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin und 100 U/ml Penicillin G für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 abgetötet. Das antibiotikahaltige Medium wurde durch Zentrifugation gewaschen und die Zellen für weitere 2 – 48 h in Infektionsmedium (RPMI1640/1%FBS) bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

7.3.6 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Zur Visualisierung adhärenter und intrazellulärer Pneumokokken wurden Doppelimmunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Das Prinzip der Doppelimmunfluoreszenzfärbung beruht auf der Detektion von Antigenen. Mit Hilfe von Primärantikörper und fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpern werden extra- und intrazelluläre Bakterien voneinander unterschieden. Dafür wurde dieses Prinzip zweimal mit unterschiedlich fluoreszenten Detektoren angewendet. In dieser Arbeit wurden zwei

Fluorochrome, Alexa 488 und Alexa 568, jeweils gekoppelt an Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper oder an Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper verwendet. Alexa 488 besitzt eine Anregungswellenlänge im blauen Spektralbereich und emittiert im grünen Bereich. Alexa 568 absorbiert im grünen Spektralbereich und emittiert rot. Fixierte Immunfluoreszenz-Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axioskop von Zeiss bei 1000-facher Vergrößerung ausgewertet. Am konfokalen Mikroskop wurden repräsentative Infektionsausschnitte fotografiert und digitalisiert.

Die APCs wurden nach der Infektion mit Pneumokokken und der Fixierung zunächst in PBS mit 10% FBS für 30 min abgesättigt. Extrazelluläre Pneumokokken wurden anschließend mit Kaninchen-anti-Pneumokokken IgG Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Detektion mit einem Alexa 488 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper. Nach Permeabilisierung der Wirtszellen mit 0,1% Triton-X-100 wurden die internalisierten und adhärenen Pneumokokken mit dem anti-Pneumokokken Antikörper und einer anschließenden Inkubation mit einem Alexa 568 gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antikörper detektiert. Die Inkubation mit Antikörpern erfolgte in PBS mit 10% FBS für 30 bis 45 min. Die einzelnen Antikörper wurden mit unterschiedlichen Arbeitskonzentrationen eingesetzt (Tabelle 30).

Die Detektion zellulärer Kompartimente wurde mit dem Antikörper LAMP-1-Maus IgG nach Permeabilisierung der Zellen für 30 min durchgeführt. Dabei wurde das Antigen LAMP-1 („lysosomal associated membrane protein 1“) mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG Alexa 488 angefärbt. In Kolokalisationsstudien wurden die interagierenden Pneumokokken mit einem rotem Fluorochrom, Alexa 568, detektiert.

Nach der Immunfärbung der Präparate wurden die Deckgläser mit einem Tropfen Moviol auf einem Glasobjektträger eingebettet und mit Nagellack luftdicht verschlossen. Die Proben können bei 4°C über einige Jahre im Dunkeln aufbewahrt werden. Die Quantifizierung adhärenen und intrazellulärer Pneumokokken erfolgte mit einem Fluoreszenz-Mikroskop. Extrazelluläre Bakterien konnten im Doppelfilter als rot-grün fluoreszierend als gelb erscheinende Signale erkannt werden, wohingegen intrazelluläre Bakterien rot erschienen. Bei der Kolokalisation lagen die Pneumokokken rot-fluoreszierend vor, und intrazelluläre Kompartimentstrukturen erschienen grün-fluoreszierend.

7.3.7 Antibiotika-Protektions-Methode

Zur Bestimmung der Aufnahme von Pneumokokken durch APCs, wurden Antibiotika-Protektions-Versuche durchgeführt. Bei dieser Methodik handelt es sich um den quantitativen Nachweis von aus Zellen isolierten intrazellulären lebenden Bakterien. 1×10^5 Zellen (J774, DCs) wurden wie in 96-Zellkulturplatten mit einem Volumen von 50 μl je Kavität ausgesät und mit 50 μl Pneumokokkensuspension für maximal 60 min infiziert (siehe 7.3.5). Durch die Zugabe von 50 μl Gentamicin (300 $\mu\text{g/ml}$) und Penicillin G (300 U/ml) wurden nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ extrazelluläre bzw. zellassozierte Bakterien abgetötet. Anschließend wurden die Zellen mit Antibiotika-freiem Medium gewaschen und mit 100 μl 1% Saponinlösung je Vertiefung für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ lysiert. Dabei wurden intrazelluläre Bakterien in den Kulturüberstand freigelassen. Lebensfähige Bakterien wurden in entsprechenden Verdünnungen auf Blutagarplatten bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht kultiviert. Die Anzahl überlebender Kolonien wurden durch Auszählen der CFU („colony-forming-units“) bestimmt.

7.4 Mikroskopie

Als Nachweismethode wurden verschiedene mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Neben der Licht-, Fluoreszenz- und konfokalen Laserscanningmikroskopie wurden elektronenmikroskopische Techniken angewendet. Oberflächenbeschaffenheiten wurden durch das Rasterelektronenprinzip untersucht. Bei der Transmissionmikroskopie wurden intra- und extrazelluläre Charakteristika zellulärer und bakterieller Präparate durch das Anlegen von Ultradünnschnitten untersucht. Für diese verschiedenen Detektionsverfahren der durchgeführten *in vitro* Versuche wurden die Infektionen spezifisch fixiert.

7.4.1 Vorbereitung von Zellpräparaten für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Für Fluoreszenznachweismethoden wurden infizierte Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 1 -3,7% PFA/PBS Lösung für mindestens 15 min bei 4°C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Zur Fluoreszenzfärbung wurden die Deckgläschen mindestens 3-mal mit 1 x PBS gewaschen. Die fixierten Präparate konnte dann für die Antikörperdetektion eingesetzt werden (siehe 7.3.6).

7.4.2 Vorbereitung von Präparaten für Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Vorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die Zellen nach der Infektion mit 1 x PBS gewaschen und mit Cacodylatpuffer mit 3% Formaldehyd und 2% Glutaraldehyd (EM-Puffer) über Nacht bei 4°C fixiert. Die fixierten Präparate wurden mit TE-Puffer gewaschen und schrittweise mit einer Aceton-Verdünnungsreihe entwässert. Nach der kritischen Punkttrocknung mit flüssigem CO₂ wurden die Proben mit Goldpartikeln bedampft und in einem Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (DSM 982 Gemini, Zeiss) bei einer Spannung von 5 kV untersucht. Die Bilder wurden digital aufgenommen und gespeichert. Die Durchführung der REM wurde von Dr. Manfred Rohde (HZI, Braunschweig) getätigt.

7.4.3 Fixierung von Präparaten für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Zellmorphologie und zelluläre Strukturen infizierter DCs wurden mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie aufgeklärt. Die Infektion der Zellen wurde dafür in Suspension durchgeführt. 2×10^5 infizierte DCs wurden bei 2000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge sedimentiert. Die Zellen wurden in 50 µl einer 0,5% Tannin-Lösung (in EM-Puffer, siehe 7.4.2) aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert. Die fixierte Probe wurde danach bei 4000 rpm für 5 min 3-mal mit 1 x PBS gewaschen. Der zweite Fixierungsschritt erfolgte mit 1% Osmium/EM-Puffer. Dafür wurde das Zellsediment mit 100 µl Osmium-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur (RT) kontrastiert. Das Osmium wurde nach Sedimentation bei 13000 rpm für 3 min entfernt und die Zellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Bis zu weiteren Verwendung wurde das fixierte Präparat in 1 x PBS bei 4°C gelagert.

7.4.4 Kapsel­fixierung von Pneumokokken für TEM

Zur Untersuchung der Kapselmorphologie von Pneumokokken wurden die Bakterien in einer THY-Kultur gezüchtet und bei 4500 rpm für 5 min sedimentiert. Das Sediment wurde in Cacodylatpuffer mit 2% Formaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd, 0,075% Rutheniumrot und 0,075 M Lysinacetat aufgenommen und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Waschpuffer (Cacodylatpuffer, 0,075% Rutheniumrot) gewaschen und ein zweites Mal mit 2% Formaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer mit 0,075% Rutheniumrot für 3 h fixiert. Danach folgte ein weiterer Waschschrift. Den Pneumokokken wurde 1% Osmium-Cacodylatpuffer und

0,075% Rutheniumrot für 1 h zur Kontrastierung bei RT zugesetzt. Der Osmium-versetzte Puffer wurde durch einen zusätzlichen Waschschrift mit Cacodylatpuffer und 0,075% Rutheniumrot entfernt. Die Zellen wurden mit 1 x PBS versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

7.4.5 Aufbereitung der Präparate für TEM

Die Vorbereitung zur TEM erfolgte sowohl für die infizierten Immunzellen als auch für die Kapsel-fixierten Pneumokokken mit einer mehrfachen Entwässerung über eine Acetonverdünnungsreihe. Die Präparate wurden folglich in das Acrylat-Harz LR White Harz (London Resin Company) eingebettet. Die Polymerisation des Harzes erfolgte bei 60°C für 48 h. Anschließend wurden Ultradünnschnitte mittels eines Diamantenmessers angefertigt. Die Nachkontrastierung wurde mit 4% wässrigem Uranylacetat durchgeführt. Die luftgetrockneten Präparate wurden in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM, EM 910, Zeiss) bei einer Spannung von 80 kV analysiert. Repräsentative Ausschnitte wurden aufgenommen und digital gespeichert. Die Elektronenmikroskopie, sowie die Dehydrierung, Einbettung und das Schneiden der Präparate, wurde von Dr. Manfred Rohde (HZI, Braunschweig) durchgeführt.

7.5 Methoden zur Untersuchung der induzierten DC-Ausreifung

Der erste Schritt zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch DCs ist die Induktion deren Ausreifung (Maturation), welche durch bestimmte Stimuli ausgelöst wird. Durch die Maturation erfahren DCs verschiedenartige Veränderungen, wie Oberflächen- und Funktionsumgestaltung, bzw. Zytokinproduktion. Anhand dieser Veränderungen kann der Ausreifungsstatus der Zellen durch verschiedene Detektionstechniken erfasst werden.

7.5.1 Zytometrischer Nachweis von extrazellulären Oberflächenstrukturen

Der Ausreifungsnachweis bei LPS- bzw. Pneumokokken-stimulierten DCs erfolgte mit Hilfe der Oberflächendetektion bestimmter Markerproteine. Die Ausreifungsmarker wurden über extrazelluläre Detektionsmethoden durch Antikörperreaktion im Durchflusszytometer quantifiziert. Hierfür wurden monoklonale Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD11c, CD25, CD83, CD86 und HLA-DR (siehe 6.4) verwendet. Bei den eingesetzten Antikörpern handelte es sich um Fluorochrom-Konjugaten (FITC oder PE). Für eine Fluoreszenzdetektion wurden mindestens 1×10^5 Zellen in Suspension

eingesetzt. Die stimulierten DCs wurden in 20 µl PBS aufgenommen und nach Zugabe von 1 µl Antikörper bei 4°C für 30 min im Dunkeln inkubiert. Zur Kontrolle für unspezifische Fluoreszenzdetektion wurden die jeweiligen Isotyp-Antikörper eingesetzt (Tabelle 31). Die Färbung erfolgte in 200 µl Mikrotiter Röhrchen. Überschüssiger Antikörper wurde mit 200 µl 1 x PBS nach einem Zentrifugationsschritt bei 2500 rpm für 5 min aus der Probe entfernt. Die detektierten Zellen wurden zur sofortigen zytometrischen Messung in 300 µl PBS aufgenommen. Bei späterer Verwendung wurden die Zellen mit 300 µl FACS-Puffer (1% PFA, 0,5% FBS in 1 x PBS, pH 7,4) versetzt und bei 4°C im Dunkeln für maximal 5 Tage gelagert. Im Durchflusszytometer wurden mindestens 10000 Ereignisse pro Probe aufgenommen, gemessen und ausgewertet. Die Wahl der Hauptpopulation erfolgte im Punktwolken-Diagramm mit Hilfe der Größen- („forward scatter“, FSC) und Granularitäts-Parameter („side scatter“, SSC). Die Fluoreszenzsignale wurden auf die gewünschte Zellpopulation eingestellt. Die Fluoreszenzgrenze wurde gemäß der ungefärbten Zellprobe ermittelt. Von den gemessenen Signalen wurden die unspezifischen Werte der Isotypenfärbungen rechnerisch abgezogen. Der Anteil an positiv fluoreszierenden Teilchen wurde durch die Grenzsetzung der Quadranten im Punktwolkendiagramm ermittelt und konnte als prozentualer Satz, als mittlere Fluoreszenzintensität bzw. als Gesamtfluoreszenz berechnet werden. Die Gesamtfluoreszenz ist kalkulatativ das Produkt aus dem ermittelten Prozentsatz der positiv fluoreszierenden Ereignisse und deren mittlere Fluoreszenzintensität. Gemessen wurde entweder am FACS-Calibur oder am FACS-Canto I bzw. II. Die Auswertung und Datensicherung erfolgte mittels der Computerprogramme CellQuest Pro, WinMDI (<http://facs.scripps.edu/software.html>), FACS-Diva und FlowJoe.

7.5.2 Detektion der Zytokine

Der qualitative und quantitative Nachweis von sekretierten Zytokinen wurde mit Hilfe der Luminex Detektionstechnologie durchgeführt (Biosource, Invitrogen). Diese Technologie beruht auf spezifischen Antikörperreaktionen mit gelösten Substanzen. Die detektierten Moleküle werden mittels Durchflusszytometrie gemessen und quantitativ bestimmt. Außerdem erlaubt die Luminex-Methode eine simultane Messung von mehreren Zytokinen in einer Probe unter Einsatz eines kleinen Probenvolumens. Die technische Basis dieser Methode bilden mikroskopisch kleine Kügelchen (Beads) aus Polystyrol, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind. Diese Beads sind gleichzeitig an zwei Fluoreszenzfarbstoffe (Rot und Infrarot) gebunden, die in unterschiedlichen Bereichen des

optischen Spektrums emittieren. Die Kombination dieser Farbstoffe in verschiedenen Konzentrationsstufen führt zu einer Vielzahl an unterscheidbaren Schattierungen von Rot und Infrarot. Die daraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten definieren jeweils eine Population von Beadklassen eines bestimmten Antikörpers. Die Fluoreszenzkodierung der Kügelchen stellt die Grundlage für ihre Erkennung durch das Analysegerät (Luminex, Biosource) und für ihre Zuordnung zur jeweiligen Population dar.

Für die multiplexe Detektion von Zytokinen wurden Kulturüberstände von DCs nach ihrer Behandlung bei -20°C gelagert. $5\ \mu\text{l}$ der Probe wurden in 96-Kulturplatten mit $45\ \mu\text{l}$ $1 \times \text{PBS } 1:10$ verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurden Standardreihen der eingesetzten Zytokine nach den Angaben des Herstellers vorbereitet. Alle Beads wurden vereint und für 1 min im Ultraschallbad dissoziiert. Die Beadlösung wurde auf den Filterboden der Luminexplatte durch Unterdruck gesaugt, fixiert und zweimal mit einem Waschpuffer gewaschen. Nach der Zugabe von jeweils $50\ \mu\text{l}$ Inkubations- und Assay-Diluent Puffer, wurden $50\ \mu\text{l}$ Probe auf die Platte gegeben und bei 550 rpm für 2 h im Dunkeln geschüttelt. Die Quantifizierung der an die Beads gebundenen Zytokinmoleküle erfolgte mit der Detektion über Biotin-gekoppelte Antikörper. Dabei wurden alle Biotin-Antikörper zu einer Lösung vereint und jeweils $100\ \mu\text{l}$ dieser in die Plattenvertiefungen gegeben. Die Platte wurde im Dunkeln für 1 h geschüttelt. Die Detektion wurde mittels Substratinkubation mit $100\ \mu\text{l}$ Streptavidin für 30 min im Dunkeln durchgeführt. Die Zytokin-gebundenen Beads wurden durch 30 s Schütteln vom Plattenboden gelöst und im Luminexgerät gemessen. Die Messmethode beruht auf der Grundlage der Durchflusszytometrie. Die Quantifizierung der einzelnen Zytokine erfolgte über die jeweilige Standardreihe und deren Eichkurve, wobei die Verdünnung der Proben mit einbezogen wurde. Für jede Kugelpopulation wurden 5000 Ereignisse gemessen und deren Mittelwert bezogen auf die Zytokinkonzentration berechnet. Außerdem wurden Doppelwerte der Proben gemessen, um Versuchsfehler ausschließen zu können.

7.5.3 Untersuchung der T-Zellaktivierung durch DCs (OxMi)

Die Eigenschaft der Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch stimulierte DCs wurde in einem T-Zellproliferationstest über den oxidativen Mitogenese Nachweis von T-Lymphozyten (OxMi) untersucht (Hill *et al.*, 1999). Proliferierende Zellen werden hier mittels Wasser löslichem Tetrazoliumsalzes (WST-8, Alexis) nachgewiesen. Dieses

Substrat bildet im reduzierten Zustand einen gelben Farbstoff namens Formazan. Die katalytische Reduktion von WST-8 wird durch die zellulären Dehydrogenasen eingeleitet. Die Bildung des Farbstoffes ist proportional abhängig von der Anzahl an vorliegenden Dehydrogenasen, welche von lebenden Zellen produziert werden. Somit stellt der durch Formazan eingeleitete Farbumschlag ein Indiz für die Zellproliferation dar. Die Messung erfolgt im ELISA-Reader. Für diese Untersuchung wurden allogene humane T-Zellen aus peripherem Blut isoliert und angereichert (durchgeführt von Dr. Ulrike Kämmerer, Würzburg). Die Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^7 pro 1 ml kaltem PBS mit 0,5 mM NaIO₄ für 20 min auf Eis inkubiert. Die behandelten Zellen wurden dann mit FBS (100%) versetzt und sedimentiert. Periodatreste wurden durch 2-mal Waschen mit RPMI/10%FBS Medium entfernt. Die T-Zellen wurden nach der Zellzahlbestimmung auf eine Arbeitskonzentration von $1,8 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Unterschiedlich stimulierte DCs wurden mit RPMI/10%FBS Medium auf eine Konzentration von $1,8 \times 10^5$ pro ml verdünnt. In einer 96-Kulturplatte mit Rundboden wurden jeweils 9000, 3000, 1000, 333 und 111 DCs in 50 µl mit jeweils 9×10^4 T-Zellen (50 µl) vereint und 60 h bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Als interne Kontrolle wurden sowohl DCs als auch T-Zellen in Medium eingesetzt. Zur Detektion der induzierten Proliferationsrate wurden 10 µl der WST-8 Reagenz zu den Zellen gegeben und bis zum ausreichenden Farbumschlag im Brutschrank inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach maximal 12 h alle 3 h im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

7.6 Bindungsnachweise von isolierten Proteinen an Pneumokokken bzw. DCs

Durch verschiedene Nachweismethoden wurde die Bindungseffizienz von immobilisierten bzw. löslichen Proteinen, MBP bzw. MBP-PavA, an *S. pneumoniae* bzw. DCs untersucht.

7.6.1 Bindung von Pneumokokken an immobilisierte Proteine

96-Mikrotiterplatten (Maxisorp-Platten, Nunc) wurden mit MBP bzw. MBP-PavA-Protein versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proteine wurden in einem Volumen von 50 µl PBS pro Kavität mit unterschiedlichen Proteinmengen an die Plastikbeschichtung der Mikrotiterplatten gekoppelt. Überschüssiges Protein wurde durch dreimal Waschen mit jeweils 100 µl PBS aus den Kavitäten entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 1% BSA (bovines Serum Albumin) für 3 Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Kavitäten zweimal mit PBS gewaschen. Für Bindungsstudien

wurden Pneumokokkenstämme in THY-Medium gezüchtet und mit dem fluoreszierenden Farbstoff FITC konjugiert (siehe 7.1.4). 150 µl Bakteriensuspension von ca. 1×10^9 Bakterien pro ml wurden für 1 h bei 37°C mit den geblockten Proteinen in der Mikrotiterplatte inkubiert. Die 100% Bindungseffizienz wurde im Fluoroscanner bei 485/538 nm gemessen. Nicht gebundene Bakterien wurden mit 150 µl 1 x PBS mehrmals gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde eine Messung durchgeführt. Diese Werte wurden mit dem 100% Wert relativiert. Nach Subtrahierung der unspezifischen Hintergrundsignale der BSA-Kontrolle konnte die tatsächliche Bindung ermittelt werden.

7.6.2 Bindung von gelösten MBP-Proteinen an Pneumokokken

Die Bindung von gereinigten Proteinen, wie MBP und MBP-PavA, an Pneumokokken wurde zytometrisch ermittelt. Pneumokokken wurden in THY-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,35 gezüchtet, bei 4500 rpm für 5 min sedimentiert und mit 1 x PBS gewaschen. Nach der photometrischen Bestimmung der Bakterienanzahl wurden die Pneumokokken zu einer Konzentration von 5×10^6 Bakterien pro 150 µl in 1% FBS/RPMI Medium verdünnt. Nach Zugabe bestimmter Proteinmengen wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, bei 4500 rpm für 5 min sedimentiert und in 150 µl PBS aufgenommen. Mit polyklonalen Primärantikörpern wurden an Bakterien gebundene Proteine detektiert. Die Antikörper richteten sich gegen die entsprechenden Proteine und wurden verdünnt eingesetzt (siehe 6.4, Tabelle 31). Die Antikörperreaktion erfolgte bei 4°C für 1 h. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Sediment in 100 µl PBS/10% FBS aufgenommen. Zur Detektion gebundener Proteine wurden die Proben mit Fluorochrom-gekoppelten Kaninchen-Sekundärantikörper für 45 min bei 4°C inkubiert (siehe 6.4, Tabelle 31). Die gefärbten Bakterien wurden nach 2 maligem Waschen im Durchflusszytometer gemessen. Die spezifische Bindung wurde nach der Auswertung berechnet.

7.6.3 Bindung von gelösten MBP-Proteinen an humane DCs

Zur durchflusszytometrischen Messung der Bindung von den gelösten Proteine MBP und MBP-PavA an DCs wurden jeweils 1×10^5 Zellen in 150 µl RPMI/1% FBS in Suspension eingesetzt. Versetzt mit bestimmten Proteinmengen wurden die Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Detektion und Messung der gebundenen Proteine erfolgte wie unter 7.6.2 für Bakterien beschrieben.

7.7 Methoden zum Arbeiten mit DNA

7.7.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. pneumoniae* mittels Genomic-Tipp Kits (QIAGEN)

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus Pneumokokken wurde das Genomic-Tipp 100/G Isolierungs-Kit von QIAGEN verwendet. Pneumokokken wurden in einer 20 ml THY-Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 gezüchtet und anschließend für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die benötigten Lösungen B1, B2, QBT, QC und QF wurden nach den Angaben des Herstellers QIAGEN angesetzt (siehe 6.11). Das Bakteriensediment wurde in 3,5 ml Lösung B1, zugesetzt mit 70 µl RNaseA (10 mg/ml), aufgenommen. Nach der Zugabe von 50 µl Lysozym (100 mg/ml), 50 µl Mutanolysin (1 mg/ml) und 100 µl/ml Pronase E (25 mg/ml) wurden die Bakterien für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Enzyme unterstützten die Lyse der Bakterienzellen. Störende Proteine und RNA wurden zusätzlich abgebaut. 1,2 ml der Lösung B2 wurden dazugegeben und für 30 min bei 50°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf eine mit der Lösung QBT äquilibrierte Genomic-Tipp 100/G-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit dem Waschpuffer QC gewaschen und die bakterielle DNA anschließend mit dem Elutionspuffer QF aus der Säule gelöst. Mit dem 0,7-fachen Volumen an Isopropanol wurde die DNA gefällt und für 30 min bei 5000 x g zentrifugiert, mit eiskalten 70% Ethanol gewaschen, nochmals für 10 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Die DNA wurde in 200 µl bidest. H₂O gelöst. Das Fassungsvermögen der Säule betrug 25 – 90 µg DNA.

7.7.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Pneumokokken mittels Na-Acetat Fällung

Zur Isolierung genomischer DNA aus Pneumokokken mittels Na-Acetat Fällung wurden Pneumokokken in einer 50 ml THY-Flüssigkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 gezüchtet und anschließend für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 6 ml TES-Puffer aufgenommen, zur Zellyse 5 mg Lysozym und 100 µl Mutanolysin (1 mg/ml) supplementiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Degradation der RNA und der Proteine wurde durch die Zugabe von 100 µl RNaseA A (5 mg/ml) für 15 min und 500 µl Pronase E (5 mg/ml) für 30 min bei 37°C eingeleitet. Anschließend wurde das Detergenz N-Laurylsarcosyl (500 µl von 10% Lösung in 250 nM DiNatrium-EDTA) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Durch 2 ml Phenol wurden die Proteine gefällt und bei 12000 rpm (Sorvall, Rotor SS-34) und 4°C für 10 min zentrifugiert. Aufgrund ihrer Hydrophilie

sammelte sich die DNA in der wässrigen Phase des Phenols, während die Proteine sich in der Interphase befanden. Der wässrigen Phase wurden 2 ml Phenol-Chloroform zugesetzt, vermischt und bei 12000 rpm für 20 min (4°C) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde 2-mal wiederholt. Die DNA-Fällung erfolgte mit dem Überstand mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 1 Vol Isopropanol. Die gefällte DNA wurde bei 12000 rpm und 4°C für 20 min sedimentiert, der Überstand entfernt und die DNA getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 500 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

7.7.3 Qualitäts- und Quantitätsbestimmung von isolierter DNA

Die Qualität und Quantität der isolierten DNA wurde mit Hilfe der NanoDrop®-Technologie photometrisch bestimmt. Die DNA Konzentration wurde über die optische Dichte der doppelsträngigen DNA im Bereich von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Referenzkonzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA. Die Verunreinigung der DNA durch Proteine wurde durch die Größe des Quotienten der OD von 260/280, welcher für eine ausreichende Reinheit mehr als 1,7 betragen sollte, dargestellt.

7.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Visualisierung von DNA erfolgt im Labor standardmäßig mittels der Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wird ein Gemisch an verschiedenen DNA-Fragmenten voneinander getrennt und identifiziert werden. Je nach der Größe der zu untersuchenden DNA wurden 0,8 bis 2% Agarose-Gele verwendet. Als Laufpuffer enthielten die Gelkammern 1 x TAE. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 80 – 100 Volt für ca. 1 Stunde. Die DNA-Fragmente wurden durch das Färben des Gels für 10 – 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (3 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) sichtbar gemacht. Ethidiumbromid interkaliert Sequenz-unspezifisch mit Nukleinsäuren und fluoresziert nach Anregung durch UV-Strahlung im rötlichen Bereich bei 590 nm Wellenlänge. Die Anregung erfolgte mit einer UV-Lampe ($\lambda = 366$ nm) und die Fluoreszenzgele wurden in einer Geldokumentationsanlage digital fotografiert.

7.7.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Nachweis von bestimmten Genen basierte auf der labortechnischen Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten. Bestimmte DNA-Fragmente konnten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide sowie einer DNA-Polymerase amplifiziert werden (Saiki *et al.*, 1988). Die Wahl für die zu verwendeten Polymerasen richtete sich nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente. Für PCR-Amplifikate bis zu einer Größe von 2,5 kb wurde AmpliTaq Gold® (hotstart) von Applied Biosystems verwendet. Größere Fragmente wurden mit dem Expand high fidelity PCR-System (HIFI) von Roche vervielfältigt. Die Standard-PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl und einem standardisierten PCR-Programm in einem Thermocycler durchgeführt.

| Komponente | AmpliGold Polymerase | Expand HIFI Polymerase |
|--|----------------------|------------------------|
| Größe der DNA-Fragmente | bis 2,5 kb | 2 – 5 kb |
| 10 x Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂) | 2,5 µl | 2,5 µl |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl | 1 µl |
| DNA-Matrize (DNA/cDNA) | 100 – 200 ng | 0,1 – 200 ng |
| Oligonukleotide forward/revers (10 pmol/µl) | jeweils 1 µl | jeweils 1 µl |
| Polymerase | 0,125 µl | 0,15 µl |

Tabelle 42: Standard PCR-Reaktion für AmpliGold und Expand HIFI Polymerase.

Für die Amplifizierung wurde folgender Reaktionszyklus verwendet.

| PCR-Schritt | Temperatur [°C] | Zeit | Zyklen |
|------------------------|---------------------|-------------|---------|
| Denaturierung Hotstart | 95 | 10 min | 1 |
| Denaturierung | 95 | 45 sec | 25 – 30 |
| Hybridisierung | $T_M - 5\text{ °C}$ | 1 min | |
| Polymerisation | 72/ 68* | 1 min/ 1 kb | |
| Finale Elongation | 72/ 68* | 10 min | 1 |

Tabelle 43: Standardisiertes PCR-Zyklusprogramm. *Für die ExpandHIFI Polymerase wurde als Polymerisationstemperatur im Falle von großen DNA-Fragmenten 68°C verwendet.

Die Hybridisierungstemperatur wurde in Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide etwa 5°C unterhalb ihrer Schmelztemperatur (T_M) gewählt. Die geeignete T_M berechnete sich nach folgender Formel.

$$T_M = (AT * 2) + (GC * 4) - 5$$

Die Polymerisationsdauer wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt (1 kb \approx 1 min). Auch die Polymerisationstemperatur richtete sich nach der Größe des Fragments. Somit wurde bei andauernden Elongationszeiten die Temperatur zur Schonung der Enzymaktivität von standardmäßigen 72°C auf 68°C herabgesetzt. Die erhaltenen amplifizierten Produkte wurden durch die Auftrennung durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft und nach Färbung mit Ethidiumbromid detektiert.

7.7.6 Digoxigenin (DIG)-Markierung von Oligonukleotiden

Zur Herstellung von nicht-radioaktiven DNA-Sonden wurden DNA-Fragmente mit Digoxigenin markiert, um sie zum Nachweis von homologen Sequenzen in der DNA-DNA Hybridisierung einsetzen zu können. Als DIG-Sonde wurde ein Fragment aus dem *dexB*-Gen der Pneumokokken mittels der Oligonukleotide dexBF2 und 19Frev synthetisiert. Die Markierung der linearen DNA erfolgte durch den Einbau von Digoxigenin-Desoxyuridinphosphat anstelle von dTTP in die neu synthetisierte DNA während einer PCR. Die Detektion dieser markierten Fragmente erfolgte über eine Antikörperreaktion mit einem polyklonalen Schaf-anti-DIG gekoppelt an eine alkalische Phosphatase, welche mit dem Substrat CSPD reagierte. Diese enzymatische Dephosphorylierung löste eine Lichtemission aus, die auf einem Röntgenfilm als positives Signal sichtbar gemacht werden konnte. Die DIG-Markierung in der PCR wurde mit folgendem Reaktionsansatz durchgeführt.

| Komponenten | Volumen |
|--|----------------|
| 10 x Puffer (inkl. 15 nM MgCl ₂) | 10 μ l |
| DIG dNTPs (2mM) | 10 μ l |
| DNA-Matrize (200 ng/ μ l) | 1 μ l |
| Oligonukleotide (20 pmol) | Je 1 μ l |
| Polymerase (AmpliTaq Gold) | 0,25 μ l |
| dH ₂ O | ad 100 μ l |

Tabelle 44: Standardisierte Reaktionskomponenten der DIG-DNA-Sondenherstellung.

Die PCR-Produkte wurden durch die Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Durch die markierte Sonde weist das DNA-Fragment ein leicht verändertes Laufverhalten auf. Vor dem Einsatz in der Southern-Blot-Analyse wurde die Sonde mit dem QIAquick PCR-Purification Kit aufgereinigt.

7.7.7 Southern-Blot Verfahren

Bei der Methode des Southern-Blots wurden elektrophoretisch getrennte DNA-Fragmente, auf eine positive geladene Nylonmembran transferiert und fixiert, um durch Hybridisierung mit markierten Sonden einzelne DNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Dafür wurde genomische DNA aus *S. pneumoniae* Stämmen über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Hind*III fragmentiert und anschließend mittels Gelelektrophorese in einem 1% Agarosegel aufgetrennt. Das Agarosegel wurde für 10 min mit Ethidiumbromid gefärbt und dokumentiert. Zur Depurinisierung der DNA und zur Bildung von einzelsträngiger DNA, wurde das Agarosegel 15 min in 0,25 M HCl inkubiert. Dadurch werden die DNA-Fragmente für die Hybridisierung mit der DNA-Sonde zugänglich gemacht. Zur Neutralisierung und zur Spaltung der Phosphodiestergruppen des DNA-Rückgrades folgte eine 15-minütige Inkubation in 0,4 M Natronlauge. Schließlich wurde das Gel für 15 min in 10 x SSC-Puffer inkubiert, um das Gel für den folgenden Membrantransfer zu äquilibrieren. Durch die Kapillar-Blot-Methode wurden die Fragmente auf eine Nylonmembran übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert. Dabei werden unspezifische Bindungen zwischen Phosphatresten der DNA und der Oberfläche der Membran gebildet.

7.7.8 DNA-DNA Hybridisierung

Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde ermöglichte die Detektion homologer und nicht-homologer DNA-Sequenzen innerhalb eines Genoms. Die Nylonmembran wurde für 2 h bei 42°C im Hybridisierungssofen in 30 ml High-SDS-Puffer äquilibriert. Die DIG-markierte DNA-Sonde wurde für drei Minuten bei 99°C aufgeköcht und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurden 40 µl der einzelsträngigen DIG-markierten DNA-Sonde (ca. 100 ng) und 100 µl einzelsträngige Lachssperma-DNA (10 µg/ml) zur Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte im Hybridisierungssofen bei 42°C über Nacht. Es folgten jeweils zwei Waschschrte für 15 min bei 30°C mit 2 x SSC/0,1% SDS und für weitere 15 min bei 60°C mit 0,1 x SSC /0,1% SDS. Anschließend wurde die Membran für 5 min in Waschpuffer geschwenkt. Die Membran wurde mit dem anti-DIG Antikörper, welche an alkalische Phosphatase gebunden war, mit einer Verdünnung von 1: 10 000 in 0,1 M Maleinsäure-Puffer mit 1% Blocking-Reagenz für 30 min inkubiert. Durch zwei 15-minütige Waschschrte mit Waschpuffer wurden

ungebundene Antikörper entfernt. Die Membran wurde 2-mal für jeweils 5 min mit Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde das Substrat CSPD in einer 1:100 Verdünnung zu dem Detektionspuffer gegeben und für 5 min inkubiert. Die alkalische Phosphatase des Anti-Dig-Antikörpers spaltet einen Phosphatrest des CSPD ab, wobei es zu einer Lichtemission kommt, welche auf einer Photonenempfindlichen Röntgenfilm visualisiert werden kann. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und zur Verstärkung der Enzymreaktion für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Detektion der Signale wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt. Die Entwicklung erfolgte nach 5 min, 15 min und 60 min. Detektierte Banden der erfolgreichen Hybridisierung erschienen auf dem entwickelten Film schwarz.

7.7.9 Herstellung kapselloser Pneumokokkenmutanten

In der bereits kapsellosen Mutante des bekapselten TIGR4 (Serotyp 4) wurden die Gene des Kapselgenkomplex (ca. 25 kb) durch eine Kanamycin-Resistenz-Kassette (ca. 1,3 kb) mittels homologer Rekombination ersetzt (Ianelli *et al.*, 2004). Die flankierenden Gene, *dexB* und *aliA*, des ursprünglich intakten Kapsellokus sind noch vorhanden. *DexB* kodiert für das Enzym Glucan 1,6-alpha-Glucosidase strangaufwärts des Kapsellokus. *AliA* befindet sich strangabwärts und kodiert für das Oligopeptid-bindende Protein eines ABC-Transporters. Die kapsellose Mutante des D39 (*S. p.* 257) wurde mittels PCR und den Oligonukleotiden-Paar dexBF₁/aliAR₂ hergestellt Als Matrize diente chromosomale DNA des TIGR4Δ*cps*. Der D39 Wildtyp (*S. p.* 257, Serotyp 2) wurde mit dem aufgereinigten PCR-Produkt transformiert. Nach der Transformation inserierte das Kanamycin-Resistenzgen über homologe Rekombination in den Bereichen der Gene *dexB* und *aliA* in das Genom. Anschließend wurden Kanamycin-resistente Transformanten selektioniert und mittels PCR überprüft. Eine spezifische Integration des DNA-Fragments wurde durch eine Southern-Blot-Analyse mit einer *dexB*-spezifischen Sonde überprüft.

7.7.10 Quantitative Real Time PCR

Bei der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) handelt es sich um einer Nukleinsäuren Vervielfältigungsmethode, die neben der Amplifikation eine vergleichende Quantifizierung der DNA-Matrize erlaubt. Die Detektion der DNA-Kopien erfolgte über den Einbau von fluoreszierendem Reporterfarbstoff SYBR Green (Roche), welches mit der hergestellten doppelsträngigen DNA interkalierte. Somit nahm die gemessene Fluoreszenzintensität mit

der Menge der amplifizierten PCR-Produkte während des Ablaufs des PCR-Protokolls proportional zu. Die eingesetzten Detektionssysteme (Abi Prism 7000) bestehen aus einem PCR-Thermocycler und aus einem optischen Detektionsmodul, über das die Fluoreszenzwerte nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden. Die Anregung des Fluorophors erfolgte durch Laserlicht. Zur Normalisierung des Reportersignals wurde der passive Referenz Farbstoff 6-Carboxy-X-Rhodamin (ROX) eingesetzt, um unspezifische Fluoreszenzschwankungen auszuschließen. Die Quantifizierung der PCR basierte auf die Berechnung des Fluoreszenzschwellenwertes, dem sogenannten Threshold Cycle (C_T -Wert), welcher den PCR-Zyklus beschreibt, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Bis zum 15. PCR Zyklus wird nur die Hintergrundfluoreszenz durch ROX gemessen, da die Reporterfluoreszenz aufgrund der geringen Matrizenkonzentration nicht nachweisbar ist. Die Quantifizierung beruht hier auf der Kinetik der PCR-Reaktion, bei der die Richtlinie des C_T -Wertes zu dem Zeitpunkt der exponentiellen Amplifikation ermittelt wird. DNA-Matrizen mit geringer Kopienzahl besitzen einen hohen C_T -Wert und umgekehrt. In dieser Arbeit wurde die 2 Schritt qRT-PCR zur Erstellung von Expressionsmustern von Zytokintranskripten bei eukaryotischen Zellen verwendet. Dabei wurden aus Pneumokokken-infizierten DCs die Gesamt-RNA mittels des RNAeasy Kit (QIAGEN, siehe 7.8.1) isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben (siehe 7.8.2). Nicht die DNA sondern nur die cDNA wurde folglich mit qRT-PCR und spezifischen Zytokinoligonukleotiden bei 65°C Hybridisierungstemperatur für 40 Zyklen amplifiziert. Unter Verwendung von SYBR Green wurden die Transkripte nach jedem Zyklus detektiert (Tabelle 45). Um vergleichende Studien zwischen verschiedenen Proben zu erstellen, muss der Einsatz gleicher Mengen an Gesamt-cDNA gewährleistet sein. Zur Kontrolle dieser cDNAs wurde das Haushaltsgen für das ribosomale Protein S9 (RPS9), welches in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert wird, verwendet. Dabei sollten alle eingesetzten Proben den gleichen C_T -Wert für die cDNA von RPS9 aufweisen. Um eine Kontamination durch DNA ausschließen zu können, wurde die gleiche Menge an eingesetzter cDNA amplifiziert. Für die PCR wurde folgendes Reaktionsgemisch angesetzt.

| Reagenz | Volumen | Endkonzentration |
|--|-----------|------------------|
| Fast Universal SYBR Green Master (ROX) | 12,5 µl | 1 x |
| Oligonukleotide forward/revers (30 µM) | Je 0,5 µl | 300 nM |
| cDNA-Matrize/mRNA-Matrize | 200 ng | |
| DEPC-H ₂ O | ad 25 µl | |

Tabelle 45: Reaktionskomponenten und ihre eingesetzte Konzentration der qRT-PCR für die Detektion mit SYBR Green.

Die Berechnung der vergleichenden cDNA-Kopienzahl wurde auf den ermittelten C_T-Wert bezogen. Die Kalkulation zur relativen mRNA-Kopienanzahl wurde zu Auswertungs- und Darstellungszwecken wie folgt durchgeführt.

$$\text{Kopienanzahl mRNA} = 2^{-C_T}$$

7.8 Methoden zum Arbeiten mit RNA

Die Erforschung von Expressionsmustern bestimmter Gene unterliegt dem Arbeiten mit isolierter mRNA aus bestimmten Zielzellen. Die natürliche Hautflora ist bestückt und übersät mit zahlreichen RNasen, katalytischen Enzymen, welche unspezifisch RNA degradieren und somit zersetzen. Aus diesem Grund sollte beim Arbeiten mit isolierter RNA der Kontakt zur menschlichen Haut, durch das Tragen von Handschuhen, durch separat angesetzte und RNase freien Lösungen, wie DEPC-H₂O, vermieden werden. Oberflächen können mit speziellen Sprühlösungen (RNase-Eraser von Appllichem) von RNasen befreit werden. Weiterhin ist das Arbeiten mit RNA bei 4°C bzw. auf Eis aufgrund der Instabilität der Moleküle notwendig. Somit ist der vorsichtige Umgang mit RNA für eine erfolgreiche Methodik unausweichlich.

7.8.1 RNA Isolierung aus infizierten DCs

Die RNA Isolierung aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des RNAeasy Mini Kit von QIAGEN. Standardmäßig wurde aus mindestens 5×10^5 DCs die Gesamt RNA aufgereinigt. Kontaminierende DNA-Reste wurden gleichzeitig mit dem RNase free DNase Set Kit der Firma QIAGEN enzymatisch entfernt. Nach der Infektion wurden die infizierten Zellen in ca. 350 µl RLT-Puffer supplementiert mit β-Mercaptoethanol (10 µl/ml) aufgenommen. Nach der Homogenisierung der Zellen durch eine Kanüle wurde 1 Vol an 70% EtOH zugegeben und vermischt. Das Gesamtvolumen wurde dann auf die

RNA Mini Säule bei 10000 rpm für 15 s geladen. Nach dem Waschen der Säule mit RW1-Puffer wurde 80 µl DNase1-Lösung (27 Kunitz DNase 1 in 10 µl DEPC-H₂O, 70 µl RDD-Puffer) vorsichtig zugegeben und bei RT für 15 min inkubiert. Die DNase 1 und nicht-gebundene RNA wurden durch das Waschen mit RW1-Puffer und folgenden RPE-Puffer von der Säule entfernt. Die Elution der RNA erfolgte mit 2 x 30 µl DEPC-H₂O. Die Qualität und Quantität wurde mittels NanoDrop und Gelelektrophorese verifiziert (siehe 7.7.3 und 7.8.3).

7.8.2 Reverse Transkription

Eukaryotische Gene bestehen aus kodierenden (Exons) und nicht-kodierenden Bereichen (Introns). Nach der Transkription in mRNA werden die nicht-kodierende Regionen eines Gens durch Spleißprozesse entfernt und bilden zusammengefügt die Matrize für die Translation. Für den Nachweis der induzierten Zytokinenexpression in stimulierten DCs wurde die Methode der Reversen Transkription angewendet. Dabei wurde die Gesamt-RNA der behandelten DCs isoliert (siehe 7.8.1) und in cDNA mittels reverser Transkriptase (Invitrogen SuperScript™) enzymatisch übersetzt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen und wurde unter folgenden Bedingungen inkubiert.

| Komponenten | Einsatz | Menge |
|--|------------|--------------|
| Hybridisierungsansatz: | | |
| Gesamt RNA | 1 – 12 µl | 10 pg – 5 µg |
| Oligo (dT) ₁₆ (Promega) | 0,5 – 1 µl | 250 – 500 ng |
| dNTPs (10 mM) | 1 µl | |
| DEPC-H ₂ O | Ad 14 µl | |
| Bei 65°C für 5 min, für 1 min auf Eis | | |
| PCR-Ansatz | | |
| Hybridisierungsansatz | 14 µl | |
| 5 x First Strand Puffer | 4 µl | |
| DTT (0,1 M) | 1 µl | |
| RNase OUT (Invitrogen) | 0,5 – 1 µl | |
| SuperScript III | 0,5 – 1 µl | |
| DEPC-H ₂ O | Ad 20 µl | |
| Bei 50°C für 60 min, bei 70°C für 15 min | | |

Tabelle 46: RT-PCR Komponente und der Reaktionsbedingungen.

7.8.3 RNA Gelelektrophorese

Zur qualitativen Kontrolle der isolierten Gesamt mRNA wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Mittels der ribosomalen RNA, welche in hoher nachweisbarer Kopienzahl vorliegt, konnte eine mögliche Degradation der instabilen RNA im Agarosegel überprüft werden. Für die Auftrennung der RNA-Proben wurden RNase freie Agarosegele hergestellt. Dafür wurde 1% Agarose in 1 x RNA-Laufpuffer mit 1% Formaldehyd gelöst. 1 µg der RNA-Probe wurde mit 3 µl RNA-Ladepuffer supplementiert mit Ethidiumbromid versetzt und auf das polymerisierte RNA-Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 80 – 100 Volt für ca. 1 h. Die Fluoreszenzgele wurden nach ihrer Anregung durch eine UV-Lampe in einer Geldokumentationsanlage digital fotografiert.

7.9 Methoden zum Arbeiten mit Proteinen

Zum Erforschen von Interaktionsstrategien zwischen Pathogenen und Wirtszellen ist das Arbeiten mit Proteinen essentiell, da es sich hierbei meist um Proteininteraktionen handelt. Für die Identifizierung dieser Interaktionspartner im Bezug auf Funktion und Struktur wurden vielfältige Methoden entwickelt.

7.9.1 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression von PavA als MBP-Fusionsprotein wurde das *pavA*-Gen in den pMALc2X-Vektor kloniert. 500 ml LB-Rich Medium versetzt mit 100 µg/ml Ampicilin wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Induktion des Fusionsproteins MBP-PavA und des Kontrollproteins MBP erfolgte mit 0,3 mM IPTG für 4 h schüttelnd bei 37°C. Anschließend wurde die induzierte Bakterienkultur bei 6000 x g für 10 – 20 min zentrifugiert und bei -20°C bis zum Zellaufschluss gelagert.

7.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Elektrophorese Methode, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem Porennetzwerk aufgetrennt werden. Dieses Polyacrylamidgel besteht aus einem 4% Sammelgel und einem darauf folgenden Trenngel, für welches gemäß der gewünschten Auftrennung ein Acrylamidanteil

von 8 -12% gewählt werden kann (Tabelle 40). Die Proteine wurden vor ihrer Auftrennung mit SDS-Probenpuffer versetzt, welcher β -Mercaptoethanol enthielt (siehe 6.11) und wodurch die Disulfid-Brücken der Proteine reduziert wurden. Zur vollständigen Denaturierung werden die Proben im SDS-Puffer bei 96°C für 4 min aufgeköcht und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V für 1 h. Das Trenngel wurde im Anschluss direkt angefärbt (siehe 7.7.10) oder für ein Immunblot (siehe 7.9.6) eingesetzt.

7.9.3 Proteinfärbe-Methoden

Zur Visualisierung der durch die SDS Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine, wurden die Polyacrylamidgele mit bestimmten Färbemethoden unterschiedlicher Sensitivität detektiert. Mit der Coomassie Brilliant BlueTM (G-250) Färbemethode konnten Proteinmengen über 1 μ g pro Proteinbande nachgewiesen werden. In einer sauren alkoholischen Lösung wurde das Gel entweder für 30 s erwärmt oder 1 bis 2 h bei RT geschwenkt. Dabei wurden die Proteine im Gel fixiert und durch eine Komplexbildung mit dem Coomassie angefärbt. In einem Entfärbegrad (40% EtOH, 10% Essigsäure) wurde die Hintergrundfärbung unter Schwenken entfernt bis alle Banden deutlich sichtbar waren. Eine sensitivere Färbung erfolgte mit kolloidalem Coomassie (siehe 6.11) für 24 h. Das Gel wurde durch Schütteln in H₂O entfärbt. Zum Nachweis von geringen Proteinmengen wurde die Silberfärbung angewendet (siehe 6.11). Diese Färbemethode dient nicht zur quantitativen Mengenbestimmung der Proteine. Dabei wurde das Proteingel für 10 min in Lösung 1 geschwenkt und dann 3 – 6 mal für jeweils 5 – 10 min mit dH₂O gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit AgNO₃ (Lösung 2) für 10 – 20 min. Die Entwicklung der Färbung wurde durch die Lösung 3 ausgelöst, welche das Färbesubstrat Na₂CO₃ enthielt. Die Färbereaktion wurde mit Lösung 4 (0,05 M EDTA) gestoppt. Die Gele wurden zur Dokumentation im Lichtscanner digitalisiert oder in einem Bio-Rad Geltdrockner zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet.

7.9.4 Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Herstellung von Bakterienlysaten von *S. pneumoniae* wurden 3 ml einer Bakterienkultur (OD₆₀₀ = 0,4) bei 4500 x g für 5 min zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 μ l PBS aufgenommen, mit 100 μ l Protein-Probenpuffer versetzt und für 10 min aufgeköcht. 10 μ l dieses Bakterienlysates wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

7.9.5 Zellaufschluss von Bakterien

Die aufbereiteten Bakteriensedimente wurden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in 6 ml PBS aufgenommen. Zusätzlich wurde 2 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Proteinase-Inhibitor zugegeben. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte mit einer Hochdruckhydraulikpresse, der so genannten French Press. Durch einen Unterdruck wurde die Suspension in den vorgekühlten Zylinder gesogen und einem Druck von ca. 40000 Psi ausgesetzt. Durch ein Ventil wurde die Probe kontrolliert aus dem Zylinder entfernt. Der Zellaufschluss erfolgte aufgrund der entstehenden Kavitation und der Turbulenz im Ventil. Dieser Vorgang wurde ca. 3-bis 4-mal wiederholt. Eine Alternative zur French Press war die induzierte Zellyse durch Ultraschalleinwirkungen durch den Sonifikator. Dabei wurde die Probe regelmäßigen Ultraschallstößen ausgesetzt, welche zum erfolgreichen Zellaufschluss der Bakterien führte. Die Zellsuspension wurde im Anschluss zur Abtrennung der Zelltrümmer 30 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Aufreinigung von Fusionsproteinen eingesetzt.

7.9.6 Western Blot (Semi-Dry Verfahren)

Beim Western-Blot werden aufgetrennte Proteine einer SDS-PAGE elektrophoretisch auf eine mit Methanol aktivierte PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran oder auf Nitrocellulose übertragen und somit für eine spezifische Antikörperdetektion fixiert. Der Transfer erfolgte nach dem Semi-Dry Verfahren, bei dem die feuchte Membran auf drei Lagen in Puffer getränktem Filterpapier lag, das Gel luftblasenfrei auf die Membran gelegt wurde und mit weiteren drei Lagen getränktem Filterpapier bedeckt wurde. Die Proteine wurden durch den Aufbau eines elektrischen Feldes bei 15 V für 45 min auf die Membran transferiert. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden mit 10% Magermilch in PBS für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Der Detektion mit einem spezifischen Primärantikörper für mindestens 2 h bei RT, folgte die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper für 1 Stunde. Nicht gebundener Antikörper wurde nach einem 10-minütigen Waschschrift mit PBS von der Membran entfernt. Die enzymatische Nachweisreaktion wurde in 7 ml PBS durch den Zusatz von 12 µl H₂O₂ und 200 µl Chloronaphthol (Sigma) ausgelöst. Positive Banden wurden somit anhand einer Farbreaktion auf der Membran detektiert.

7.9.7 Aufreinigung von MBP Proteinen mittels Affinitätschromatographie

Für die Aufreinigung von MBP-Fusionsproteinen wurde Amylose-Agarose als Säulenmaterial verwendet. 5 ml des Säulenmaterials wurden mit 8 Volumen mit Säulenpuffers (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Dabei wurde das Säulenmaterial jeweils bei 3000 x g für 5 min sedimentiert. Die Bindung des Fusionsproteins an das Säulenmaterial erfolgte schwenkend bei 4°C über Nacht. Im Anschluss wurde das beladene Säulenmaterial in eine Säule gegeben, eine Pumpe an die Säule angeschlossen und mit Säulenpuffer kontinuierlich bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte durch die Zugabe von 10 mM Maltose, und das Eluat wurde fraktionsweise aufgefangen. Die Fraktionen wurden anschließend durch SDS-PAGE und Coomassiefärbung auf ihre Proteinmenge und den Reinheitsgrad untersucht. Die Regeneration des Säulenmaterials wurde durch Waschen mit je 3 Säulenvolumen dH₂O, 0,1% SDS, dH₂O und Säulenpuffer durchgeführt. Das regenerierte Säulenmaterial wurde bei 4°C gelagert und konnte bis zu fünf Mal wieder verwendet werden.

7.9.8 Aufreinigung von MBP-Proteinen mittels Ionenaustauschchromatographie

Zur weiteren und spezifischeren Aufreinigung von Proteinen wurden die Proben mittels Ionenaustauschchromatographie aufbereitet. Das Prinzip dieses Verfahrens basiert auf die Trennung von Proteinen unter Berücksichtigung ihres spezifischen Ladungszustands begründet auf deren bestimmten Aminosäurezusammensetzung. Gemäß ihrer spezifischen Nettoladung können Proteine unter bestimmten pH-Wert-Bedingungen an eine Gelmatrix gebunden werden und mittels eines Ionenaustauschers, wie NaCl, wieder eluiert und kontrolliert fraktioniert werden. Der Zeitpunkt des Ablösens von der Säule ist spezifisch und für jedes Protein unterschiedlich definiert. Die Chromatographie wurde hier mit einer HiTrap Q SepharoseTM High Performance (Amersham Bioscience) Aufreinigungssäule mit Hilfe des FPLC Chromatographiesystems durchgeführt.

7.9.9 Die Bradford Quantifizierung von isolierten Proteinen

Die Quantifizierung von gereinigten Proteinen erfolgte mit Hilfe des Bradford-Tests, bei der es sich um eine sensitive photometrische Messmethode von Proteinen handelt (Bradford, 1976). Dabei bildet der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 die Grundlage der nachweisbaren Färbemethode. Dieser kann im sauren Milieu Komplexe mit Proteinen eingehen, wobei es zu einer Adsorptionsspektrumsverschiebung von 470 nm auf

595 nm kommt. Zur Bestimmung der Proteinmenge müssen Kalibrierungsstandards mit bekannter Konzentration eingesetzt werden. 600 µl Bradfordreagenz wurden mit jeweils 20 µl Proteinprobe bzw. –standard bei RT für 20 min inkubiert. Mit einer BSA-Konzentrationsreihe von 1 – 10 µg pro 20 µl wurde die Adsorption von 20 µl Proteinprobe in 600 µl Bradfordlösung bei 595 nm gemessen. Die Proteinmenge wurde nach Erstellung der Eichgerade der Kalibrierungsstandards rechnerisch bestimmt.

7.10 Auswertung der durchflusszytometrischen Analysen

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit dem Geräten FACS-Calibur und FACS-Canto 1 und 2 von Becton Dickinson durchgeführt. Durch die fluidizile Zelle werden die zu messenden Partikel vereinzelt aufgetrennt. Die einzelne Zelle passiert den fokussierten Laserstrahl und wird dabei unter Einbezug verschiedener Parameter über Detektoren erfasst. Auf Grund der strukturierten Oberflächenbeschaffenheit der Zelle wird das Licht in Folge des Lasereinfalls in bestimmte Richtungen gelenkt bzw. gestreut. Mit dem Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) wird die Streuung gemessen, welches in Richtung des einfallenden Lichtstrahls fällt. FSC stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) hingegen, ist Licht, das im rechten Winkel gestreut wird und der spezifischen intrazellulären Granularität entspricht. Durch diese Parameter FSC und SSC, dargestellt im Punktwolkendiagramm (Dotplot) im linearen Bereich, erfolgt die Unterscheidung und Eingrenzung der gewünschten Zellpopulationen. Die Fluoreszenzgrenze der Ereignisse wurde bei jeder Messung durch ungefärbte Präparate neu eingestellt. Für die Detektion von Immunfluoreszenzen wurde immer die logarithmische Darstellung gewählt, da diese Darstellung den dynamischen Messbereich vergrößert, dass sowohl schwächere als auch stärkere Signale mit derselben Skalierung erfasst werden können. Die statistische Auswertung erfolgte entweder mittels Einparameterdarstellung (Histogramm) oder Zweiparameterdarstellung in Form eines Punktwolkendiagramms. Dabei wurde die gemessene Fluoreszenz relativ zum SSC dargestellt. Der Datenvergleich erfolgte entweder über den ermittelten Prozentsatz oder über die geometrische mittlere Fluoreszenz-Intensität (GMFI) der positiv gefärbten Ereignisse. Außerdem konnte durch die Multiplikation von GMFI und Anteil an Fluoreszenz-markierten Ereignissen die Gesamtbindeaktivität berechnet werden. Für die Auswertung wurden die Programme WinMDI, CellQuestPro und FACS-Diva verwendet.

7.11 Statistische Auswertung

Bei allen dargestellten Infektionsversuchen wurden nach mindestens dreimaliger Durchführung unter identischen Bedingungen der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Die Arbeit mit Primärzellen beinhaltete außerdem die Verwendung verschiedener Zellchargen aus verschiedenen Donoren. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch den Student T-Test berechnet. Der T-Test wurde ungepaart und zweiseitig durchgeführt. Signifikanz-Werte von $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angenommen. Zur Aufbereitung der Daten wurde das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet. Zur graphischen Darstellung der Daten und die Kalkulation der statistischen Werte wurde GraphPadPrism benutzt.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------|--|
| α | anti |
| Abb. | Abbildung |
| ABTS | 2, 2-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid) |
| APC | antigenpräsentierende Zelle |
| APS | Ammoniumperoxiddisulfat |
| Arg | Arginin |
| Asp | Aspartat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BC | Buffy Coats |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CFU | colony-forming units |
| CLSM | confocal laser scanning microscopy |
| cps | capsular polysaccharide |
| CSP | Competence stimulating peptide |
| CSPD | Disodium 3-(4-methoxyspirol (1,2-dioxetan-3,2-(5'-chloro) tricyclo-decan) -4yl) phenylphosphat |
| C | Cytosin |
| Da | Dalton |
| DC | dendritische Zelle |
| DCs | dendritische Zellen |
| ddH ₂ O | destilliertes Wasser |
| dest. | destilliert |
| d.h. | das heißt |
| dH ₂ O | deionisiertes Wasser |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DRK | Deutsches Rotes Kreuz |
| dNTP | Mischung aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP |
| ECM | extracellular matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EM | Elektronenmikroskopie |
| FBS | bovines Kälberserum |
| FITC | Fluorescein-Isothiacyanate |
| g | Gramm |
| G | Guanin |
| GlcNac | N-Acetylglukosamin |
| Gly | Glycin |
| GM-CSF | granulocytes macrophage colony stimulating factor |

| | |
|--------------|---------------------------------------|
| GMFI | geometric mean fluorescence intensity |
| h | Stunde |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IC | Inclusion Bodies |
| IPTG | Isopropylthio- β -galactosid |
| kb | Kilobasenpaare |
| kDa | Kilodalton |
| Konz. | Konzentration |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| Lsg. | Lösung |
| LTA | lipoteichoicacid |
| M | molar(mol/l) |
| m | milli (10^{-3}) |
| MFI | mean fluorescence intensity |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MOI | multiplicity of infection |
| MurNac | <i>N</i> -Acetylmuraminsäure |
| MW | Molekulargewicht |
| μ | mikro (10^{-6}) |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |
| n | nano (10^{-9}) |
| NADH | Nikotinamidadenindinukleotid |
| nm | Nanometer |
| n.s. | nicht signifikant |
| OD | Optische Dichte |
| o.g. | oben genannt |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| Pen | Penicillin |
| PVDF | Polyvinylidinfluoride |
| qRT-PCR | quantitative Real Time PCR |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | rotations per minute |
| RPS9 | riosomales Protein S9 |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| <i>S. p.</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| T | Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| THY | Todd Hewitt Broth |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan |

| | |
|----------|---|
| TRIS-HCL | Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid |
| U | Unit (Enzymeinheit) |
| u.a. | unter anderem |
| u.U. | unter Umständen |
| ü/N | über Nacht |
| V | Volt (Einheit der Spannung) |
| (v/v) | Volumenprozent |
| vgl. | Vergleiche |
| vol | Volumen |
| (w/v) | Gewichtsanteil |
| (w/w) | Gewichtsprozent |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZK | Zellkultur |

8.2 Laborgeräte

| Gerätbezeichnung | Firma |
|---|-------------------|
| Agarose-Gelelektrophoresekammer | Gibco |
| Autoklav | H&P/ Tecnomara |
| Biophotometer | Eppendorf |
| Brutschrank: Bakterien, 37°C, 5% CO ₂ | Binder |
| Brutschrank: Zellen, 37°C, 5% CO ₂ | Heraeus |
| Bunsenbrenner (fireboy) | Tecnomara |
| Eismaschine | Scotsman |
| ELISA-Reader | Thermo Labsystems |
| Entwicklermaschine | Fuji Photo Film |
| FACS-Calibur™ | Becton Dickinson |
| FACS-Canto™ | Becton Dickinson |
| Feinwaage | Kern/ Chyo |
| Filmkassette | BLB |
| Fluoroscans Ascent Reader | Therma Labsystems |
| French Pressure Cell Press | SLMAminco |
| Gefrierschränke, -20°C (Comfort/Premium No Frost) | Liebherr |
| Gel Air Drying System | Biorad |
| Geldokumentation | Biorad |
| Heizblock (Thermometer Compact) | eppendorf |
| Heizblock (Ori-Block DB-1) | Techne |
| Hybridisierungsöfen | Hybaid |
| Inkubationsschüttler, 37°C (Certomat BS-1) | Braun |
| Kühlschränke, 4°C | Bosch/ Liebherr |
| Luminex | Biosource |
| Magnetrührer (RCT basic) | IKA |
| Magnetrührer M20/1 | Franco |
| Mikroskope | |
| Confocales Laser Scanningmikroskop (TCSP3) | Leica |
| Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM) | Zeiss |
| Fluoreszenzmikroskop Axioskop | Zeiss |
| Fluoreszenzmikroskop (DMRBE) | Leitz/ Leica |
| Lichtmikroskop (Axiovert 25) | Zeiss |

| | |
|---|-----------------------------|
| Mikrowelle (Mikromat) | AEG |
| Multiscan Ascent | Thermo Lab |
| Multistep Pipettierhilfe | Brand |
| Neubauer Zählkammer | Brand |
| PCR-Thermocycler (T3 Thermocycler) | Biometra |
| PCR-Thermocycler | Thermo Hybaid, Eppendorf |
| Pipetten | Gilson/ Eppendorf |
| Pipettierhilfe | Brand |
| pH-Meter | WTW |
| Pumpe mit UV-Detektor für Affinitätschromatographie | Biorad |
| Quarzküvetten | Hellma |
| Scanner (Scanjet automatic document feeder) | HP |
| Schwenktisch WT 12 | Biometra |
| SDS-Gelelektrophoresekammer | Peqlab |
| Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000) | peqLab |
| Steril-Werkbänke | BDK |
| Stickstofftank -179°C (K Series Type M320) | Taylor Wharton |
| Tiefkühltruhe -80°C (Ultima II) | Revco |
| Transblot SD Semidry Transfer Cell | Biorad |
| Transluminator (GelDoc) | Biorad |
| Ultraschallgerät (Sonfier 250 und Ultrasonic cleaner) | Branson, Unisonic |
| UV-Stratalinker | Stratagene |
| Vakuumpumpe | KNF |
| Video graphic Printer | Sony |
| Vortexer | IKA |
| Waage | Kern |
| Wasserbäder | GFL |
| Zentrifugen | |
| Biofuge fresco | Heraeus |
| Centrifuge 5810 | eppendorf |
| CP Centrifuge | Beckmann |
| Centrifuge 5417R | eppendorf |
| Megafuge 3.0R | Heraeus |
| Sorvall T6000B | DuPont |
| Sorvall RC 5B | DuPont |

8.3 Verbrauchsmittel

| | |
|---|-----------------|
| Butterflykanülen | Rose GmbH |
| Deckgläschen | Hartenstein |
| Einmalpipetten, steril, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner |
| FACS-Röhrchen, 5 ml (Polysterene Round-bottom tube) | BD Biosciences |
| Großer Sterilfilter | Millipore |
| Handschuhe (Flexam) | Cardinal health |
| Injektionskanülen | Rose GmbH |
| 4-, 24-, 96-Kavitätenplatten (bioone Cellstar) | Greiner |
| Mikrotiterplatten (Maxisorp) | Nunc |
| Mirkotiterröhrchen MC10 (200 µl) | Hartenstein |

| | | |
|--|----------------|------------------|
| Nitrocellulosemembran | | Macherey-Nagel |
| Nylonmembran | | Macherey-Nagel |
| Nitril-Handschuhe (NitrilSoft Nitril 25 cm) | | SLG |
| Papiertücher | | SCA |
| Parafilm | | Hartenstein |
| Pasteurpipetten | | Brand |
| PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml (MicroAmp) | | Perkin Elmer |
| PCR Softstrips | | Biozym |
| Petrischalen | | Greiner |
| Pipettenspitzen | 10 µl | Sarstedt |
| | 200 µl | Brand |
| | 1000 µl | Hartenstein |
| Plastikküvetten, 1,5 µl (Plastikbrand) | | Brand |
| PVDF-Membran | | Millipore |
| qPCR 96-well plate (ABI FAST systems) | | Eurogentec |
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml | ABgene |
| | 1,5 ml/ 2,0 ml | eppendorf |
| Reaktionsgefäße, konisch, 15 ml/ 50 ml (Falcon, BlueMax) | | Becton Dickinson |
| Röntgenfilme | | Amersham |
| Skalpell | | Braun |
| Steril-Filter, 0,22 µm, Durchmesser 33 mm | | Millipore |
| Objektträger | | Marienfeld |
| Wattestäbchen (Cotton Tips) | | Megro |
| Whatmanpapier | | Noras |
| Zentrifugenröhrchen, 12 ml | | Greiner |
| Zellkulturflaschen, 25 cm ² / 75 cm ² (red filter cap) | | Greiner |
| Zellkulturschalen | | Greiner |

8.4 Chemikalien

| | |
|---|----------------|
| ABTS | Boehringer |
| Aceton | Roth |
| Acrylamid-N, N-Methylen-Bisacrylamid | Roth |
| Agar | Difco |
| Agarose | Peqlab, Seekem |
| Aktivkohle | Roth |
| Ammonium-Persulfat | BioRad |
| Ammoniumsulfat | Applichem |
| Ampicillin | Sigma |
| Ampuwa® Spüllösung Aqua ad iniectabilia | Fresenius Kabi |
| Bacillol® AF | Bode |
| Bacto-Agar | Difco |
| Bacto-Trypton | Difco |
| BD FACS Clean | BD Biosciences |
| BD FACS Flow™ | BD Biosciences |
| BD FACS Shutdownsolution | BD Biosciences |
| Biotin | Sigma |
| Blockreagenz | Roche |
| Blutagarplatten | Oxoid, BD |

| | |
|--|-----------|
| Bromphenolblau | Applichem |
| BSA | Biolabs |
| CaCl ₂ -Dihydrat A. (99,5%) | Merck |
| Chloramin T | Sigma |
| Cloramphenicol | Serva |
| Chloronaphtol | Sigma |
| Coomassie Brilliant Blue™ R250 | BioRad |
| Coomassie Brilliant Blue™ G250 | BioRad |
| CSPD | Roche |
| L-Cystein | Sigma |
| DEPC | Sigma |
| Dimethylsulfoxid | Sigma |
| ECL-Reagenz | Amersham |
| EDTA | Applichem |
| Eisessig | Baker |
| Erythromycin | Sigma |
| Ethanol | Merck |
| Ethidiumbromid | Applichem |
| Formamid | Merck |
| Ficoll | Sigma |
| Gelatine | Sigma |
| Glukose | Applichem |
| Glycerin | Merck |
| Glycin | Applichem |
| Harnstoff | Roth |
| Hefe-Extrakt | Roth |
| Hering Sperm DNA | Gibco |
| Histopaque | Sigma |
| Immersionsöl | Zeiss |
| Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid | Roth |
| Isopropano | Baker |
| Kanamycin | Serva |
| KCL | Roth |
| KH ₂ PO ₄ | Sigma |
| K ₂ HPO ₄ | Sigma |
| Lysozym | Applichem |
| Magermilchpulver | Applichem |
| MgCl ₂ -Hexahydrat | Merck |
| Maleinsäure | Applichem |
| Mercaptoethanol | Sigma |
| Methanol | Roth |
| Moviol | Aldrich |
| Mutanolysin | Sigma |
| N-Laurylsarcosyl | Sigma |
| Natriumacetat | Applichem |
| Natriumcitrat | Merck |
| NaCl | Roth |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck |

| | |
|----------------------------------|------------------|
| NaH ₂ PO ₄ | Merck |
| NaOH | Roth |
| Ammoniumacetat | Riedel de Haen |
| Paraformaldehyd | Fluka |
| Pepton | Roth |
| Penicillin/Streptomycin-Lösung | PAA |
| pH-Meter Kalibrierlösungen | Sigma |
| PMSF | Applichem |
| RNaseA | Serva |
| Salzsäure | Roth |
| SDS | Roth |
| Spectinomycin | Sigma |
| Stickstoff | Linde |
| Syto 13 | Molecular Probes |
| TEMED | Roth |
| Tetracyclin | Serva |
| Todd Hewitt Broth | Roth |
| Tris | Applichem |
| Triton-X-100 | Applichem |
| Trockenmilchpulver | Applichem |
| Trypanblau | Gibco BRL |
| Trypton | Roth |
| Trypsin/EDTA | Gibco |
| Tween® | Sigma |
| Wasserstoffperoxid | Merck |
| WST-8 Reagenz | Alexis |

8.5 Software

| | |
|--|--------------------------|
| Adobe Acrobat Standard 8.0.0 | Adobe Systems |
| Adobe Illustrator | Adobe |
| Adobe Photoshop | Adobe |
| ABI Prism Sequencing Analysis Software | Applied Biosystems |
| CellQuestPro | BD Bioscience/Mac Intosh |
| CLSM Software | Zeiss, Leica |
| DNAMAN 5.0 | Lynnon Biosoft |
| FACSDiva | BD Bioscience |
| FACSCalibur | BD Bioscience |
| GraphPad Prism | GraphPad |
| HP Precision ScanPro 3.02 | HP |
| MS Office Personal Edition | Microsoft |
| NanoDrop-1000 3.5.2 | peqLab |
| Quantity One 4.4.0 | Biorad |
| Reference Manager | Thomson Research Soft. |
| WinMDI | Josef Trotter Freeware |

8.6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., and Janeway, C.A., Jr. (2000)** Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**: 129-138.
- Adamou, J.E., Wizemann, T.M., Barren, P., and Langermann, S. (1998)** Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun* **66**: 820-822.
- Adrian, P.V., Bogaert, D., Oprins, M., Rapola, S., Lahdenkari, M., Kilpi, T. et al. (2004)** Development of antibodies against pneumococcal proteins alpha-enolase, immunoglobulin A1 protease, streptococcal lipoprotein rotamase A, and putative proteinase maturation protein A in relation to pneumococcal carriage and Otitis Media. *Vaccine* **22**: 2737-2742.
- Akira, S., Hoshino, K., and Kaisho, T. (2000)** The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res* **6**: 383-387.
- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001)** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**: 675-680.
- Albiger, B., Sandgren, A., Katsuragi, H., Meyer-Hoffert, U., Beiter, K., Wartha, F. et al. (2005)** Myeloid differentiation factor 88-dependent signalling controls bacterial growth during colonization and systemic pneumococcal disease in mice. *Cell Microbiol* **7**: 1603-1615.
- Albrich, W.C., Baughman, W., Schmotzer, B. and Farley, M.M. (2007).** Changing characteristics of invasive pneumococcal disease in Metropolitan Atlanta, Georgia, after introduction of a 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Clin Infect Dis* **44**:1569-76
- Alexander, J.E., Lock, R.A., Peeters, C.C., Poolman, J.T., Andrew, P.W., Mitchell, T.J. et al. (1994)** Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **62**: 5683-5688.
- AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A.F., Verhoef, J., and Snippe, H. (1995)** *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **59**: 591-603.
- Anderton, J.M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A.P., Carlone, G.M. et al. (2007)** E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **42**: 225-236.
- Austrian, R. (1981)** Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev Infect Dis* **3 Suppl**: S1-17.

- Austyn, J.M. (1996) New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **183**: 1287-1292.
- Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C. *et al.* (2008) A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol* **190**: 5480-5492.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J. *et al.* (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A. *et al.* (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2857-2862.
- Bekeredjian-Ding, I., Roth, S.I., Gilles, S., Giese, T., Ablasser, A., Hornung, V. *et al.* (2006) T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes. *J Immunol* **176**: 7438-7446.
- Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.M., Simard, M., Olivier, M., and Bergeron, M.G. (1998) Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* **66**: 912-922.
- Bergmann, S., and Hammerschmidt, S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152**: 295-303.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40**: 1273-1287.
- Bergmann, S., Rohde, M., and Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect Immun* **72**: 2416-2419.
- Bergmann, S., Rohde, M., Preissner, K.T., and Hammerschmidt, S. (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost* **94**: 304-311.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2003) Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed alpha-enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **49**: 411-423.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D., and Paton, J.C. (1989) Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 2324-2330.

- Berry, A.M., Lock, R.A., Thomas, S.M., Rajan, D.P., Hansman, D., and Paton, J.C. (1994)** Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* **62**: 1101-1108.
- Berry, A.M., and Paton, J.C. (2000)** Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect Immun* **68**: 133-140.
- Bertho, N., Adamski, H., Toujas, L., Debove, M., Davoust, J., and Quillien, V. (2005)** Efficient migration of dendritic cells toward lymph node chemokines and induction of T(H)1 responses require maturation stimulus and apoptotic cell interaction. *Blood* **106**: 1734-1741.
- Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E., Ray, P., Hansen, J.R. et al. (2000)** Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* **19**: 187-195.
- Bogaert, D., De, G.R., and Hermans, P.W. (2004)** *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* **4**: 144-154.
- Boulnois, G.J. (1992)** Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **138**: 249-259.
- Boulnois, G.J., Paton, J.C., Mitchell, T.J., and Andrew, P.W. (1991)** Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **5**: 2611-2616.
- Braathen, R., Sandvik, A., Berntzen, G., Hammerschmidt, S., Fleckenstein, B., Sandlie, I. et al. (2006)** Identification of a polymeric Ig receptor binding phage-displayed peptide that exploits epithelial transcytosis without dimeric IgA competition. *J Biol Chem* **281**: 7075-7081.
- Bracht, D. (2005)**. Proteomanalyse von *Streptococcus pneumoniae*. Dissertation.
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Briles, D.E., Yother, J., and McDaniel, L.S. (1988)** Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev Infect Dis* **10 Suppl 2**: S372-S374.
- Brown, J.H. (1937)** Appearance of Double-Zone Beta Hemolytic Streptococci in Blood Agar. *J Bacteriol* **34**: 35-48.
- Burman, L.A., Norrby, R., and Trollfors, B. (1985)** Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* **7**: 133-142.

- Burns, S., Hardy, S.J., Buddle, J., Yong, K.L., Jones, G.E., and Thrasher, A.J. (2004)** Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil Cytoskeleton* **57**: 118-132.
- Butler, J.C. (1997)** Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. *Microb Drug Resist* **3**: 125-129.
- Camara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994)** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* **62**: 3688-3695.
- Cartwright, K. (2002)** Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr* **161**: 188-195.
- Cavrois, M., Neidleman, J., and Greene, W.C. (2008)** The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection. *PLoS Pathog* **4**: e1000051.
- Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. (1999)** Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**: 919-923.
- Centers for Disease Control and Prevention. (1997).**
- Chapuy-Regaud, S., Ogunniyi, A.D., Diallo, N., Huet, Y., Desnottes, J.F., Paton, J.C. et al. (2003)** RegR, a global LacI/GalR family regulator, modulates virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**: 2615-2625.
- Chhatwal, G.S. (2002)** Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends Microbiol* **10**: 205-208.
- Christie, J., McNab, R., and Jenkinson, H.F. (2002)** Expression of fibronectin-binding protein FbpA modulates adhesion in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* **148**: 1615-1625.
- Colino, J., Shen, Y., and Snapper, C.M. (2002)** Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J Exp Med* **195**: 1-13.
- Colino, J., and Snapper, C.M. (2003a)** Opposing signals from pathogen-associated molecular patterns and IL-10 are critical for optimal dendritic cell induction of in vivo humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* **171**: 3508-3519.
- Colino, J., and Snapper, C.M. (2003b)** Two distinct mechanisms for induction of dendritic cell apoptosis in response to intact *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol* **171**: 2354-2365.

- Collen, D., Ong, E.B., and Johnson, A.J. (1975)** Human plasminogen: in vitro and in vivo evidence for the biological integrity of NH₂-terminal glutamic acid plasminogen. *Thromb Res* **7**: 515-529.
- Colmenares, M., Puig-Kroger, A., Pello, O.M., Corbi, A.L., and Rivas, L. (2002)** Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* **277**: 36766-36769.
- Corinti, S., Medaglini, D., Cavani, A., Rescigno, M., Pozzi, G., Ricciardi-Castagnoli, P., and Girolomoni, G. (1999)** Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **163**: 3029-3036.
- Courtney, H.S., Dale, J.B., and Hasty, D.I. (1996)** Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEp-2 tissue culture cells. *Infect Immun* **64**: 2415-2419.
- Courtney, H.S., Li, Y., Dale, J.B., and Hasty, D.L. (1994)** Cloning, sequencing, and expression of a fibronectin/fibrinogen-binding protein from group A streptococci. *Infect Immun* **62**: 3937-3946.
- Crain, M.J., Waltman, W.D., Turner, J.S., Yother, J., Talkington, D.F., McDaniel, L.S. et al. (1990)** Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **58**: 3293-3299.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., and Tuomanen, E.I. (1995)** *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435-438.
- Dave, S., Carmicle, S., Hammerschmidt, S., Pangburn, M.K., and McDaniel, L.S. (2004)** Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J Immunol* **173**: 471-477.
- de Las, R.B., Garcia, J.L., Lopez, R., and Garcia, P. (2001)** Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist* **7**: 213-222.
- De Smedt, T., Van, M.M., De, B.G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997)** Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* **27**: 1229-1235.
- Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1997)** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25**: 727-739.

- Doern, G.V. (2001)** Antimicrobial resistance with *Streptococcus pneumoniae*: much ado about nothing? *Semin Respir Infect* **16**: 177-185.
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., and Cossart, P. (2004)** FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Mol Microbiol* **53**: 639-649.
- Ekdahl, K., Braconier, J.H., and Svanborg, C. (1997)** Immunoglobulin deficiencies and impaired immune response to polysaccharide antigens in adult patients with recurrent community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* **29**: 401-407.
- Elm, C., Braathen, R., Bergmann, S., Frank, R., Vaerman, J.P., Kaetzel, C.S. et al. (2004a)** Ectodomains 3 and 4 of human polymeric Immunoglobulin receptor (hpIgR) mediate invasion of *Streptococcus pneumoniae* into the epithelium. *J Biol Chem* **279**: 6296-6304.
- Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.P., Chhatwal, G.S., and Hammerschmidt, S. (2004b)** Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hpIgR). *Indian J Med Res* **119 Suppl**: 61-65.
- Engelman, E. (2003)** Dendritic cell- based cancer immunotherapy. *Semin Oncol.* **30**: 23-9
- Fedson, D.S. (1998)** Pneumococcal vaccination in the United States and 20 other developed countries, 1981-1996. *Clin Infect Dis* **26**: 1117-1123.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., Perez, A., and Casal, J. (1998)** Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* **36**: 3447-3454.
- Filgueira, L., Nestle, F.O., Rittig, M., Joller, H.I., and Groscurth, P. (1996)** Human dendritic cells phagocytose and process *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* **157**: 2998-3005.
- Fine, D.P. (1975)** Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* **12**: 772-778.
- Fischer, C.P., Berntsen, A., Perstrup, L.B., Eskildsen, P., and Pedersen, B.K. (2007)** Plasma levels of interleukin-6 and C-reactive protein are associated with physical inactivity independent of obesity. *Scand J Med Sci Sports* **17**: 580-587.
- Fischetti, V.A., Pancholi, V., and Schneewind, O. (1990)** Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Mol Microbiol* **4**: 1603-1605.
- Foy, T.M., Aruffo, A., Bajorath, J., Buhlmann, J.E., and Noelle, R.J. (1996)** Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* **14**: 591-617.

- Freudenthal, P.S., and Steinman, R.M. (1990)** The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7698-7702.
- Gajewski, T.F., and Fitch, F.W. (1988)** Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* **140**: 4245-4252.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999)** Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**: 1249-1255.
- Garcia-Leoni, M.E., Moreno, S., Rodeno, P., Cercenado, E., Vicente, T., and Bouza, E. (1992)** Pneumococcal pneumonia in adult hospitalized patients infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Intern Med* **152**: 1808-1812.
- Geelen, S., Bhattacharyya, C., and Tuomanen, E. (1993)** The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* **61**: 1538-1543.
- Geijtenbeek, T.B., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B., and van Kooyk, Y. (2003)** Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med* **197**: 7-17.
- Geijtenbeek, T.B., and van Kooyk, Y. (2003)** DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr Top Microbiol Immunol* **276**: 31-54.
- Geslin, P., Fremaux, A., Sissia, G., and Spicq, C. (1998)** [Streptococcus pneumoniae: serotypes, invasive and antibiotic resistant strains. Current situation in France]. *Presse Med* **27 Suppl 1**: 21-27.
- Giebink, G.S., Verhoef, J., Peterson, P.K., and Quie, P.G. (1977)** Opsonic requirements for phagocytosis of Streptococcus pneumoniae types VI, XVIII, XXIII, and XXV. *Infect Immun* **18**: 291-297.
- Glimcher, L.H., and Singh, H. (1999)** Transcription factors in lymphocyte development-- T and B cells get together. *Cell* **96**: 13-23.
- Goldblatt, D. (2000)** Conjugate vaccines. *Clin Exp Immunol* **119**: 1-3.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I., and Masure, H.R. (2000)** Role of novel choline binding proteins in virulence of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* **68**: 5690-5695.
- Gray, B.M., Converse, G.M., III, and Dillon, H.C., Jr. (1979)** Serotypes of Streptococcus pneumoniae causing disease. *J Infect Dis* **140**: 979-983.

- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.P. (2005)** Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8710-8715.
- Hahn, C.L., Best, A.M., and Tew, J.G. (2007)** Rapid tissue factor induction by oral streptococci and monocyte-IL-1beta. *J Dent Res* **86**: 255-259.
- Hahn, C.L., Schenkein, H.A., and Tew, J.G. (2005)** Endocarditis-associated oral streptococci promote rapid differentiation of monocytes into mature dendritic cells. *Infect Immun* **73**: 5015-5021.
- Hammerschmidt, S. (2006)** Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol* **9**: 12-20.
- Hammerschmidt, S., Agarwal, V., Kunert, A., Haelbich, S., Skerka, C., and Zipfel, P.F. (2007)** The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol* **178**: 5848-5858.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H., and Chhatwal, G.S. (1999)** Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 1683-1687.
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P., and Chhatwal, G.S. (1997)** SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* **25**: 1113-1124.
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E., and Rohde, M. (2005)** Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 4653-4667.
- Hanage, W.P., Kaijalainen, T.H., Syrjanen, R.K., Auranen, K., Leinonen, M., Makela, P.H., and Spratt, B.G. (2005)** Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. *Infect Immun* **73**: 431-435.
- Harding, F.A., McArthur, J.G., Gross, J.A., Raulet, D.H., and Allison, J.P. (1992)** CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**: 607-609.
- Hava, D.L., Hemsley, C.J., and Camilli, A. (2003)** Transcriptional regulation in the *Streptococcus pneumoniae* rlrA pathogenicity islet by RlrA. *J Bacteriol* **185**: 413-421.
- Hehlhans, T., and Pfeffer, K. (2005)** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* **115**: 1-20.

- Henderson, R.A., Watkins, S.C., and Flynn, J.L. (1997)** Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **159**: 635-643.
- Hermans, P.W., Adrian, P.V., Albert, C., Estevao, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I.H. et al. (2006)** The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *J Biol Chem* **281**: 968-976.
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M.P., and Tomasz, A. (1994)** Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* **62**: 2715-2721.
- Hill, M.E., Ferguson, D.J., Austyn, J.M., Newsom-Davis, J., and Willcox, H.N. (1999)** Potent immunostimulatory dendritic cells can be cultured in bulk from progenitors in normal infant and adult myasthenic human thymus. *Immunology* **97**: 325-332.
- Hilleringmann, M., Giusti, F., Baudner, B.C., Maignani, V., Covacci, A., Rappuoli, R. et al. (2008)** Pneumococcal pili are composed of protofilaments exposing adhesive clusters of Rrg A. *PLoS Pathog* **4**: e1000026.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L., and Jenkinson, H.F. (2001)** The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* **41**: 1395-1408.
- Houldsworth, S., Andrew, P.W., and Mitchell, T.J. (1994)** Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* **62**: 1501-1503.
- Iannelli, F., Chiavolini, D., Ricci, S., Oggioni, M.R., and Pozzi, G. (2004)** Pneumococcal surface protein C contributes to sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* in mice. *Infect Immun* **72**: 3077-3080.
- Ibrahim, Y.M., Kerr, A.R., McCluskey, J., and Mitchell, T.J. (2004)** Control of virulence by the two-component system CiaR/H is mediated via HtrA, a major virulence factor of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**: 5258-5266.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R.M. (1993)** Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* **178**: 479-488.
- Janeway, C.A., Jr., and Medzhitov, R. (2002)** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Jantsch, J., Cheminay, C., Chakravorty, D., Lindig, T., Hein, J., and Hensel, M. (2003)** Intracellular activities of *Salmonella enterica* in murine dendritic cells. *Cell Microbiol* **5**: 933-945.

- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G., and Björck, L. (2000)** Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem* **275**: 37257-37263.
- Jarva, H., Hellwage, J., Jokiranta, T.S., Lehtinen, M.J., Zipfel, P.F., and Meri, S. (2004)** The group B streptococcal beta and pneumococcal Hic proteins are structurally related immune evasion molecules that bind the complement inhibitor factor H in an analogous fashion. *J Immunol* **172**: 3111-3118.
- Jiao, X., Lo-Man, R., Guernonprez, P., Fiette, L., Deriaud, E., Burgaud, S. et al. (2002)** Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* **168**: 1294-1301.
- Johnson, M.K., Geoffroy, C., and Alouf, J.E. (1980)** Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun* **27**: 97-101.
- Kalka-Moll, W.M., Tzianabos, A.O., Bryant, P.W., Niemeyer, M., Ploegh, H.L., and Kasper, D.L. (2002)** Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. *J Immunol* **169**: 6149-6153.
- Kato, M., Neil, T.K., Fearnley, D.B., McLellan, A.D., Vuckovic, S., and Hart, D.N. (2000)** Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol* **12**: 1511-1519.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E., and Havarstein, L.S. (2005)** Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol* **187**: 4338-4345.
- Kayser, B., Eckert, Zinkernagel (1997).** Medizinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag 9. Auflage.
- Khan, A.Q., Chen, Q., Wu, Z.Q., Paton, J.C., and Snapper, C.M. (2005)** Both innate immunity and type 1 humoral immunity to *Streptococcus pneumoniae* are mediated by MyD88 but differ in their relative levels of dependence on toll-like receptor 2. *Infect Immun* **73**: 298-307.
- Kim, J.O., and Weiser, J.N. (1998)** Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **177**: 368-377.
- King, S.J., Whatmore, A.M., and Dowson, C.G. (2005)** NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol* **187**: 5376-5386.
- Koedel, U., Rupprecht, T., Angele, B., Heesemann, J., Wagner, H., Pfister, H.W., and Kirschning, C.J. (2004)** MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain* **127**: 1437-1445.

- Kolb-Maurer, A., Gentschev, I., Fries, H.W., Fiedler, F., Brocker, E.B., Kampgen, E., and Goebel, W. (2000)** *Listeria monocytogenes*-infected human dendritic cells: uptake and host cell response. *Infect Immun* **68**: 3680-3688.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lancefield, R.C. (1933)** A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* **57**: 571-595.
- Larsson, M., Majeed, M., Ernst, J.D., Magnusson, K.E., Stendahl, O., and Forsum, U. (1997)** Role of annexins in endocytosis of antigens in immature human dendritic cells. *Immunology* **92**: 501-511.
- Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P. et al. (2001)** A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**: 555-571.
- Lee, C.J., Banks, S.D., and Li, J.P. (1991)** Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol* **18**: 89-114.
- Lemieux, J., Woody, S., and Camilli, A. (2008)** The roles of the sortases of *Streptococcus pneumoniae* in assembly of the RlrA pilus. *J Bacteriol.*
- Lenz, L.L., Mohammadi, S., Geissler, A., and Portnoy, D.A. (2003)** SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 12432-12437.
- Linsley, P.S., and Ledbetter, J.A. (1993)** The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* **11**: 191-212.
- Liu, J., Cao, S., Herman, L.M., and Ma, X. (2003)** Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)-gamma-primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J Exp Med* **198**: 1265-1276.
- Loda, F.A., Collier, A.M., Glezen, W.P., Strangert, K., Clyde, W.A., Jr., and Denny, F.W. (1975)** Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children. *J Pediatr* **87**: 1087-1093.
- Loof, T.G., Goldmann, O., and Medina, E. (2008)** Immune recognition of *Streptococcus pyogenes* by dendritic cells. *Infect Immun* **76**: 2785-2792.
- Loof, T.G., Rohde, M., Chhatwal, G.S., Jung, S., and Medina, E. (2007)** The contribution of dendritic cells to host defenses against *Streptococcus pyogenes*. *J Infect Dis* **196**: 1794-1803.
- Loosli, C.G. (1949)** The problem of control of the respiratory tract infections. *J Lancet* **69**: 245-250.

- Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., and Boyle, M.D. (1994)** Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol* **2**: 20-24.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C., Cieslewicz, M.J., Lipsitch, M., Thompson, C.M. et al. (2003)** Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1966-1971.
- Marra, A., Lawson, S., Asundi, J.S., Brigham, D., and Hromockyj, A.E. (2002)** In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology* **148**: 1483-1491.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C., and Wold, A.E. (2008)** Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun*.
- Marton, A. (1992)** Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. *Clin Infect Dis* **15**: 106-111.
- Mascher, T., Zahner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B., and Hakenbeck, R. (2003)** The *Streptococcus pneumoniae* *cia* regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* **185**: 60-70.
- McDaniel, L.S., Ralph, B.A., McDaniel, D.O., and Briles, D.E. (1994)** Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. *Microb Pathog* **17**: 323-337.
- McDaniel, L.S., Sheffield, J.S., Delucchi, P., and Briles, D.E. (1991)** PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. *Infect Immun* **59**: 222-228.
- Medina, E., Goldmann, O., Toppel, A.W., and Chhatwal, G.S. (2003a)** Survival of *Streptococcus pyogenes* within host phagocytic cells: a pathogenic mechanism for persistence and systemic invasion. *J Infect Dis* **187**: 597-603.
- Medina, E., Rohde, M., and Chhatwal, G.S. (2003b)** Intracellular survival of *Streptococcus pyogenes* in polymorphonuclear cells results in increased bacterial virulence. *Infect Immun* **71**: 5376-5380.
- Meltzer, U., and Goldblatt, D. (2006)** Pneumococcal polysaccharides interact with human dendritic cells. *Infect Immun* **74**: 1890-1895.
- Mitchell, T.J., Andrew, P. W. Saunders, F. K., Smith, A. N. and Boulnois, G. J. (1991).** Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. *Mol Microbiol* **5**(8): 1883-8.

- Mold, C., Rodic-Polic, B., and Du Clos, T.W. (2002)** Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol* **168**: 6375-6381.
- Moll, H. (1993)** Development of helper T cell subsets: a central role for interleukin 12. *Trends Microbiol* **1**: 209-210.
- Moll, H., Fuchs, H., Blank, C., and Rollinghoff, M. (1993)** Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**: 1595-1601.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., and Tough, D.F. (2002)** Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**: 3263-3271.
- Moore, K.W., de Waal, M.R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001)** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Morgan, P.J., Hyman, S.C., Byron, O., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., and Rowe, A.J. (1994)** Modeling the bacterial protein toxin, pneumolysin, in its monomeric and oligomeric form. *J Biol Chem* **269**: 25315-25320.
- Morgan, P.J., Hyman, S.C., Rowe, A.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., and Saibil, H.R. (1995)** Subunit organisation and symmetry of pore-forming, oligomeric pneumolysin. *FEBS Lett* **371**: 77-80.
- Mosmann, T.R., and Sad, S. (1996)** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **17**: 138-146.
- Mulholland, K. (1999)** Strategies for the control of pneumococcal diseases. *Vaccine* **17 Suppl 1**: S79-S84.
- Mufson, M.A. (1990).** *Streptococcus pneumoniae* in: Mandell G. L., Douglas R.G., Bennet J.E. Principles and practice of infectious diseases: 1539.
- Musher, D.M. (1992)** Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis* **14**: 801-807.
- Navarre, W.W., and Schneewind, O. (1994)** Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **14**: 115-121.
- O'Garra, A., and Arai, N. (2000)** The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* **10**: 542-550.
- Oggioni, M. R., Memmi, G.T., Maggi, D. Chiavolini, F. Iannelli and Pozzi, G. (2003).** Pneumococcal zinc metalloproteinase ZmpC cleaves human matrix metalloproteinase 9 and is a virulence factor in experimental pneumonia. *Mol Microbiol* **49**(3): 795-805.

- Orihuela, C.J., Radin, J.N., Sublett, J.E., Gao, G., Kaushal, D., and Tuomanen, E.I. (2004)** Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* **72**: 5582-5596.
- Overweg, K., Pericone, C.D., Verhoef, G.G., Weiser, J.N., Meiring, H.D., De Jong, A.P. et al. (2000)** Differential protein expression in phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 4604-4610.
- Paton, J.C. (1996)** The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol* **4**: 103-106.
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., and Mitchell, T.J. (1993)** Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* **47**: 89-115.
- Paton, J.C., and Ferrante, A. (1983)** Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect Immun* **41**: 1212-1216.
- Pearce, B.J., Iannelli, F., and Pozzi, G. (2002)** Construction of new unencapsulated (rough) strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **153**: 243-247.
- Pelton, S.I., Dagan, R., Gaines, B.M., Klugman, K.P., Laufer, D., O'Brien, K., and Schmitt, H.J. (2003)** Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine* **21**: 1562-1571.
- Poland, G.A. (1999)** The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. *Vaccine* **17**: 1674-1679.
- Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., and Simon, D. (1998)** Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **66**: 5620-5629.
- Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M. et al. (2005)** PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**: 2680-2689.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Berche, P., Milon, G., Geissmann, F., and Gaillard, J.L. (2001)** Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol* **3**: 331-340.
- Quin, L.R., Onwubiko, C., Moore, Q.C., Mills, M.F., McDaniel, L.S., and Carmicle, S. (2007)** Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect Immun* **75**: 4082-4087.

- Reinert, R.R., Luticken, R., Sutcliffe, J.A., Tait-Kamradt, A., Cil, M.Y., Schorn, H.M. et al. (2004)** Clonal relatedness of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 1369-1373.
- Reis e Sousa (2001)** Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* **14**: 495-498.
- Reis e Sousa (2006)** Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **6**: 476-483.
- Ren, B., McCrory, M.A., Pass, C., Bullard, D.C., Ballantyne, C.M., Xu, Y. et al. (2004a)** The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* **173**: 7506-7512.
- Ren, B., Szalai, A.J., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2004b)** Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect Immun* **72**: 114-122.
- Ren, B., Szalai, A.J., Thomas, O., Hollingshead, S.K., and Briles, D.E. (2003)** Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **71**: 75-85.
- Rennemeier, C., Hammerschmidt, S., Niemann, S., Inamura, ., Zahringer, U., and Kehrel, B.E. (2007)** Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *FASEB J* **21**: 3118-3132.
- Riesenfeld-Orn, I., Wolpe, S., Garcia-Bustos, J.F., Hoffmann, M.K., and Tuomanen, E. (1989)** Production of interleukin-1 but not tumor necrosis factor by human monocytes stimulated with pneumococcal cell surface components. *Infect Immun* **57**: 1890-1893.
- Roberts, I.S. (1996)** The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 285-315.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B. et al. (1994)** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**: 83-93.
- Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Sampson, J.S., Johnson, S.E., Stinson, A., Carlone, G.M., and Ades, E.W. (2003)** Inhibition of pneumococcal adherence to human nasopharyngeal epithelial cells by anti-PsaA antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**: 246-251.
- Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, E., Sanchez-Puelles, J.M., and Lopez, R. (1987)** Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* **164**: 621-624.
- Rubins, J.B., Charboneau, D., Paton, J.C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., and Janoff, E.N. (1995)** Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J Clin Invest* **95**: 142-150.

- Rubins, J.B., Duane, P.G., Clawson, D., Charboneau, D., Young, J., and Niewoehner, D.E. (1993)** Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **61**: 1352-1358.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T. et al. (1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995)** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**: 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994)** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**: 1109-1118.
- Salysers, A. A. and D. D. Whitt (1994).** Bacterial pathogenesis: a molecular approach. ASM Press.
- Sanchez-Puelles, J.M., Ronda, C., Garcia, J.L., Garcia, P., Lopez, R., and Garcia, E. (1986)** Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* **158**: 289-293.
- Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A., and Tuomanen, E. (1990)** The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J Exp Med* **171**: 439-448.
- Schroder, N.W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U. et al. (2003)** Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* **278**: 15587-15594.
- Scott, J.R., and Zahner, D. (2006)** Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Mol Microbiol* **62**: 320-330.
- Sebert, M.E., Palmer, L.M., Rosenberg, M., and Weiser, J.N. (2002)** Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **70**: 4059-4067.
- Shakhnovich, E.A., King, S.J., and Weiser, J.N. (2002)** Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun* **70**: 7161-7164.

- Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., Jr., and Briles, D.E. (2004)** PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. *Infect Immun* **72**: 5031-5040.
- Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002)** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**: 151-161.
- Silvennoinen-Kassinen, S., and Koskela, M. (1986)** Optimal conditions for the opsonophagocytosis test with *Streptococcus pneumoniae* serotypes 3, 6A, 7F and 19F and human granulocytes. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [C]* **94**: 105-111.
- Sjostrom, K., Blomberg, C., Fernebro, J., Dagerhamn, J., Morfeldt, E., Barocchi, M.A. et al. (2007)** Clonal success of piliated penicillin nonsusceptible pneumococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12907-12912.
- Smirnova, M.G., Guo, L., Birchall, J.P., and Pearson, J.P. (2003)** LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells. *Cell Immunol* **221**: 42-49.
- Smith, B.L., and Hostetter, M.K. (2000)** C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **182**: 497-508.
- Smyth, C. J. and Duncan, J. L. (1978)** Thiol-activated (oxygen-labile) Cytolysins. In: *Bacterial toxins and cell membranes*, pp 129-183. Edited by *J. Jeljaszewicz & T. Wadstrom*. New York: Academic Press
- Spellerberg, B., Rosenow, C., Sha, W., and Tuomanen, E.I. (1996)** Pneumococcal cell wall activates NF-kappa B in human monocytes: aspects distinct from endotoxin. *Microb Pathog* **20**: 309-317.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A.H. (1999)** Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**: 1634-1642.
- Steinfort, C., Wilson, R., Mitchell, T., Feldman, C., Rutman, A., Todd, H. et al. (1989)** Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun* **57**: 2006-2013.
- Steinman, R.M., Granelli-Piperno, A., Pope, M., Trumpfheller, C., Ignatius, R., Arrode, G. et al. (2003)** The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **276**: 1-30.
- Steinman, R.M., and Pope, M. (2002)** Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* **109**: 1519-1526.

- Stephen, T.L., Fabri, M., Groneck, L., Rohn, T.A., Hafke, H., Robinson, N. et al. (2007)** Transport of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide in MHC Class II tubules. *PLoS Pathog* **3**: e32.
- Tailleux, L., Neyrolles, O., Honore-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J.P. et al. (2003)** Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* **170**: 1939-1948.
- Takeda, K., and Akira, S. (2005)** Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14.
- Talbot, U.M., Paton, A.W., and Paton, J.C. (1996)** Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 3772-3777.
- Tamura, G.S., Nittayajarn, A., and Schoentag, D.L. (2002)** A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infect Immun* **70**: 2877-2885.
- Telford, J.L., Barocchi, M.A., Margarit, I., Rappuoli, R., and Grandi, G. (2006)** Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**: 509-519.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S. et al. (2001)** Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498-506.
- Tomasz, A. (1970)** Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J Bacteriol* **101**: 860-871.
- Tomasz, A., and Munoz, R. (1995)** Beta-Lactam antibiotic resistance in gram-positive bacterial pathogens of the upper respiratory tract: a brief overview of mechanisms. *Microb Drug Resist* **1**: 103-109.
- Tong, H.H., Liu, X., Chen, Y., James, M., and Demaria, T. (2002)** Effect of neuraminidase on receptor-mediated adherence of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium. *Acta Otolaryngol* **122**: 413-419.
- Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Blanot, D., Nahori, M.A., Werts, C., and Boneca, I.G. (2004)** Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep* **5**: 1000-1006.
- Tseng, H.J., McEwan, A.G., Paton, J.C., and Jennings, M.P. (2002)** Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: PsaA mutants are hypersensitive to oxidative stress. *Infect Immun* **70**: 1635-1639.
- Tu, A.H., Fulgham, R.L., McCrory, M.A., Briles, D.E., and Szalai, A.J. (1999)** Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 4720-4724.

- Tuomanen, E.I., Austrian, R., and Masure, H.R. (1995)** Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* **332**: 1280-1284.
- Turley, S.J., Inaba, K., Garrett, W.S., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R.M., and Mellman, I. (2000)** Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. *Science* **288**: 522-527.
- Unkmeir, A., Kammerer, U., Stade, A., Hubner, C., Haller, S., Kolb-Maurer, A. et al. (2002)** Lipooligosaccharide and polysaccharide capsule: virulence factors of *Neisseria meningitidis* that determine meningococcal interaction with human dendritic cells. *Infect Immun* **70**: 2454-2462.
- van Dam, J.E., Flier, A., and Snippe, H. (1990)** Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**: 1-47.
- van Dijk, W.C., Verbrugh, H.A., van Erne-van der Tol ME, Peters, R., and Verhoef, J. (1981)** *Escherichia coli* antibodies in opsonisation and protection against infection. *J Med Microbiol* **14**: 381-389.
- van Kooyk, Y. and Geijtenbeek, T.B. (2003).** DC-SIGN: Escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **9**:697-709.
- van Niel, G., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2008)** Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 437-444.
- Vassalli, J.D., Sappino, A.P., and Belin, D. (1991)** The plasminogen activator/plasmin system. *J Clin Invest* **88**: 1067-1072.
- Veckman, V., and Julkunen, I. (2008)** *Streptococcus pyogenes* activates human plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *J Leukoc Biol* **83**: 296-304.
- Vollmer, W., and Tomasz, A. (2001)** Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **39**: 1610-1622.
- Walport, M.J. (2001)** Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* **344**: 1140-1144.
- Watson, D.A., and Musher, D.M. (1990)** Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* **58**: 3135-3138.
- Weber, J.R., Freyer, D., Alexander, C., Schroder, N.W., Reiss, A., Kuster, C. et al. (2003)** Recognition of pneumococcal peptidoglycan: an expanded, pivotal role for LPS binding protein. *Immunity* **19**: 269-279.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., and Masure, H.R. (1994)** Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **62**: 2582-2589.

- Weiser, J.N., Bae, D., Epino, H., Gordon, S.B., Kapoor, M., Zenewicz, L.A., and Shchepetov, M. (2001) Changes in availability of oxygen accentuate differences in capsular polysaccharide expression by phenotypic variants and clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: 5430-5439.
- Weiser, J.N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R.W., Ratner, A.J., and Janoff, E.N. (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4215-4220.
- Weiser, J.N., Markiewicz, Z., Tuomanen, E.I., and Wani, J.H. (1996) Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **64**: 2240-2245.
- Wurzner, R. (1997) Complement: the Iceman of immunology? *Immunopharmacology* **38**: 63-64.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., and Golenbock, D. (1999) Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* **163**: 1-5.
- Yother, J., and White, J.M. (1994) Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol* **176**: 2976-2985.
- Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P.R., Stillion, R.J., Gordon, S., and Wong, S.Y. (2002) Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* **277**: 41613-41623.
- Zhang, J.R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., and Tuomanen, E. (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* **102**: 827-837.
- Zhang, L.F., Okuma, K., Tanaka, R., Kodama, A., Kondo, K., Ansari, A.A., and Tanaka, Y. (2008) Generation of mature dendritic cells with unique phenotype and function by in vitro short-term culture of human monocytes in the presence of interleukin-4 and interferon-beta. *Exp Biol Med (Maywood)* **233**: 721-731.
- Zysk, G., Schneider-Wald, B.K., Hwang, J.H., Bejo, L., Kim, K.S., Mitchell, T.J. *et al.* (2001) Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: 845-852.

8.7 Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden in folgenden Beiträgen bereits veröffentlicht:

Publikation:

Nadja Noske, Ulrike Kämmerer, Manfred Rohde, and Sven Hammerschmidt (2008). Pneumococcal interaction with human dendritic cells: phagocytosis, survival and induced adaptive immune response is manipulated by PavA. *Cellular Microbiology*, eingereicht

Tagungsbeiträge:

Nadja Noske, Ulrike Kämmerer and Sven Hammerschmidt (2006). Deficiency in PavA of *Streptococcus pneumoniae* results in increased phagocytosis and delayed inflammatory immune response by human dendritic cells. Jahrestagung DGHM Würzburg

Nadja Noske (2007). Impact of the virulence factor PavA on the interaction between *S. pneumoniae* and human dendritic cells. Annual Retreat of the „International Graduate School University of Wuerzburg“, „Class of Biomedicine“, Retzbach

Nadja Noske (2007). The virulence factor PavA of *S. pneumoniae* affects phagocytosis and inflammatory immune response by human dendritic cells. Young Investigator Symposium on Infection Biology ZINF Würzburg – ZIBI Berlin, Würzburg.

Nadja Noske (2007). The virulence factor PavA of *S. pneumoniae* affects phagocytosis and inflammatory immune response by human dendritic cells. EuroPneumo, Oeiras, Portugal.

8.8 Lebenslauf

Nadja Noske

geb. am 29.08.1977 in Aschaffenburg

Schulbildung

| | |
|-------------|---|
| 1984 – 1988 | Pestalozzi-Grundschule in Aschaffenburg |
| 1988 – 1996 | Dessauer-Gymnasium in Aschaffenburg |
| 1996 – 1998 | Alfred-Delp-Gymnasium in Dieburg mit dem Abschluss der Hochschulreife |

Hochschulausbildung

| | |
|-------------------|--|
| 11/1998 – 09/2004 | Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Schwerpunkte: Mikrobiologie (Hauptfach), Biochemie, Genetik September 2004: Diplom, Abschlussnote: sehr gut Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Interaktion von <i>Streptococcus pneumoniae</i> mit antigenpräsentierenden Zellen“, Institut für molekulare Infektionsbiologie in Würzburg |
| 11/2004 – 10/2008 | Promotionsstudium am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg und am Max-von-Pettenkofer-Institut der Universität München unter der Betreuung von Prof. Dr. Sven Hammerschmidt. Thema der Doktorarbeit: Interaktion von Pneumokokken mit Abwehrzellen des Immunsystems: Bedeutung bakterieller Virulenzfaktoren bei der Phagozytose, dem intrazellulären Überleben und der induzierten Immunantwort. |
| 01/2005 – 05/2007 | Mitglied der „International Graduate School University of Wuerzburg“, „Class of Biomedicine“ |

München, Oktober 2008

